

# A Comparative Study on the Freezing Resistance between Triploid Hybrid Breeding and Female Parent Wenling Gaocheng Orange

Fangyong Chen<sup>1\*</sup>, Yin Wang<sup>1</sup>, Haizhi Ni<sup>1</sup>, Bangguo Yan<sup>1</sup>, Dongmi Wang<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Citrus Research Institute of Zhejiang Province, Huangyan Zhejiang

<sup>2</sup>Agricultural Bureau of Taizhou City, Zhejiang Province, Taizhou Zhejiang

Email: \*cfy17266@126.com

Received: Jan. 1<sup>st</sup>, 2018; accepted: Jan. 15<sup>th</sup>, 2018; published: Jan. 22<sup>nd</sup>, 2018

## Abstract

In this study, 15 years Zhenong seedless orange triploid hybrid breeding and 30 years diploid female parent Wenling Orange are used as test materials, to detect and identify the freezing injury of the leaves based on freezing injury investigation by using stoma, conductivity, SOD, CAT, MDA, ABA, PRO. Stomatal signs showed that the stoma density of Wenling Gaocheng increased by 7.80% and the stoma area decreased by 3.65% after freezing injury, while the stoma density of triploid hybrid Zhenong seedless orange-pomelo increased by 7.20% and the stoma area decreased by 5.73% at the same condition. The stomatal density of female parent was significantly higher than that of the hybrid progeny before and after freezing injury, but the stomatal area was just the opposite. After the freezing injury, the stomatal macroaxis of the triploid hybrid progeny is longer than that of female parent, while the minor axis is shorter than that of female parent, and the stomatal closure ability is stronger in adversity. After that, the electrical conductivity, functional enzyme activity and hormone content were detected and analyzed. Before and after the freezing injury, the female parent's electrical conductivity was 1.40 times and 1.13 times higher than that of the hybrid progeny, which formed a very significant difference. MDA content of Zhenong seedless orange triploid hybrid was lower than Wenling Orange. The protein concentration and SOD content of the hybrid progeny was greater than that of female parent by 32.31% and 44.87% respectively. ABA content and Pro content were 32.66% and 7.06% higher than Wenling Orange, respectively. Lethal temperature of Zhenong seedless orange-pomelo was lower than Wenling-gaocheng Tangelo. In conclusion, the comprehensive study showed that, as a triploid hybrid, the freezing resistance of Zhenong seedless orange-pomelo was significantly stronger than that of the diploid female parent Wenling-gaocheng Tangelo. Triploid hybrids have obvious advantages in freezing resistance, which reflects the characteristics of high-value parents.

## Keywords

Parent, Hybrid Progeny, Freezing Resistance, Physiology, Studies

\*通讯作者。

# 温岭高橙三倍体杂种抗冻性研究

陈方永<sup>1\*</sup>, 王 引<sup>1</sup>, 倪海枝<sup>1</sup>, 颜帮国<sup>1</sup>, 王冬米<sup>2</sup>

<sup>1</sup>浙江省柑橘研究所, 浙江 黄岩

<sup>2</sup>浙江省台州市农业局, 浙江 台州

Email: cfy17266@126.com

收稿日期: 2018年1月1日; 录用日期: 2018年1月15日; 发布日期: 2018年1月22日

## 摘 要

以15年生投产的三倍体浙农无核橙柚与母本二倍体温岭高橙为试材, 在冻害调查的基础上, 相继利用气孔、电导率、LT50、SOD、CAT、MDA、ABA、PRO对叶片的冻害结果进行检测鉴定。气孔体征研究显示, 温岭高橙受冻后的气孔密度增加7.80%、面积减少3.65%, 同比, 浙农无核橙柚气孔密度增加7.20%、面积减少5.73%。冻害前后母本气孔密度显著大于杂交后代, 面积则与之相反。冻害发生后三倍体杂种气孔长轴长于母本, 短轴短于母本, 逆境时闭合能力强。冻害发生前后, 母本电导率分别是杂交后代的1.40倍、1.13倍, 形成极显著差异。MDA含量浙农无核橙柚低于温岭高橙。杂交后代的蛋白浓度、SOD含量分别大于母本32.31%、44.87%。浙农无核橙柚ABA浓度和PRO浓度分别高于母本32.66%和7.06%。半致死温度的测定结果表明, 浙农无核橙柚低于温岭高橙。综合研究认为, 浙农无核橙柚作为三倍体杂种其抗冻性显著强于母本二倍体温岭高橙。三倍体的杂种优势在抗冻性上优势明显, 体现了高值亲本的特点。

## 关键词

亲本, 杂交后代, 抗冻, 生理, 研究

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

柑橘同其它植物一样都有一定的抗寒性。柑橘属不同品种, 不同栽培水平、不同气候条件对于抗寒能力结果不同。2015年底浙江省遭受重大冻害, 极端温度浙江东部达 $-9^{\circ}\text{C}$ ~ $-10^{\circ}\text{C}$ , 浙西部达 $-10^{\circ}\text{C}$ ~ $-11^{\circ}\text{C}$ , 且都持续2d左右, 因此全省柑橘冻害发生率达90%以上, 不少柑橘受冻致死。冻害在热带地区也存在, 2008年初广西发生大面积冻害, 全区近70%的柑橘面积受冻, 直接损失8亿元。解决或预防冻害最重要的因素是品种, 为此人们进行了相关的基础研究。刘绍俊[1]进行21个柑橘新优品种和2个相同品种不同砧木的抗寒性研究。明确温州蜜柑8个品系中, 半致死温度(LT50)平均为 $-9.92^{\circ}\text{C}$ , 抗寒性最强与最弱的温度相差 $-2.38^{\circ}\text{C}$ ; 橘类5个品种中, LT50 $-9.16^{\circ}\text{C}$ , 抗寒性最强与最弱的温度相差 $-2.07^{\circ}\text{C}$ ; 橙类5个品种中, LT50 $-8.60^{\circ}\text{C}$ , 抗寒性最强与最弱的温度相差 $-1.20^{\circ}\text{C}$ ; 杂柑类3个品种中LT50 $-7.95^{\circ}\text{C}$ , 抗寒性最强与最弱的温度相差 $-2.26^{\circ}\text{C}$ 。另外明柳甜橘枳壳与酸橘不同砧木组合, 枳壳较酸橘抗寒 $0.8^{\circ}\text{C}$ 。徐卫平

等认为[2]用蜜橘、金橘、不知火(杂柑)研究抗寒性,结果抗寒性强弱排序为金橘 > 不知火 > 蜜橘,认为逆境下 MDA 指标上升显著是抗寒力下降的重要表现,MDA 指标对于抗寒品种的选育有着重要技术依据。陈世林等[3]针对湖北宜昌夷陵区的调查研究认为,柑橘受冻由重到轻依次为杂柑 > 柚 > 橙 > 椪柑 > 温州蜜柑。查阅相关资料,柑橘受冻目前对于其抗寒性研究主要集中在活性酶、细胞膜透性、Ca<sup>2+</sup> 为代表的矿质营养、保护地栽培及基础研究方面的抗逆基因发现克隆等方面[4]。PENG 等[5]研究柠檬的抗寒性,发现 PtrBAM1 是重要的调控基因,转入烟草有较强的忍耐力。AND 等[6]用转录组分析验证,影响木薯芽的抗寒能力和非生物胁迫的基因有 32 个,起冷应激反应作用。在信号感知和生理反应中所涉及的生物学过程可能揭示了与热带植物耐寒性有关的分子机制,并为基因改良提供了有用的候选基因。PENG 等、HUANG 等[7]先后以枳壳为试材,利用 RACE 克隆 PtrBAM1,表明其在枳叶片淀粉降解中起到了决定性作用,对积累可溶性糖起重要作用。董万鹏等[8]研究低温胁迫对西番莲生理指标的影响,对西番莲的 POD、SOD、MDA 等 8 个生理指标进行综合分析,总结出西番莲抗寒性的强弱顺序。

综上所述,冻害对于柑橘的正常生产、生长影响很大,为此,人们采取各种措施予以预防。当然种性是预防的根本。为此,陈方永等[9]主持育成的三倍体品种“浙农无核橙柚”〔ZJ(甜橙类 + 柠檬) × 温岭高橙〕(国家品种权号: CNA20110652.4)在 2015 年、2016 年年初当地柑橘遭受-5℃~-7℃以上低温绝大部分严重冻害的条件下,叶片基本无损,且在次年后持续丰产稳产,但母本温岭高橙植株冻害严重,次年基本无产量。既于此,本研究利用这个三倍体杂交后代品种与母本二倍体温岭高橙〔Wenling-gaocheng Tangelo (Citrus hybrid)〕为材料进行亲缘关系的抗寒性分析,以期明确杂交多倍体后代的抗冻性。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 材料

#### 植株叶片

2017 年 1 月 15 日以浙江省柑橘研究所资源圃内 15 年生投产的“浙农无核橙柚”和高接 15 年树温岭高橙为试验取材对象,两者均随机取结果枝上一年生的成龄叶为试材。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 叶片气孔检测

参照陈方永等[10]方法进行,取结果枝上一年生的成年叶片,利用人工气候箱在-5℃条件下持续 10 h 后取样,扫描电镜(日立 S4800)观察气孔形状,ImageJ 软件测定气孔大小、密度,每处理重复 3 次。

#### 2.2.2. 叶片果实电导率检测

取结果枝上一年生叶片,利用人工气候箱-5℃条件下持续 10 h 后取样,测定电导率值,测定方法参照徐卫平等[2],按步骤进行操作,每处理重复三次。

#### 2.2.3. 半致死温度的检测

叶片用蒸馏水冲洗干净后用纱布擦干。每个品种叶片用打孔器打取叶圆片,每份三个圆叶片置于试管中,加入 6 ml 蒸馏水,低温处理设为 0℃、-5℃、-10℃、-15℃、-20℃。各保持 24 h,然后放入 4℃解冻。温度达室温后进行电导率测定。电导率仪于室温下分别测定叶片组织低温处理后和煮沸后的电导率以此计算组织相对电导率[11]。实验重复三次。对实验数据相对电导率进行 Logistic 回归分析,回归模型为  $y = k/1 + a * e^{-b * x}$  数据处理采用 SPSS19.0 软件。

#### 2.2.4. SOD、CAT、MDA 活性检测

先进行蛋白浓度,然后进行各个酶活性检测。蛋白检测参照考马斯亮蓝法操作。SOD 活力检测,具

体参照荧光法操作。CAT 检测, 具体参照高锰酸钾滴定法与紫外吸收法操作。MDA 检测, 具体参照比色法操作。3 种测定方法均参照李合生[11]的具体做法。每处理重复三次, 数据处理采用 Excel 2007 进行处理。

### 2.2.5. ABA 检测

参照植物激素酶连免疫分析法[12]组织材料设备, 每处理重复三次, 数据处理采用 Excel 2007 进行处理。

### 2.2.6. PRO 检测

方法参照[12]组织材料设备, 每处理重复三次, 数据处理采用 Excel 2007 进行处理。

## 3. 结果与分析

### 3.1. 气孔检测

#### 3.1.1. 气孔形态检测

从表 1 可见, 受冻前温岭高橙气孔密度、面积分别是 427.350 个/mm<sup>2</sup>、73.368 μm<sup>2</sup>, 气孔长短轴为 7.548 μm/5.525 μm; 受冻后气孔密度、面积分别为 460.698 个/mm<sup>2</sup>、70.688 μm<sup>2</sup>, 气孔长短轴为 7.992 μm/6.663 μm。与此同时, 受冻前浙农无核橙柚的气孔密度、面积分别是 354.722 个/mm<sup>2</sup>、81.795 μm<sup>2</sup>, 气孔长短轴分别为 8.301 μm、6.795 μm; 受冻后气孔密度、面积分别为 380.249 个/mm<sup>2</sup>、86.479 μm<sup>2</sup>, 气孔长短轴分别为 8.038 μm、6.405 μm。

#### 3.1.2. 气孔类型鉴别

受冻前温岭高橙多为不规则型, 少数不等型; 受冻后则多为平行型, 少数横列型。浙农无核橙柚受冻前后均为不规则型, 少数不等型(见图 1)。

### 3.2. 叶片果实电导率检测

检测结果表明, 在低温处理前后, 浙农无核橙柚叶片的电导率分别是 3.5551 S/m、4.4629 S/m, 温岭高橙的电导率分别为 8.5497 S/m、9.5099 S/m。由此可见, 冻害前后母本的电导率分别是杂交后代的 1.40 倍、1.13 倍, 形成极显著差异(表 2)。

### 3.3. 半致死温度的测定

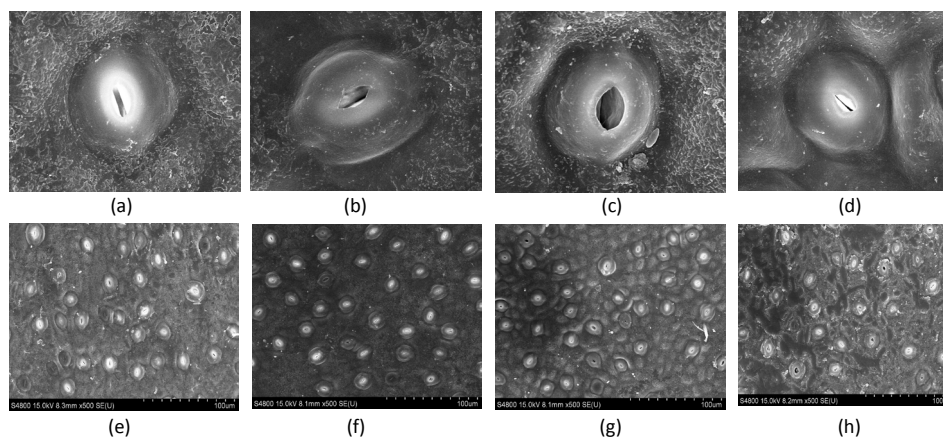
由表 3 可见, 浙农无核橙柚的半致死温度为-5.23℃低于温岭高橙-4.99℃的 0.24℃, 由此可见抗寒性前者 > 后者。

**Table 1.** Comparison of stoma density, size, area and stomatal apparatus size of leave

**表 1.** 叶片气孔密度、气孔面积和气孔器大小比较

供试材料	气孔密度(No./mm <sup>2</sup> )	气孔面积(μm <sup>2</sup> )	气孔大小(μm)	
			长轴	短轴
温岭高橙冻前叶片	427.3499b	73.368b	7.548b	5.525b
温岭高橙冻后叶片	460.6989a	70.688b	7.992ab	6.663a
浙农无核橙柚冻前叶片	354.7218d	81.795a	8.301a	6.795a
浙农无核橙柚冻后叶片	380.2488c	86.479a	8.038a	6.405a

注: 表中英文小写字母表示 a = 0.05 差异显著性。



**Figure 1.** Comparison of leaf stomata of Wenling Gaocheng and Zhenong seedless Orange-pomelo. (a) Unfrozen leaf stomata of Wenling Gaocheng (3000×); (b) Frozen leaf stomata of Wenling Gaocheng (3000×); (c) Unfrozen leaf stomata of Zhenong seedless Orange-pomelo (3000×); (d) Frozen leaf stomata of Zhenong seedless Orange-pomelo (3000×); (e) Stomatal shape of Wenling Gaocheng (unfrozen) (500×); (f) Stomatal shape of Wenling Gaocheng (frozen) (500×); (g) Stomatal shape of Zhenong seedless Orange-pomelo (unfrozen) (500×); (h) Stomatal shape of Zhenong seedless Orange-pomelo (frozen) (500×)

**图 1.** 温岭高橙、浙农无核橙柚叶片气孔受冻前后比较。(a) 温岭高橙冻前叶片气孔(3000×); (b) 温岭高橙冻后叶片气孔(3000×); (c) 浙农无核橙柚冻前叶片气孔(3000×); (d) 浙农无核橙柚冻后叶片(3000×); (e) 温岭高橙冻前气孔类型(500×); (f) 温岭高橙冻后气孔类型(500×); (g) 浙农无核橙柚冻前气孔类型(500×); (h) 浙农无核橙柚冻后气孔类型(500×)

**Table 2.** Conductivity detection results

**表 2.** 电导率检测结果

材料名称	P0	P1	P2	P1-P0	P2-P0	相对电导率
温岭高橙冻前叶片	9.66	14.4	65.1	4.74	55.44	8.5497c
温岭高橙冻后叶片	10.51	16.7	75.6	6.19	65.09	9.5099d
浙农无核橙柚冻前叶片	13.08	15.26	74.4	2.18	61.32	3.5551a
浙农无核橙柚冻后叶片	14.21	17.21	81.43	3.00	67.22	4.4629b

P0: 蒸馏水电导率; P1: 煮沸前电导率; P2: 煮沸后电导率。

**Table 3.** Logistic equation of the relative electric conductivity and LT50 of two materials

**表 3.** 两种材料电导率的 Logistic 回归方程及半致死温度

编号	Logistic 拟合方程	LT50 (°C)	抗寒顺序
温岭高橙	$y = 0.72/(1 + 5e^{-0.13x})$	-4.99a	2
浙农无核橙柚	$y = 0.7/(1 + 4e^{-0.15x})$	-5.23b	1

### 3.4. 酶活性检测

浙农无核橙柚叶片(下同)蛋白浓度为 1.11 mgprot/ml、温岭高橙为 0.84 mgprot/ml, 前者大于后者 32.31%。SOD: 浙农无核橙柚为 691.55 U/g, 温岭高橙 477.33 U/g, 前者大于后者 44.87%; CAT: 浙农无核橙柚 10.9755 U/mgprot, 温岭高橙 12.19 U/mgprot, 前者少于后者 10.0%; MDA: 浙农无核橙柚 131.02 nmol/g, 温岭高橙 137.641 nmol/g, 前者少于后者 4.80%。

### 3.5. ABA、PRO 测定

浙农无核橙柚叶片 ABA 浓度为 308.82 ng/g, 温岭高橙为 207.95 ng/g, 前者高于后者 32.66%; 浙农无核橙柚 PRO 浓度为 1688.46 μg/g, 温岭高橙 1569.23 g/g, 前者高于后者 7.06% (表 4)。



**Table 4.** Physiological index detection results after low temperature treatment**表 4.** 低温处理后生理指标检测结果

序号	检测名称	浙农无核橙柚	温岭高橙
1	蛋白浓度(mgprot/ml) Protein concentration (mgprot/ml)	1.11	0.84
2	SOD 活力(U/gFW) SOD content (U/gFW)	691.55	477.33
3	CAT 活力(U/mgFW 鲜重) CAT content (U/mgFW)	10.97	12.19
4	MDA 含量(nmol/gFW 组织鲜重) MDA content (nmol/gFW)	131.02	137.64
5	ABA 含量(ng/gFW) ABA content (ng/g FW)	308.82	207.95
6	PRO 含量( $\mu$ g/gFW) PRO content ( $\mu$ g/g FW)	1688.46	1569.23

#### 4. 讨论

植物的抗寒机制是极为复杂的生理变化过程, 其中涉及诸多物质相互作用协同变化, 单一抗寒指标不足以判断植物对逆境的适应能力[13] [14]。植物叶片对环境变化十分敏感, 其形态与生理变化反映了植物对环境温度变化的适应性和自我调控能力, 更能反映植物对低温的响应与适应机制[15]。目前利用电导率, SOD、POD、CAT 等抗寒性指标评价葡萄[16] [17]、玉米[18]、澳洲坚果[19]、小麦[20]等物种已经取得了满意的结果。有研究表明, PRO 有较强的水合能力, 有助于维持低温胁迫下相对稳定的水环境[21]。本试验将气孔与抗寒的相关性结合起来研究尚未见报道。气孔代表植物遗传变化的一个典型标志。冻害前后二倍体品种气孔密度显著大于三倍体, 面积则与之相反。冻害前后二倍体的气孔类型母本变化显著, 三倍体的杂交后代浙农无核橙柚基本无变化。冻害发生后三倍体的浙农无核橙柚气孔长短轴缩短变化大, 长轴长于母本, 短轴短于母本, 逆境时闭合能力强, 因而在冻害发生时植株基本不受冻, 而二倍体的温岭高橙则冻害严重。可见, 倍性不同, 叶片气孔结构、形态也不同, 这是植物抗性强的基础。

酶活性与激素等功能性成分含量的检测是本研究的又一重点, 它的研究结果佐证三倍体植株抗冻能力的强弱。从 SOD 活力与 CAT 活力比较, 前者活性高, 抗冻性强, 后者则相反, 且两者活性相差十分悬殊, 因此, 以 CAT 的数据变化作为活性强弱, 以此表示抗冻结果并不准确。这个结果与康国章等[19]小麦冻害研究结果相吻合。可以这样理解, CAT 的活性变化难以作为抗冻指标准确衡量。蛋白与 SOD 的含量变化与抗冻结果呈正相关。MDA 含量高, 意味着植物抗性弱。对此, 母本温岭高橙高出杂交后代浙农无核橙柚 6.2 nmol/g 叶片鲜重。本研究与郑国华等[22]“解放钟”红肉枇杷研究结果也相一致, 他们发现温度越低, PMP、MDA 含量上升越明显。本研究的相关研究还与蒋景龙的研究接近。他认为, PRO 是渗透调节物质, 而 SOD、CAT 和 POD 均是植物细胞内清除活性氧和维持植物体内活性氧的重要酶, 它们对维持细胞膜的完整性及提高植物的抗逆性具有重要的意义。外源施加  $1.0 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}_2$  处理可以提高低温胁迫下柑橘叶片的渗透调节能力, 增强了柑橘叶片中的 SOD、CAT 和 POD 等抗氧化酶的活性, 增强了 ROS 清除能力, 超过相应含量则超出了抗氧化系统自我调节的范围, 效果难以达到预期。本研究表明, 浙农无核橙柚的半致死温度低于温岭高橙, 这与徐卫平(2017)、陈世林(2014)对柑桔抗寒性高低的研究结果一致。

应该指出, 柑橘的冻害问题是种性/适宜区的商数关系。杂交后代或选育种质的后代其抗冻性优于亲本或母体(母本), 那么其适宜的栽培区域得到扩大, 反之栽培环境变窄, 冻害发生的概率高。可见, 对于冻害机理的研究与品种选育有着重要的相关性。

## 参考文献 (References)

- [1] 刘绍俊. 广西柑橘新品种抗寒性研究[D]: [硕士学位论文]. 桂林: 广西师范大学, 2011.
- [2] 徐卫平, 蒋景龙, 任绪明, 李丽, 李新生, 赵桦. 低温胁迫对 3 种柑橘幼苗细胞膜及渗透调节的影响[J]. 分子植物育种, 2017, 15(3): 1104-1108.
- [3] 陈世林, 胡春根, 刘云鹏, 熊莉, 唐子立. 宜昌市夷陵区柑桔冻害分析[J]. 中国南方果树, 2014, 43(2): 54-56.
- [4] 蒋景龙. 外源 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对低温胁迫下柑橘叶片抗寒性的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(3): 499-505.
- [5] Peng, T., Zhu, X.F., Duan, N., *et al.* (2014) PtrBAM1, a  $\beta$ -Amylase-Coding Gene of *Poncirus trifoliata*, Is a CBF Regulon Member with Function in Cold Tolerance by Modulating Soluble Sugar Levels. *Plant, Cell and Environment*, **37**, 2754-2767. <https://doi.org/10.1111/pce.12384>
- [6] Yang, J. and Zhang, P. (2012) Transcriptome Profiling of Low Temperature Treated Cassava Apical Shoots Showed Dynamic Responses of Tropical Plant to Cold Stress. *BMC Genomics*, **13**, 64. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-64>
- [7] Huang, X.S., Zhang, Q.H., Zhu, D.X., *et al.* (2015) ICE1 of *Poncirus trifoliata* Functions in Cold Tolerance by Modulating Polyamine Levels through Interacting with Arginine Decarboxylase. *Journal of Experimental Botany*, **66**, 3259. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv138>
- [8] 董万鹏, 罗充, 龙秀琴, 胡静, 李燕. 低温胁迫对西番莲抗寒生理指标的影响[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 771-777.
- [9] 陈方永, 倪海枝, 徐小菊, 陈青英, 方海涛, 王引, 陈正连. 种间杂交培育“温岭高橙”三倍体杂种[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2013, 39(5): 531-536.
- [10] 陈方永, 王引, 倪海枝, 任正初, 刘继红. 浙东南杨梅叶片气孔观察与相似性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 626-631.
- [11] 赵奇, 范春丽, 杨玉珍, 李玉华, 高飞飞, 许芳. 电导法配合 Logistic 方程比较 16 种校园植物抗寒性[J]. 山东农业科学, 2015, 47(7): 53-55.
- [12] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [13] 刘荣, 刘清国, 范建新, 龚德勇, 吴小波, 韩树全, 雷朝云. 果树抗寒性生理生化及分子机理研究进展[J]. 分子植物育种, 2017, 15(5): 2028-2034.
- [14] 张文辉, 段宝利, 周建云, 刘祥君. 不同种源栓皮栎幼苗叶片水分关系和保护酶活性对干旱胁迫的响应[J]. 植物生态学报, 2004, 28(4): 483-490.
- [15] 尹永强, 胡建斌, 邓明军. 植物叶片抗氧化系统及其对逆境胁迫的响应研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 105-110.
- [16] 刘伟, 曲凌慧, 刘洪庆, 杨德翠, 刘新. 低温胁迫对葡萄保护酶和氧自由基的影响[J]. 北方园艺, 2008(5): 21-24.
- [17] 王文举, 张亚红, 牛锦凤, 王振平. 电导法测定鲜食葡萄的抗寒性[J]. 果树学报, 2007, 24(1): 34-37.
- [18] 王小丽, 裴玉贺, 郭新梅, 张恩盈, 宋希云. 低温胁迫下玉米幼苗的几种生理生化指标的变化[J]. 植物生理学通讯, 2009(5): 487-490.
- [19] 岳海, 李国华, 李国伟, 陈丽兰, 孔广红, 梁国平. 澳洲坚果不同品种耐寒特性的研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(1): 31-38.
- [20] 康国章, 岳彩凤, 沈丙权, 郑贝贝, 彭慧芳. 冻害胁迫下小麦叶片内一些抗冻基因转录水平研究[J]. 西北农业学报, 2010, 19(10): 55-59.
- [21] 王娜, 王奎玲, 刘庆华, 刘庆超. 四种常绿阔叶树种的抗寒性[J]. 应用生态学报, 2016, 27(10): 3114-3122.
- [22] 郑国华, 张贺英, 钟秀容. 低温胁迫下枇杷叶片细胞超微结构及膜透性和保护酶活性的变化[J]. 中国生态农业学报, 2009(4): 739-745.

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2164-5507，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[hjas@hanspub.org](mailto:hjas@hanspub.org)