溫度逆境生理在園藝育種上之應用

曾 夢 蛟
國立中興大學園藝系

前 言

增進糧食供應的品質與產量，一直是農業專家、學者努力研究的目標。估計約有 70% 的作物減產是因爲環境逆境所造成的(Boyer,1982)。此外，由於雨水沖蝕與新興都市的興起，造成農地的減少，亦是未來減少糧食供應的原因之一。解決此問題包括改進增加農作物產量與增加週邊農地的利用(marginal land)。此二者均與培育出適應次佳(suboptimal)之生長環境的品種有關。植物抗逆境的特性是很複雜的，通常是由複因子控制的性狀(polygenic trait) (Barton and Brill, 1983)。這可能是爲什麼作物種源收集很豐富，但抗逆境作物育種進展緩慢的最主要原因。此外，缺乏對抗逆境基因的認識與瞭解，及某些作物品種間狹窄的基本差異，亦都是阻礙我們培育出逆境品種的重要因素。雖然目前精巧的生物技術，藉基因轉移可突破種間雜交的障礙，但缺乏抗逆境基因，使育成抗逆境品種，困難重重。

在所有環境逆境中，溫度和乾旱逆境是影響植物在地球上分佈及作物產量之最關鍵的因子(Boyer, 1982)。過去幾世紀來植物生理學家致力於溫度逆境對植物影響的研究，已擴展我們對植物遭受到高溫、寒害及凍害時生理反應的瞭解。植物對逆境反應的不同，廣汎存在於基因的差異，已證實具有其生理的依據。很顯然植物抗環境逆境是由遺傳基因所控制的。通常作物育種學家均在田間篩選對環境適應之優良外表型的品系。靠田間經驗的方法來分離耐逆境植株有其不利條件。有時逆境沒有發生，或太嚴重，或者是受到其它環境因子之交互影響。此種田間測試通常需要較多族群、時間、勞力及土地。因此在植物組織、細胞或胞器的層次上，利用化學、物理等之方法快速測定對逆境的反應，可做爲基因篩選上的依據。重要的觀念是一個逆境的生理反應，如果沒有利用基因或栽培上的改進，將對經濟作物的生產是沒有幫助。因此，在育種計畫中爲了瞭解在龐大種源中可利用的基因變異度的範圍，利用作物對逆境之生理反應已被用來作爲基因篩選的準則。

耐逆境品系之篩選與評估方法

耐逆境植株的篩選通常可分爲以下三種(Lewis and christiansen, 1980)：

(1) 間接選拔－於田間自然環境情況變得較不適宜作物正常生長時進行篩選。在此種自然逆境條件下，例行篩選種源品系、生育良好之品系將選拔。

(2) 直接選拔－嚴格挑選可靠與一致性的逆境測試區域。供試材料生長於一致之逆境條件下

，作篩選。

(3) 控制逆境條件之選拔－此法利用溫室或人工生長室在有效控制逆境條件下，進行精確的篩選耐逆境品系。

評估植物耐逆境的程度，一般有下列幾種方式：

(1) 觀察法：最快速簡便的方法就是觀察法，但此法可能因人而有所偏差。植物組織受損通常會有水浸狀出現及失去膨壓、枝葉下垂的現象(Hudson,1961; Li *et al.*, 1979)。

(2) 植株再生長：雖然評估植株能否再生長是活力鑑定之最終目標，但通常需較長的時間，且受其它環境因子之交互影響，對一大的族群需要較大的空間與勞力(Larsen, 1978)。

(3) 電導度法：經過一逆境後，組織受損的程度可經由測定電解質自細胞滲漏到外界的程度，而加以評估。當組織受傷害時，細胞膜之通透性增加，電解質擴散到細胞外。細胞受傷害的程度愈大，電解質自由擴散的量也越多。電解質法適用於葉、花、冠芽等組織，但不適用於根部的測定。利用電導度法可測定某一逆境的致死溫度(LT50)，亦即達組織內50%電解質滲漏的溫度。其法爲切取適宜大小的組織浸入10 ～15 ml的去離子水，經眞空抽氣10～15分鐘後，搖晃培育一小時，用電導度計測定水溶液的導電度(R1)。經超低溫冷凍殺傷組織後，回溫樣品再測定其導電度(R2)。R1/R2 的比值做爲評估受傷害之相對值(Sukumaran and Weiser, 1972)。

(4) 三苯基四唑化氯(Triphenyl tetrazolium chloride, TTC)還原法：TTC分析法是利用細胞還原活力之原理。當細胞尙具有活力時，其粒線體內之 succinate dehydrogenas 將無色氧化態之 TTC還原成紅色之還原態。此法適用於癒傷組織、細胞懸浮培養、原生質體等組織培養材料及種子、根部、木本植物枝幹等組織。此法乃將組織浸於含 0.05% TTC 之 0.05 M 磷酸緩衝液(pH7.4)。樣品經眞空滲入 5 分鐘後，置於室溫暗處培育18至20小時。紅色之TTC以95%酒精萃取，再以光電比色計測定其在484 nm 之吸收值。受傷害之程度以其與對照組比較減少TTC還原之百分率爲評估(Towill and Mazur, 1974)。

(5) 活性染色法：常用之活性染色劑爲中性紅(neutral red)。當細胞具有活性，中性紅呈離子化且保存在細胞內，在顯微鏡下觀察呈紅色。若細胞死亡，則未見染色。其它活性染劑尙有 fluorescein diacetate, phenosafranin 及 trypan blue 等。(Levitt 1956, Widholm 1972, Hauptmann and Widholm 1982)。

(6) 質壁分離法：健康有活力的細胞在高張溶液，例如甘露醇、氯化鈣、PEG 等具有質壁分離的特性。當細胞受傷害，原生質膜之半透性能力消失，質壁分離的特性也未見。利用顯微鏡觀察可區別組織受傷害的程度及細胞的活力。植株再生長法及質壁分離法是眞正測定組織經逆境後其細胞活力(living activity)的二個方法。(Siminovitch and Briggs 1953; Tao *et al.*,1983)。

(7) 熱能分析法：由於許多環境逆境均與這些逆境誘導組織內水分逆境有關，因此測定組織內水的活性與特性也被利用來評估組織耐逆境的程度與活力。這些方法包括有 (a)differential thermal analysis (D.T.A.), (b)differential scanning calorimetry (D.S.C.), (c)nuclear magentic resonance (N.M.R.) (Burke *et al.* 1976)。此外，電阻法(electricalimpedance)亦被用來作爲評估經某逆境後組織的活力。此法具有可偵測完整組織之優點。電阻法提供細胞膜完整性程度的資料。因爲生物系統可視爲一電場模式，而細胞膜提供電容的來源，當細胞膜受損就

如同電場中電容被破壞(Fejer and Schwarzbach, 1978; Hayden *et al.*,1972)。

植物耐高溫之生理與篩選耐熱品系

溫度影響生化反應速率，因此高溫逆境對植物之營養生長與生殖生長均有極大的影響。植物對高溫的反應依內在因子，例如植物種子、發育階段、組織部位及外在環境因子而有所不同。最佳的例子爲當葉片開始分化，擴展期，遭受高溫逆境將影響其最終的大小及形狀。高溫亦限制新梢的抽長，及造成葉片或枝幹的日燒。高溫對植物普遍的影響包括有：(a)抑制生長，(b)由於呼吸作用大於光合作用所導致的饑餓現象，(c)有毒物質累積導致的代謝失調，(d)重要代謝物質的不平衡導致生化反應受阻，(e) 核酸代謝之分解作用大於合成作用導致重要蛋白質、氨基酸及核酸匱乏，(f)脂質溶解，蛋白質變化，蛋白質與核酸交互作用失調導致細胞膜特性失常(Levitt, 1980)。

植物耐熱性是一種可遺傳與可馴化的反應，與其生理情況有密切關係。評估植物耐熱性，必須對其它環境因子，例如土壤水份有效控制。通常有兩種方式用來評估植物耐熱性，(1) 將植物或組織置於不同高溫，一定時間後再移到溫室觀察其受傷害程度－熱殺傷溫度(heat killing temperature)，(2)將植物或組織置於一設定高溫，不同時間後測定其受傷害程度－熱殺傷時間(heat killing time)。通常測定熱殺傷時間能在耐熱與敏感基因型間，提供一較大、較佳之篩選根據，同時設定一個固定溫度，比設定幾個微差溫度在操作上較方便。

植物在生長發育過程中對高溫最敏感的生理反應是光合作用 (Bjokman, 1980)。抑制光合作用的溫度比起不活化酵素(Bjokman *et al.*, 1976; Santarius, 1975)、降低呼吸作用(Bjorkman 1975)、減少葉綠體膜半透性(Krause and Santarius, 1975) 的溫度都來的低。高溫不活化光合作用可能與高溫破壞光磷酸化作用、光合作用系統 II 之結構(Santarius and Muller, 1979)、葉綠餅膜之完整與半透性(Bjokman *et al.*, 1980)有關。因此耐熱植物藉增加光合作用器官之熱穩定度，使維持光合作用代謝是可預見的。利用光合作用率做爲指標篩選耐高溫番茄品系已有報導(Hassan, 1985)。

高溫導致呼吸作用增加，光合作用淨產物減少。高溫同時危害粒線體膜，因此耐熱植物在高溫逆境時，維持有效率之呼吸作用，提供足夠的 ATP與代謝中間產物，使生理代謝得以正常進行是很重要的。McDaniel (1982)以不同光磷酸化作用及呼吸作用之苜蓿親本雜交，培育成高ADP:O及低吸收作用之品系，在高溫下有極高之產量。此爲一結合二個不同生理因子，培育成耐逆境、高產之作物的佳例。

升高溫度會增加細胞膜上疏水鍵間的交互作用及減少親水鍵間交互作用。因此，蛋白質與膜上之脂質區將更緊密結合，此可能造成膜上蛋白質間距離拉遠；例如，高溫增加類囊體膜疏水鍵間的交互作用，可能導致光補獲蛋白質自反應中心解離。此外高溫也會使膜上脂質產生非雙層之分離 (phase separation of non-bilayer lipid)，形成逆轉圓錐微粒 (cylindrical inverted micelles) (Quinn and Willians, 1985)。因此高溫影響植物細胞各種胞器膜的熱穩定性，曾被廣泛的深入研究。類囊體膜是被視爲對熱最敏感的膜，其次依序爲葉綠體膜，粒線體膜及細胞質膜。導電度法評估植物受高溫爲害的程度即是利用植物暴露到高溫逆境，其細胞膜的通透性增加電解質擴散到外界之原理。當細胞受到熱傷害程度越嚴重，電解質滲漏的量越多。利用導電度法評估菜豆(Lou, 1989)，馬鈴薯、大豆(Martinenu *et al.*, 1979)，番茄(Shen and Li, 1982)，

胡瓜 (Lester,1985)與柑橘 (Ingram, 1984) 等園藝作物之耐熱性已有報導。且利用導電度法所測定之菜豆、大豆、番茄之熱殺傷時間與其在高溫逆境之相對產量呈正相對關。Marsh *et al.* (1985)利用導電度法研究菜豆耐熱性遺傳行爲發現，耐熱性是由少數基因所控制，狹義遺傳率介於2.9～24%之間，由顯性加成基因之作用所控制。

自然界四季溫度之變化是呈漸近性，周期性的改變。而植物能感應自然環境的變化，進行生理上的調適，以維持其生長或生存稱爲馴化 (acclimation)。所以在田間選拔的耐熱品系，事實上是選拔對高溫具有快速調適生長能力之品系 — 具有熱馴化之品系。以熱馴化處理配合導電度測定熱殺傷溫度或熱殺傷之時間是一簡單、快速、精確篩選耐熱品系的方法。

長久以來植物內生荷爾蒙一直被認爲在植物對溫度馴化與反應上扮演一重要角色。噴灑植物生長調節劑，促進番茄在高溫時著果已有報導(Lewis 1953, Liverman and Johnson 1957, Moore and Thomas 1952)。高溫減少 auxin(Iwahori, 1967)與 cytokinine 的含量(Cole, 1969)，增加 ABA 含量。耐高溫之豌豆品系，也已證實具有較高之 cytokinine 含量(McDainel,1982)。因此高溫減少植物荷爾蒙之合成與轉移，加速植物離層老化與對高溫逆境之敏感，是培育耐熱品系不容忽視之生理上的考慮重要因素。高溫影響許多園藝作物嚴重落花、落果。雖然目前大多數高溫對園藝作物之影響大都集中在生殖器官構造畸型等之研究 (Ahmadi and stevens, 1979 ; Christinusen, 1978)，但到目前爲止尚無一致的結論(Ahmadi and Stevens, 1979 ; Warrag and Hall, 1983)。目前利用 ELISA 方法偵測植物荷爾蒙之技術的開發、篩選種源內之族群在高溫下之植物荷爾蒙，作爲耐熱性指標，可考慮併入育種工作。此外，Zee *et al.*(1978)利用蛋白質電泳凝膠的技術分離種子蛋白質，藉以區別耐熱與熱敏感之結球白菜品系。雖然蛋白質及基因的分析目前尚未達成熟利用在逆境育種技術上，但這方面的技術將爲未來的育種工作提供一便捷、有力、直接的工具。

植物耐寒生理與篩選耐寒品系

寒害(chilling injury)，一般溫度介於0℃～15℃之間使植物造成傷害的溫度。作物對低溫的敏感性，影響其種子萌芽、幼苗生長、成株發育、產量與品質。篩選耐低溫萌芽之番茄(Scott and Johnes, 1982)，胡瓜(Kalloo and Banerjee, 1986)，甜瓜(Hutton and Loy,1985)，大豆(Szyrmer and Sacaepanska, 1982) 及菜豆(Dickson, 1971)等品系均已有報導。當種子浸濕後，細胞膜從脫水、不規則狀況重組成選擇性半透性膜，若此時遭受低溫逆境，細胞內物質將加速滲出(Simon *et al.*, 1972)。因此電導度法可輔助篩選耐寒萌芽之作物品系，若能同時使用溫度梯度盤(thermogradient plate)更能節省篩選龐大種源之時間、空間與勞力。

植株遭受寒害時，呼吸作用率增加 (Lepold and Musgrare, 1979)。此種刺激呼吸作用速率增加是經由類似氰氨之電子轉移途徑，而並不是產生ATP。此種調適可能與回收還原態之核酸及產生熱能有關(Laties, 1982)。寒害抑制光合作用，在有光線及缺水情況下，更加速其爲害。低溫導致光合作用系統 II 受損及碳固定酵素之活化能降低均與低溫降低光合作用率有關(McWilliam and Ferran, 1974; Smillie and Nott, 1979)。

低溫影響植物細胞膜的組成，結構及膜上有關酵素之活性、構造及機能曾被廣泛的深入研究，做爲探討造成低溫傷害與增加耐寒性的生理機制 (Markhart III, 1986)。增加細胞膜脂肪酸的

不飽合程度，可降低"脂相轉變期"(lipid phase transition)的溫度。寒帶生長的植物有較高的不飽合脂肪酸，且耐寒植物較對低溫敏感的植物有較高的飽合脂肪酸／不飽合脂肪酸比值，(Lyons and Breidenbach, 1979)。明顯受到低溫影響的酵素，大多與細胞膜有關。Arrhenius 作圖，分析低溫敏感作物的與膜關聯的酵素活性，隨溫度的變化情形，顯示出一個斷折點(break point)。此斷折點的溫度與膜從液晶狀態到凝膠狀態之轉相點有相同的溫度。然而耐寒品種此斷折點不存在，或在較低的溫度。雖然目前對增加飽合脂肪酸在耐寒之重要性仍有爭議，但利用electron spin resonance (ESR)及differential spin resonance (DSR) 及differential scanning calorimetry (DSC)等技術瞭解種源中品系間Arrhenius plot 之斷折點，將可輔助在田間篩選耐寒品系之成果。此外，Patterson *et al.*, (1977)利用導電度法篩選西番蓮科的耐寒性，從雜交工作顯示耐寒性的程度是基因量(gene dose)的反應。patterson and Graham (1977)發現野生番茄中存在差異顯著的耐寒性，且對低溫的適應性與原生質流的速率相關。因此導電度法與原生質流法，可併入育種工作評估植物的耐寒性。此外利用同功異構酶做爲番茄種間雜交培育成耐寒植株之篩選標記，也有報導(Vallejos and Tanksley, 1983)。

許多報導指出將溫度逐漸下降；能增加植物耐寒性－冷馴化。冷馴化期間改變脂肪酸的組成(St. John and Christiansen, 1976)，調整根系對水份的通透性(Markhart Ⅲ, 1986)，均與其增加植物耐寒性有關係。考量耐寒育種的目的，評估作物冷馴化能力與耐寒性的關係，可考慮合併到育種計畫中。

植物抗凍性生理與篩選抗凍品系

在控制溫度下降速率的情況下，植物體內有二種冰結晶的方式－細胞間隙結冰 (extracellular)及細胞內結冰(intracellular)。當溫度快速下降，例如4℃/分鐘，或者更快，將會造成細胞內結冰。通常植物細胞發生細胞內結冰，既無法再成活。在自然界溫度下降是比較緩慢的，因此冰大都在細胞間隙或組織表面形成，造成細胞間隙結凍。如果讓細胞間隙結冰先發生，則可避免細胞內結冰發生。在實驗室操作時，通常在-1℃時，加上小片冰誘導細胞間隙結凍，以模擬在大自然情況下,冰在組織形成的模式。在大自然中則取決於植物形成冰核的能力(ice-nucleating ability)與外界環境中冰核形成物質，(例如，某些細菌、離子、灰塵等)將會影響是否形成細胞間隙結冰。

當細胞間隙冰結晶形成時，細胞內水分擴散到細胞間隙，冰結晶繼續增大，同時也促使細胞內失水 (dehydration)。此種細胞脫水雖然使細胞液濃度相對增加，降低細胞內凝固點，避免細胞內冰結晶的形成；但也加諸細胞內滲透逆境(osmotic stress)與機械逆境(mechanical stress) (由於冰結晶的形成與細胞的收縮)。能抵抗細胞間隙結晶所造成的逆境，可能是在大自然下許多植物抗凍害而成活的重要方法。儘管如此，細胞間隙結冰超過某一冷溫的極限也會誘導細胞內結冰使細胞死亡。

通常細胞液很少在水的凝固點結冰，通常會在其細胞液凝固點下才結冰。取決於植物種類，冰核形成的能力與環境因子，有些植物能達-40℃或-270℃還不結冰。此種現象稱爲超冷卻(supercooling)。冰核形成的能力依植物物種與不同器官、組織而不同。當溫度下降緩慢，超冷卻的程度降低。減少冰核子(ice nucleators)或增加細胞液的濃度可誘導一些超冷卻的程度、使細胞藉

避免冰晶形成而成活於低溫。但當細胞已處在超冷卻情況下，所冒的風險也相對提高，一旦有些微冰核子侵入，則不可避免的發生細胞內結冰而使細胞死亡。

通常草本植物經不起-10℃～-15℃的低溫。但在馴化環境下，某些植物抗凍性顯著增加，例如某些多年生草類能成活低溫達-40℃，而馬鈴薯(Chen and Li, 1976 ; 1980)。甘藍(Kohn and Levitt, 1965)，豌豆(Swenson and Murray, 1983)，菊花(Bannier and Stepokus,1976)，僅能增加些微抗凍性。儘管如此，增加幾度的抗凍性，往往可以決定此作物是否可渡過溫度逆境與栽培的緯度。冷馴化需要較長時間，但去冷馴化是非常快速的。通常低溫與短日提供最佳冷馴化的環境(Chen and Li, 1986)，光週期與光强度可加强低溫誘導某些植物增加抗凍性的效果 (Kohn and Levitt, 1965)。冷馴化期間醣類(Chen and Li, 1980)，澱粉(Levitt, 1980)，荷爾蒙(Carter and Brenner, 1985)，脂質飽合度(Chen and Li, 1980)，細胞壁厚度(Huner *et al.*,1981)，細胞膜流動性(Steponkus, 1979)，核酸及蛋白質(Tseng and Li, 1987)的改變均有報導，且與增加抗凍性有密切的關係。

植物冷馴化過程是一複雜的生理與生化反應，冷馴化誘導增加植物抗凍性的機制，目前尚無定論。然而，篩選種源中高冷馴化能力之品系，在菠菜、馬鈴薯、番茄、杜鵑、玫瑰、柑橘等園藝作物都有報導(Sakui, 1987)。所採用的方法除了田間觀察法外，導電度法及TTC法是最常採用之評估根據。此外，Ninhydrin法，電阻法，及DTA法也常用在果樹等木本植物測定經結凍後之活力(Stushnoff, 1972)。最近 Sundbom *et al.*, (1982)以葉綠體之螢光反應做爲馬鈴薯雜交工作，選拔高抗凍性品系的依據。Swaaij *et al.*, (1985;1987)以細胞內脯氨酸的含量做爲篩選高馴化能力之馬鈴薯品系。

結　　論

每一作物有其最適當之生長溫度。作物對溫度的反應，依其生長發育階段、基因型與栽培管理而有所差異。目前大多數抗逆境之育種工作，均在自然田間進行篩選，進一步在不同時間、區域進行後代測試。由於外表型或產量是由許多外在因子、內在因子相互影響的結果，因此選拔高產量之外表型植株，很可能喪失許多耐逆境之基因型。雖然許多生理、生化上的研究報導尚不能區別作物對溫度逆境反應的因果關係，但一些生理反應可做爲作物育種工作上選拔耐逆境品系的依據，且可加速育種工作的完成。

利用組織培養，以細胞的層次施以不同溫度逆境，篩選耐逆境的colone，亦有許多的研究報導(Marshall *et al.*,1982)。細胞培養的材料具有節省勞力、時間、便捷生理及生化上分析之優點。新的生物技術，例如原生質融合等操作，亦可合併到耐逆境作物之育種工作。耐逆境基因的分離，選殖與構築工作，目前世界各地也積極研究中。利用基因工程轉移耐逆境基因到園藝作物上，是將來可行之育種途徑。

參 考 文 獻

1.Banner, L. J. and P. L. Steponkus. 1976 Cold acclimation of chrysanthemum callus cultures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 101:409-412

2.Barton, K. A. and W. J. Brill. 1983 Prospects in plant genetic engineering. Science 219:671-676.

3.Bjorkman, O., H. A. Mooney and J. Ehleringer. 1975 Photosynthetic responses of plants from habitats with contrasting environments. Carnegie Instit. Washington, Yearb. 74:743-759.

4.Bjorkman, O., J. Boynton and J. Berry. 1976 Comparison of the heat stability of photosynthesis, chloroplast membrane reactions, plotosynthetic enzymes, and soluble protein in leaves of heat-adapted C_4 species. Carnegie Inst.Washington Yearb. 75:400-407.

5.Bjorkman, O., M. R. Badger and P. A. Armond. 1980 Response and adaptation of photosynthesis to high temperature. p. 233-249. In:Turner and P. J. Kramer(eds.), Adaptation of Plants to Water and High Temperature Stress. John Wiley and Sons, New York.

6.Boyer, J. S. 1982 Plant productivity and environment. Science 218:443-448.

7.Burke, M. J., L. V. Gusta, H. A. Quamme, C. J. Weiser, and P. H. Li. 1976 Freezing and injury in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. 27:507-528.

8.Carter J. V. and M. L. Brenner. 1985 Plant growth regulators and low temperature stress. p. 418-443. In: Pharis R, Read D (eds.), Encyclopedia of Plant Physiology, New Series, Vol 11, New York: Springer-verlag.

9.Chen., H. H. and P. H. Li. 1980a Characteristics of cold acclimation and deacclimation in tuber-bearing *Solanum* species. Plant Physiol. 65:1146-1148.

0.Chen, H. H. and P. H. Li. 1980b Biochemical changes in the tuber-bearing *Solanum* species in relation to frost hardiness during cold acclimation. Plant Physiol. 66:416-421.

1.Chen, P. M. and P. H. Li. 1976 Effect of photoperiod, temperature and certain growth regulators on frost hardiness of *Solanum* species. Bot. Gaz. 137:105-109.

2.Cole, F. D. 1969 Ph. D. Dissertation, Univ. of Arizona.

3.Dickson, M. H. 1971 Breeding bean (*Phaseolus vulgaris* L.) for improved germination under unfavorable low temperature conditions. Crop Sci 11:848-852.

4.El Admadi, A. B. and M. A. Stevens. 1979 Reproductive responses of heat tolerant tomatoes to high temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 104:686-691.

5.El Hassan, M. O. M. 1985 Selection strategies for high temperature tolerance in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), Diss. Abstr. Int. B, 46, 1B.

6.Fezer, S. O. and E. Schwarzbach. 1978 Hardiness of North American barley and other cereals as measured by electrical impedance at the coleoptile stage. Z. Pflanzenzucht. 80:162-165.

7.Hauptmann, R. M. and J. M. Widholm. 1982 Cryostorage of cloned amino acid ana-

log-resistant carrot and tobacco suspension cultures. Plant Physiol. 70:30-34.

18.Hayden, R. E., L. Dionne, and D. S. Fenson. 1972 Electrical impedance studies of stem tissue of *Solanum* clones during cooling. Can. J. Bot. 50:1547-1554.

19.Hudson, M. A. 1961 The limitations of a cut leaf test for assessing the frost resistance of the tuber-bearing *Solanums*. Euphytica 10:169-179.

20.Huner, N. P. A., J. P. Palta, P. H. Li, and J. V. Carter. 1981 Anatomical changes in leaves of puma rye in response to growth at cold-hardening temperatures. Bot. Gaz. 142:55-62.

21.Hutton, M. G. and Loy, J. B. 1985 Evaluation of *Cucumis melo* plant introductions for cold germinability. HortScience. 20 (Abstr.) 190.

22.Ingram, D. L. and D. W. Buchanan. 1984 Lethal high temperatures for roots of three citrus rootstocks. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 109:189-193.

23.Kohn, H. and J. Levitt. 1965 Frost hardiness studies on cabbage grown under controlled conditions. Plant Physiol. 40:476-480.

24.Krause, G. H. and K. A. Santarius. 1975 Relative thermostability of the chloroplast envelope. Planta 127:285-299.

25.Laties, G. G. 1982 The cyanide-resistant, alternative path in higher plant respiration. Annu. Rev. Plant Physiol. 33:519-556.

26.Lepold, A. C., and M. E. Musgrave. 1979 Respiratory changes with chilling injury of soybeans. Plant Physiol. 64:702-705.

27.Lester, G. 1985 Leaf cell membrane thermostabilities of *Cucumis melo*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110:506-509.

28.Levitt, J. 1956 The hardiness of plants. Academic Press, New York.

29.Levitt, J. 1980 Response of plants to environmental stresses. 2nd ed, Vol 1, Academic Press, New York.

30.Lewis, C. F. and M. N. Christiansen. 1981 Breeding plant for stress environment. p. 151-177. In: K. J. Fray (ed.), Plant Breeding. Vol. 2. The Iowa State University Press, Ames.

31.Larsen, A. 1978 Freezing tolerance in grasses. Meldinger fra Norges landbrukshogskole. 57(23):1-56.

32.Li, P. H. 1984 Sub-zero temperature stress physiology of herbaceous plant. Hort. Rev. 6:337-417.

33.Li, P. H., J. P. Palta, and H. H. Chen. 1979 Freezing stress in potato. p. 291-303. In: J. M. Lyons, D. Graham and J. K. Raison (eds.), Low temperature stress in crop plant. Academic Press, New York.

34.Lou, Y. S. 1989 Effect of heat acclimation on heat tolerance and protein synthesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). M. S. Thesis, National Chung-

Hsing Univ.

35.Lyons, J. M. and R. W. Breidenbach. 1979 Strategies for altering chilling sensitivity as a limiting factor in crop production. p. 179-196. In: H. W. Mussell and C. Staples (eds.), Stress physiology in crop plants. John Wiley & Sons, New York.

36.Markhart III, A. H. 1986 Chilling injury : a review of possible causes. HortScience 21:1329-1333.

37.Marsh, L. E., D. W. Davis and P. H. Li. 1985 Selection and inheritance of heat tolerance in the common bean by use of conductivity. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 110 :680-683.

38.Marshall, H. G. 1982 Breeding for tolerance to heat and cold. p. 47-70. In: M. N. Christiansen and C. F. Lewis (eds.), Breeding plants for less favorable environments. John Willey & Sons, New York.

39.Martineau J. R., J. H. Williams and J. E. Specht. 1979 Temperature tolerance in soybeans.II. Evaluations of segregating populations for membrane thermostability. Crop Sci. 19:79-81.

40.McDaniel R. G. 1982 The physiology of temperature effects on plants. p.13-45. In : M. N. Christiansen and C. F. Lewis (eds.), Breeding plants for less favorable environments. John Willey & Sons, New York.

41.McWilliam, J. R. and P. J. Ferrar. 1974 Photosynthetic adaptation of high plants to thermal stress, p. 467-476. In: R. L. Bieleski, A. R. Ferguson, and M. M. Cresswell (eds.). Mechanisms of regulation of plant growth.Roy.Soc. New Zealand Bul. 12.

42.Quinn, P. J. and W. P. Williams. 1985 Environmentally induced changes in chloroplast membranes and their effects on photosynthetic function. p.1-47. In:J.Barber and N.R. Baker (eds.), Photosynthetic mechanisms and environment. lsevier Science Publishers, B. V., Amsterdam, The Netherlands.

43.Sakai, A. and W. Larcher. 1987 Frost survival of plants. Springer-Verlag, New York.

44.Santarius, K. A. and M. Muller. 1979 Investigations on heat resistance of spinach leaves. Planta 146:529-538.

45.Santarius, K. A. 1975 Sites of heat sensitivity in chloroplast and differential inactivation of cyclic and noncyclic photophosphorylation by heating. J. Thermal Biol. 1:101-107.

46.Scott, S. J. and R. A. Johns, 1982 Low temperature seed germination of *Lycopersicon* spp. evaluated by survival analysis. HortScience 17 (Abstr.) 477.

47.Shen, Z. Y. and P. H. Li. 1982 Heat adaptability of the tomato. HortScience 13: 924-925.

48.Siminovitch, D. and D. R. Briggs. 1953 The validity of plasmolysis and desiccation test for determining the frost hardiness of bark tissue. Plant Physiol. 28: 15-24.

49.Smillie, R. M. and R. Nott. 1979 Assay of chilling injury in wild and domestic tomatoes based on photosystem activity of chilled leaves. Plant Physiol. 63: 796-801.

50.St. John, J. B. and M. N. Christiansen. 1976 Inhibition of linolenic acid synthesis and modification of chilling resistance in cotton seedlings. Plant Physiol 57:257-259.

51.Steponkus, P. L. 1984 Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:543-584.

52.Stushnoff, C. 1972 Breeding and selection methods for cold hardiness in deciduous fruit crops. HortScience 7:10-13.

53.Sukumaran, N. P. and C. J. Weiser. 1972 An excised leaflet test for evaluating potato frost tolerance. HortScience 7:467-468.

54.Sundbom, E., M. Strand, and J. -E. Hallgren. 1982 Temperature-induced fluorescence changes. A screening method for frost tolerance of potato (*Solanum* sp.). Plant Physiol. 70:1299-1302.

55.Swaaij, A. C., E. Jacobsen and W. J. Feenstra. 1985 Effect of cold hardening, wilting and exogenously applied proline on leaf proline content and frost tolerance of several genotypes of *Solanum*. Physiol. Plant 84:477-483.

56.Swensen, J. B. and G. A. Murray. 1983 Cold acclimation of field peas in a controlled environment. Crop Sci. 23:27-30.

57.Szyrmer, J. and K. Sacaepanska. 1982 Screening of soybean genotypes for cold tolerance during germination. Z. Pflanzenphysiol. 88:255-258.

58.Tao, Dali, P. H. Li, and J. V. Carter. 1983 Role of cell wall in freezing tolerance of cultured potato cells and their protoplasts. Physiol. Plant. 58:527-532.

59.Towill, L. E. and P. Mazur. 1974 Studies on the reduction of 2,3, 5-triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue culture. Can. J. Bot. 53:1097-1102.

60.Tseng, M. J. and P. H. Li. 1987 Changes in nucleic acid and proteins during induction of cold hardiness. In: P. H. Li. (ed.), Proceeding of cold hardiness. R. Lissa, New York.

61.Vallejos, C. E. and S. D. Tanksley. 1983 Segregation of isozyme markers and cold tolerance in an interspecific backcross of tomato. Theor. Appl. Genet. 66 : 241-247.

62.Warrag, M. O. A. and A. E. Hall. 1983 Reproductive responses of cowpea to heat

stress: genotypic differences in tolerances in tolerance to heat at flowering. Crop Sci. 23:1088-1092.

.Widholm, J. M. 1972 The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determing viability of cultured plant cells. Stain Technol. 47:189-194.

.Zee, S. -Y., M. -Y. Tso and W. -W. Tso. 1978 Electrophoretic analysis of seed proteins of heat-tolerant and heat-sensitive cultivars of chinese cabbage. HortScience. 13:547-548.