

# 高加索三叶草对不同降温模式的抗寒生理响应

牟丹<sup>1</sup>, 杨帆<sup>1</sup>, 卡着才让<sup>2</sup>, 西合多杰<sup>2</sup>, 徐晨晨<sup>1</sup>, 谢久祥<sup>1</sup>, 李希来<sup>1</sup>

(1. 青海大学牧业学院, 青海 西宁 810016; 2. 河南蒙古族自治县自然资源局林业站, 青海 河南 811599)

**摘要:**为探究高加索三叶草(*Trifolium ambiguum*)对不同降温模式的生理响应,本研究通过非冷驯化降温(Non-cold Acclimation, NA)和冷驯化降温(Cold-Acclimation, CA)对高加索三叶草进行-6℃胁迫处理,观察叶片抗冻形态表现并测定6项生理指标,利用主成分分析筛选评价高加索三叶草在不同降温模式下的抗寒性的生理指标。结果表明:NA组和CA组的叶片在-6℃处理2h后均能保持正常形态,且绝大部分叶片在24h内能恢复正常;恢复7d后,所有参试植株均重新长出新的叶片;随着冷冻胁迫时间的延长,CA组的丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、可溶性蛋白含量和可溶性糖含量均显著高于NA组;过氧化物酶(POD)活性、MDA含量和可溶性糖含量可作为NA组的抗寒指标,可溶性蛋白含量、SOD活性和叶绿素含量可作为CA组的抗寒指标。综上所述,高加索三叶草对于不同降温模式能启动相应的耐寒生理响应,具有较强的抗寒能力,具备在高寒草地引种栽培的潜力。

**关键词:**高加索三叶草;引种栽培;抗寒性;降温模式

**中图分类号:**S541 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2022)03-0125-07

**DOI:** 10.13817/j.cnki.cyycp.2022.03.015



低温对于分布在较高纬度或高海拔的多年生植物是一种不可避免的环境胁迫<sup>[1]</sup>。冷驯化被认为是许多温带、寒带植物发展耐寒性和抗冻性的一个典型过程<sup>[2]</sup>,因为突然的霜冻会对植物造成相当大的损害。青藏高原气候严寒,植物生长期短,极端低温、倒春寒等灾害天气时有发生,导致植株低矮,甚至出现无法正常越冬、植株死亡的情况<sup>[3]</sup>。相关研究表明,青藏高原高寒地区冬春季节寒冷干燥,年积温较低等气候特点使牧草引种尤其是豆科牧草的引种较为困难<sup>[4]</sup>。

高加索三叶草(*Trifolium ambiguum*)原产于高纬

度的东欧和西亚的高海拔(2 750 m)地区,其生境类型多样,可在林草过渡带和流石滩生长<sup>[5]</sup>。高加索三叶草具有二倍体、四倍体和六倍体等多种核型,多倍性增加了其抗逆性<sup>[5]</sup>。另外,高加索三叶草具有密集的根状茎系统<sup>[6]</sup>,这几种因素使得高加索三叶草具有极强的抗逆能力,包括耐阴、抗病、抗涝、抗旱、抗寒、抗冻融和抗杂草等特性<sup>[6-11]</sup>。近几十年来,澳大利亚、新西兰、美国和加拿大等国家对该三叶草进行了一系列适应性和利用价值的试验与评价,认为高加索三叶草是许多寒冷和干旱地区不适宜种植红三叶和白三叶地方唯一可以种植并在各方面表现优良的三叶草种<sup>[12]</sup>。高加索三叶草的寿命非常长,一经建植,可永续利用,放牧和收割<sup>[9,13]</sup>。且由于其高的覆盖性、固氮特性和饲用价值,近年来已被欧美等国家作为活地被物(living mulch)<sup>[14]</sup>,大面积用于半人工草地建植<sup>[15]</sup>和生态修复<sup>[16]</sup>。

2015年,我们将高加索三叶草从新西兰引种到青海省河南蒙古族自治县(简称河南县)3 500~3 700 m的试验地,发现其在野外均能成功越冬,并在野外形

**收稿日期:**2021-01-08; **修回日期:**2021-11-24

**基金项目:**青海省科技计划项目(2017-ZJ-788);国家国际科技合作专项项目(2015DFG31870);高等学校学科创新引智计划项目(D18013)

**作者简介:**牟丹(1989-),女,四川盐亭县人,在读博士。

E-mail:moudan1761@163.com

谢久祥为通信作者。

E-mail:xiejuxiangqh@163.com;

李希来为通信作者。E-mail:xilai-li@163.com

成了无性繁殖植株<sup>[17-18]</sup>。河南县气候严酷,冬季严寒,最低气温可达 $-37.2^{\circ}\text{C}$ (1995年1月5日)。且春秋季节昼夜温差大,时有零下低温发生,对正处于返青或正常生长的高加索三叶草造成一定的低温伤害<sup>[19]</sup>。据笔者前期的物候观测,至11月初,高加索三叶草在河南县才出现冻萎状态,说明其抗寒性很强,足以适应河南县的低温环境。目前,植物对低温胁迫的生理响应研究多为单一模式降温后的生理观测,如适温培养后进行低温胁迫或冷驯化后进行低温胁迫<sup>[20-23]</sup>,而对同一物种在遭遇不同降温模式的低温胁迫后其生理响应的比较研究报道较少。本研究以高加索三叶草种子实生苗为材料,利用低温人工气候箱模拟高加索三叶草在春秋季节遭遇的零下低温,即通过非冷驯化降温 and 冷驯化降温两种方式对高加索三叶草植株进行 $-6^{\circ}\text{C}$ 冷冻胁迫,比较叶片在不同降温模式下的形态和生理变化,并应用主成分分析法进行抗寒指标筛选,为研究高加索三叶草对不同降温模式低温胁迫的生理响应机制和扩大高加索三叶草在青藏高原的引种范围提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料为高加索三叶草的育成品种“蒙农三叶草1号”,其种子由内蒙古农业大学王明玖教授于2018年提供。

### 1.2 试验处理

2019年5至8月,在青海大学校内牧草试验地和草业科学系实验室进行。在含有混合基质的花盆中播种高加索三叶草种子,待长出幼苗,生长60 d以后,挑选长势相同且生长健康的幼苗,将其置于低温人工气候箱进行适应性培养30 d,模拟的生长条件为:20 $^{\circ}\text{C}$ 的日温、18 $^{\circ}\text{C}$ 的夜温、12 000 lx的光照强度、60%的湿度、12 h的光照周期。试验分为两组:非冷驯化降温组(Non-cold Acclimation, NA),冷驯化降温组(Cold-Acclimation, CA)。两个降温组除温度外,其余条件均与适应性培养下的条件相同,具体过程为:(1)NA组:由20 $^{\circ}\text{C}$ 未经4 $^{\circ}\text{C}$ 冷驯化直接降温至 $-6^{\circ}\text{C}$ 进行低温胁迫;(2)CA组:由20 $^{\circ}\text{C}$ 以2 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$ 梯度降温至4 $^{\circ}\text{C}/4^{\circ}\text{C}$ (日温/夜温)冷驯化处理18 d,再直接降温到 $-6^{\circ}\text{C}$ 进行低温胁迫。NA组和CA组于同一天

9:00开始进行 $-6^{\circ}\text{C}$ 冷冻胁迫处理,分别胁迫0、2、4、6 h后剪取叶片,立即置于液氮冷冻保存,用于高加索三叶草叶片的生理指标测定,每个处理组的各时间点样品均3个重复。

### 1.3 形态观察

冷冻胁迫试验完成后,NA组和CA组的植株均置于人工气候箱(温度10 $^{\circ}\text{C}$ 、光照强度4 000 lx、湿度60%、光周期12 h)进行恢复处理。观察4 $^{\circ}\text{C}$ 冷驯化、 $-6^{\circ}\text{C}$ 冷冻胁迫和10 $^{\circ}\text{C}$ 恢复后的叶片形态变化。

### 1.4 生理指标测定

所测定生理指标为:MDA含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白含量、POD活性、SOD活性和叶绿素含量。其中,MDA、可溶性糖和可溶性蛋白的含量测定参照Pu等<sup>[24]</sup>的方法;SOD和POD活性的测定参照Yang等<sup>[25]</sup>的方法;叶绿素含量测定参照He等<sup>[26]</sup>的方法。

### 1.5 数据处理

采用Excel 2016对数据进行整理,并绘制图表;运用SPSS 20.0进行单因素方差分析和主成分分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 高加索三叶草对不同降温模式的形态响应及叶片恢复情况

在冷驯化降温和非冷驯化降温处理过程中,高加索三叶草老叶和嫩叶的形态呈现出了不同的变化趋势,总体表现为经冷驯化降温处理的叶片更能适应冷冻胁迫,非冷驯化降温处理的叶片在冷冻胁迫下受损更严重,嫩叶相比于老叶不容易受损(表1)。

### 2.2 高加索三叶草对不同降温模式的生理指标响应情况

2.2.1 渗透调节物质含量变化 高加索三叶草在 $-6^{\circ}\text{C}$ 处理6 h内,随着胁迫时间的延长,NA和CA两组的MDA含量均呈上升趋势;NA组上升趋势缓慢,而CA组上升趋势较快(图1-A)。整个胁迫过程,CA组MDA含量显著高于NA组( $P<0.05$ )。冷冻胁迫6 h时,CA组MDA含量极显著高于NA组( $P<0.01$ )。表明不同降温模式均会导致高加索三叶草叶片MDA积累,从而使细胞遭受伤害。

随着胁迫时间的延长,NA组可溶性蛋白含量呈先上升后下降的趋势,CA组先下降再上升,两组可溶

表 1 高加索三叶草在不同降温模式下的叶片形态

Table 1 Theleaf morphology changes of Caucasian clover under different cooling modes

| 处理         | 恢复过程       | 冷驯化降温(CA)                             |              | 非冷驯化降温(NA)                      |              |
|------------|------------|---------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
|            |            | 老叶                                    | 嫩叶           | 老叶                              | 嫩叶           |
| 4℃冷驯化 18 d | 无          | 多数叶片正面颜色深绿色,背面变为浅紫色                   | 生长正常         | 未驯化                             | 未驯化          |
| -6℃胁迫 0 h  | 无          | 生长正常                                  | 生长正常         | 生长正常                            | 生长正常         |
| -6℃胁迫 2 h  | 无          | 少部分下垂、稍有受冻症状,多数叶片正常                   | 生长正常         | 少部分下垂、稍有受冻症状,多数叶片正常             | 生长正常         |
|            | 10℃恢复 24 h | 多数恢复正常                                | 生长正常         | 多数恢复正常                          | 生长正常         |
|            | 10℃恢复 7 d  | 同上                                    | 同上           | 同上                              | 同上           |
| -6℃胁迫 4 h  | 无          | 植株整体下垂,多数叶片明显受冻,少数叶片开始出现透明症状          | 生长正常         | 植株整体下垂,大多数叶片明显受冻,多数叶片开始出现透明症状   | 部分叶芽边缘出现透明症状 |
|            | 10℃恢复 24 h | 少数恢复正常                                | 生长正常         | 极少数恢复正常                         | 生长正常         |
|            | 10℃恢复 7 d  | 同上                                    | 同上           | 同上                              | 同上           |
| -6℃胁迫 6 h  | 无          | 植株整体下垂萎蔫,多数叶片明显受冻,有的出现透明症状,有的叶片边缘出现白霜 | 部分叶芽边缘出现透明症状 | 植株整体下垂萎蔫,大多数叶片明显受冻且整个叶片表面出现透明症状 | 部分叶芽表面出现透明症状 |
|            | 10℃恢复 24 h | 未恢复正常                                 | 生长正常         | 未恢复正常                           | 生长正常         |
|            | 10℃恢复 7 d  | 同上                                    | 同上           | 同上                              | 同上           |

性蛋白含量始终高于 0 h 时(图 1-B)。冷冻胁迫 4 h 时,CA 组达到最低值,仍显著高于 NA 组( $P < 0.05$ )。胁迫 6 h 时,CA 组和 NA 组含量差异最大,前者约为后者的 2.03 倍。表明不同降温模式均会使高加索三叶草叶片可溶性蛋白含量增加,以增强其质膜系统渗透调节能力,从而增强其抗寒能力,CA 组含量波动较大且始终显著高于 NA 组( $P < 0.05$ ),说明 CA 组的抗寒性表现更好。

冷冻胁迫 2 h 后,NA 组可溶性糖含量达到最低,

而 CA 组含量最高,后者约为前者的 2.79 倍(图 1-C)。但随着胁迫时间的延长,NA 组可溶性糖含量缓慢上升,6 h 时达到最高值;而 CA 组出现先下降后上升的趋势,4 h 时达到最低值。冷冻胁迫 6 h 内,CA 组含量极显著高于 NA 组( $P < 0.01$ )。表明不同降温模式对高加索三叶草叶片可溶性糖含量影响不同,NA 组可溶性糖含量变化不敏感,而 CA 组虽含量波动较大且始终显著高于 NA 组( $P < 0.01$ ),说明 CA 组的抗寒性表现更好。

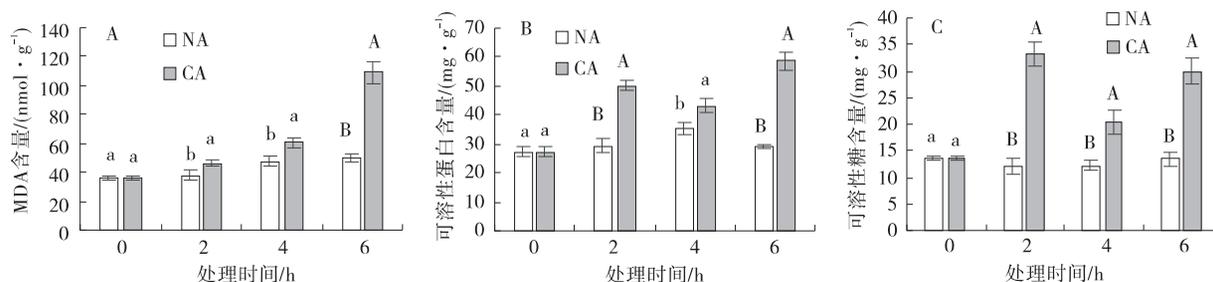


图 1 不同降温模式下高加索三叶草 MDA、可溶性蛋白、可溶性糖含量

Fig. 1 MDA, soluble protein and soluble sugar content in Caucasian clover under different cooling modes

注:同一指标的不同柱形图间不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ );同一指标的不同柱形图间不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )。下同

2.2.2 保护酶活性变化 随着冷冻胁迫的进行,NA 组 POD 活性呈上升趋势,6 h 时达到最高值,CA 组呈先上升再下降趋势,4 h 时达到最高值(图 2-A)。整个胁迫过程中,两组差异不显著( $P > 0.05$ )。表明不同

降温模式均会使高加索三叶草叶片 POD 活性增加,NA 和 CA 两组均具有较强的清除过氧化物的能力,说明 POD 活性对高加索三叶草植株抵抗不同方式的冷冻伤害均起着重要的作用。

冷冻胁迫后,NA和CA两组的SOD活性均随着时间的延长而呈上升趋势,且CA组始终显著高于NA组( $P < 0.01$ )(图2-B)。表明不同降温模式均会使

高加索三叶草叶片SOD活性增加,通过SOD来清除体内多余的活性氧来提升抗氧化能力,CA组SOD活性更高,说明CA组比NA组抗寒性表现更好。

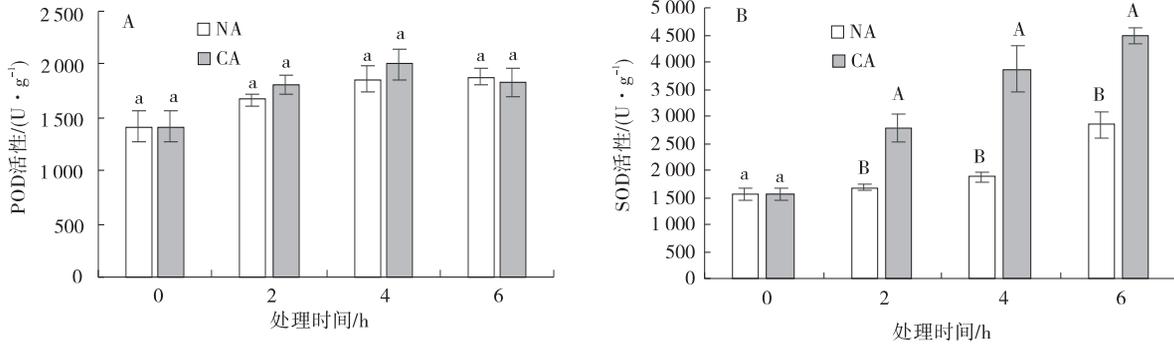


图2 不同降温模式下高加索三叶草POD、SOD活性

Fig. 2 POD and SOD activity in Caucasian clover under different cooling modes

2.2.3 叶绿素含量变化 冷冻胁迫后,NA和CA两组各时间点的叶绿素含量均高于0h时。NA组叶绿素含量随着胁迫时间的延长呈上升趋势,CA组呈先上升再下降趋势(图3)。冷冻胁迫前4h内,NA组显著低于CA组( $P < 0.05$ );但6h后,两组差异不显著( $P > 0.05$ )。表明不同降温模式处理均会使高加索三叶草叶片叶绿素含量增加。

中可溶性糖含量的系数绝对值最大。表明POD活性、MDA含量、可溶性糖含量对非冷驯化降温组的抗寒力贡献最大,因此可将POD活性和MDA含量作为核心指标,可溶性糖含量则为辅助指标。

表2 NA组高加索三叶草生理指标主成分分析

Table 2 Principal component analysis of physiological indexes of Caucasian clover in NA group

| 指标      | 主成分1   | 主成分2   |
|---------|--------|--------|
| MDA含量   | 0.333  | 0.116  |
| 可溶性蛋白含量 | 0.210  | -0.493 |
| 可溶性糖含量  | -0.051 | 0.544  |
| POD活性   | 0.333  | -0.133 |
| SOD活性   | 0.269  | 0.427  |
| 叶绿素含量   | 0.152  | 0.148  |
| 特征值     | 2.747  | 1.291  |
| 贡献率/%   | 45.777 | 21.519 |
| 累计贡献率/% | 45.777 | 67.797 |

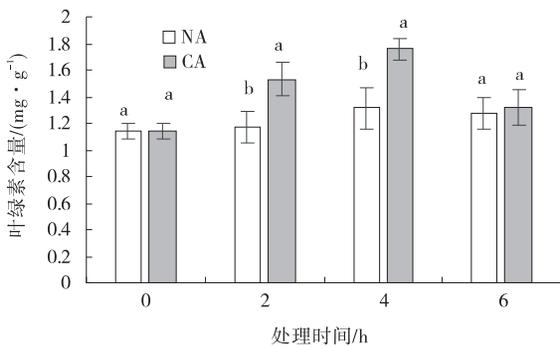


图3 不同降温模式下高加索三叶草叶绿素含量

Fig. 3 Chlorophyll content in Caucasian clover under different cooling modes

2.3 不同降温模式的抗寒生理指标筛选

通过对高加索三叶草在不同降温模式的生理指标进行主成分分析,根据系数的大小进一步筛选不同处理抗寒过程的主要生理指标。遵循特征值大于1的原则,提取出2个主成分。NA组前2个主成分的累积贡献率为67.797%,反映了6个指标的大部分信息,表明前2个主成分具有较强的代表性(表2)。主成分1的贡献率为45.777%,其中POD活性和MDA含量的系数绝对值最大;主成分2的贡献率为21.519%,其

CA组前2个主成分的累积贡献率为83.442%,反映了6个指标的绝大部分信息,表明前2个主成分具有很强的代表性,主成分1的贡献率为63.642%,其中可溶性蛋白含量和SOD活性的系数绝对值最大;主成分2的贡献率为19.800%,其中叶绿素含量的系数绝对值最大(表3)。表明可溶性蛋白含量、SOD活性和叶绿素含量对冷驯化降温组的抗寒力贡献最大,因此可将可溶性蛋白含量和SOD活性作为核心指标,叶绿素含量则为辅助指标。

表 3 CA 组高加索三叶草生理指标主成分分析

Table 3 Principal component analysis of physiological indexes of Caucasian clover in CA group

| 指标      | 主成分 1  | 主成分 2  |
|---------|--------|--------|
| MDA 含量  | 0.202  | -0.439 |
| 可溶性蛋白含量 | 0.245  | -0.200 |
| 可溶性糖含量  | 0.194  | -0.105 |
| POD 活性  | 0.212  | 0.374  |
| SOD 活性  | 0.242  | -0.067 |
| 叶绿素含量   | 0.141  | 0.673  |
| 特征值     | 3.819  | 1.188  |
| 贡献率/%   | 63.642 | 19.800 |
| 累计贡献率/% | 63.642 | 83.442 |

### 3 讨论

高加索三叶草原产亚欧大陆分界线的高加索地区,20 世纪初期后被引入世界各地,包括新西兰、澳大利亚、捷克斯洛伐克、加拿大和美国<sup>[5-6]</sup>。1985 年后,高加索三叶草逐渐被引种到北京、呼和浩特、赤峰、哈尔滨和青海省黄南州等地<sup>[17,27-29]</sup>。这些引种地区囊括了从接近海平面的区域到高海拔和高纬度地区的广大范围,高加索三叶草在这些区域都能生存并安全越冬<sup>[30]</sup>,说明该草具有广泛的生态位,在抗寒性方面具有卓越表现。关于高加索三叶草的抗寒机制,主要涉及物理和生理方面。如 Costin 等<sup>[7]</sup>曾报道高加索三叶草具有能抵抗冻融的机械作用,崔英<sup>[10]</sup>为了准确快捷的评价高加索三叶草的抗寒性,用到了抗寒生理生化指标评价法。然而,涉及响应低温的分子研究却鲜见报道,仅见牟丹等<sup>[32]</sup>运用二代转录组测序技术对其面临不同降温模的低温胁迫进行了分析,初步筛选到一些与抗寒相关的通路及基因。

从降温试验和恢复后的叶片形态变化来看,低温驯化有助于提高高加索三叶草的抗寒性。非冷驯化降温组和冷驯化降温组在 $-6^{\circ}\text{C}$ 处理 2 h 后,形态表现均为受冻不严重,且绝大部分叶片在 $10^{\circ}\text{C}$ 处理 24 h 后能恢复正常,说明高加索三叶草的抗寒性很强。非冷驯化降温组各个处理下高加索三叶草叶片受害程度均较冷驯化降温组受害严重,且不易恢复,这是符合常理的。但是,冷冻胁迫试验结束 7 d 后,所有的参试植株均重新长出新的叶片,说明高加索三叶草根颈芽恢复力也很强。

随冷冻胁迫时间的延长,非冷驯化降温组和冷驯化降温组 MDA 含量均呈上升趋势,后者显著高于前者,说明高加索三叶草叶片细胞在不同降温模式下均受到低温伤害,且在 $4^{\circ}\text{C}$ 冷驯化期间叶片就开始积累一定量的 MDA。两组 POD 和 SOD 活性在整体上均呈上升趋势,说明两组叶片均可通过提高保护酶活性来清除活性氧,并减少 MDA 对质膜的 2 次伤害,从而对细胞起到保护作用。此外,低温对冷驯化降温组的 SOD 活性影响尤其大,说明高加索三叶草在冷驯化期间就迅速启动了抗氧化酶系统。

随冷冻胁迫的进行,非冷驯化降温组可溶性蛋白含量先增加再降低,可溶性糖含量呈缓慢上升的趋势,推测高加索三叶草叶片在面临突然的零下低温,为了抵御严寒严重消耗可溶性糖,同时为了及时平衡渗透压而不断合成可溶性蛋白;随着胁迫的进行,部分可溶性蛋白转化成可溶性糖,使三叶草更好地适应低温。这与李瑞雪等<sup>[28]</sup>在木兰科植物上的研究结果类似。冷冻胁迫期间,非冷驯化降温组可溶性糖含量虽然低于胁迫 0 h 时的含量,但差异不显著,与 Wang 等<sup>[29]</sup>对菊花进行 $-4^{\circ}\text{C}$ 低温处理 4 h 后的结果一致。冷驯化降温组的可溶性蛋白含量和可溶性糖含量在整个冷冻胁迫期均呈先下降再上升的趋势,含量均显著高于非冷驯化降温组,且波动更大。董爱玲等<sup>[30]</sup>也报道了低温锻炼使茄子幼苗可溶性糖和可溶性蛋白质含量上升,升高幅度明显大于未经低温驯化处理组。这一结果说明冷驯化可能启动了高加索三叶草中冷诱导蛋白的表达,使叶片细胞中可溶性蛋白累积,并促进其降解为可溶性糖,两者起协同作用,增强植株抵御低温的能力;同时也证实了前人的研究结果,即植物冷驯化后涉及许多代谢物质的变化,导致蛋白质和兼容溶质的积累<sup>[31]</sup>。

整个冷冻胁迫期内,非冷驯化降温组和冷驯化降温组的叶绿素含量始终高于胁迫 0 h 时的含量,且两组差异不显著。可以看出无论是经非冷驯化降温还是冷驯化降温,高加索三叶草遭遇低温后均能保持较高的叶绿素含量。陈凯等<sup>[37]</sup>研究也表明,在 $0^{\circ}\text{C}$ 低温情况下,随着低温胁迫时间的延长,望天树幼苗叶片中叶绿素含量持续增加。王秀田等<sup>[32]</sup>发现冬小麦 DN1 经室内低温驯化后,在 $-4^{\circ}\text{C}$ 时叶绿素 a 和叶绿素

b含量均高于对照组。因此,冷冻胁迫后高加索三叶草叶绿素含量的增加佐证了其强大的抗寒性。

植物的抗寒性是一系列生理生化特征综合作用的结果,各生理指标相互作用,相互影响,不易凸显某一指标的重要性。大量研究表明,主成分分析法可有效用于指标的筛选<sup>[34-36]</sup>。本研究中,高加索三叶草响应不同降温模式的生理指标主成分分析表明:POD活性、MDA含量和可溶性糖含量可作为快速鉴定高加索三叶草响应非冷驯化降温过程的生理指标;可溶性蛋白含量、SOD活性和叶绿素含量可作为快速鉴定高加索三叶草响应冷驯化降温过程的生理指标。

#### 4 结论

非冷驯化降温组和冷驯化降温组在-6℃处理2h后均受冻不严重,且绝大部分叶片在24h内能恢复正常;恢复7d后,所有的参试植株均重新长出新的叶片,表明高加索三叶草耐受低温的能力较强。POD活性可作为评价非冷驯化降温过程抗寒性的核心指标,可溶性糖含量和叶绿素含量作为辅助指标;可溶性蛋白含量可作为评价冷驯化降温过程抗寒性的核心指标,叶绿素含量和可溶性糖含量作为辅助指标。高加索三叶草具有较强的抗寒能力,具备在高寒草地引种栽培的潜力。

#### 参考文献:

- [1] Hao X Y, Tang H, Wang B, *et al.* Integrative transcriptional and metabolic analyses provide insights into cold spell response mechanisms in young shoots of the tea plant [J]. *Tree Physiology*, 2018, 38(11): 1655-1671.
- [2] Thomashow M F. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms[J]. *Annual review of plant biology*, 1999, 50(1): 571-599.
- [3] 赵春旭, 马祥, 董文科, 等. 低温胁迫下不同青海野生草地早熟禾的转录组比较分析[J]. *草地学报*, 2020, 28(2): 305-318.
- [4] 蒲小鹏, 董世魁, 阎宝生, 等. 高寒地区豆科牧草引种试验[J]. *中国草地*, 2001, 23(3): 18-22+26.
- [5] Bryant W G. Caucasian clover (*Trifolium ambiguum* Bieb.): a review [J]. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science*, 1974, 40(1): 11-19.
- [6] Speer G S, Allinson D W. Kura clover (*Trifolium ambiguum*): Legume for forage and soil conservation [J]. *Ecological Botany*, 1985, 39(2): 165-176.
- [7] Costin A B, Wimbush D J. Reaction of species to adverse conditions in the Snowy Mountains [J]. *Field Station Records*, 1963, 2: 19-54.
- [8] Allinson D W, Speer G S, Taylor R W, *et al.* Nutritional characteristics of kura clover (*Trifolium ambiguum* Bieb.) compared with other forage legumes [J]. *The Journal of Agricultural Science*, 1985, 104(1): 227-229.
- [9] Taylor N, Smith R. Kura clover (*Trifolium ambiguum* Bieb.) breeding, culture, and utilization [J]. *Advances in Agronomy*, 1998, 63: 153-178.
- [10] 崔英. 三种三叶草的耐盐性和抗寒性研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2006.
- [11] 殷秀杰, 王明玖, 石凤翎, 等. 三种三叶草幼苗期抗旱性差异的研究[J]. *中国草地学报*, 2008, 30(2): 68-73.
- [12] 殷秀杰, 王明玖, 石凤翎. 高加索三叶草和白三叶幼苗期抗旱性生理研究[J]. *内蒙古农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 25(2): 119-123.
- [13] Peterson P, Sheaffer C, Jordan R, *et al.* Responses of kura clover to sheep grazing and clipping: I. Yield and forage quality [J]. *Agronomy Journal*, 1994, 86(4): 655-660.
- [14] Abberton M T, Marshall A H. Progress in breeding perennial clovers for temperate agriculture [J]. *The Journal of Agricultural Science*, 2005, 143(2-3): 117-135.
- [15] Peeters A, Parente G, Le Gall A. Temperate legumes: key-species for sustainable temperate mixtures [C]// *Grassland Science in Europe*, 2006, 11: 205-220.
- [16] Bekuzarova S A. Restoration of biodiversity in mountain plant communities by means of selection [J]. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology*, 2014, 8(1): 137-143.
- [17] 花木崙. 世界最大生态系统青藏高原高寒草地退化原因最新解密[N]. *青海日报*, 2017-11-15(1).
- [18] 黄涵, 李亚光. 中外专家认为: 种植豆科植物有助应对高寒草地退化问题[N]. *新华网*, 2017-12-01(1).
- [19] 牟丹, 杨帆, 卡着才让, 等. 高加索三叶草响应不同降温模式低温胁迫的代谢组学分析[J]. *草地学报*, 2021, 29(9): 1877-1884.
- [20] 丁红映, 田宇豪, 李青, 等. 马铃薯低温胁迫的生理响应及耐寒性综合评价[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(6): 1165-1170.
- [21] 杨航宇, 刘长仲. 低温胁迫对4种卫矛属植物抗寒生理指标的影响[J]. *草原与草坪*, 2020, 40(2): 92-98.

- [22] 余涵霞,姜朝阳,王纯,等. 优质牧草旋扭山绿豆对低温胁迫的生理响应及其耐寒性快速鉴定[J]. 热带亚热带植物学报,2019,27(6):649-658.
- [23] 杨芮,颜超君,户帅雅,等. 红掌对低温胁迫的生理响应及耐冷性评价[J]. 福建农业学报,2018,33(11):1136-1144.
- [24] Pu Y, Liu L, Wu J, *et al.* Transcriptome profile analysis of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) in response to freezing stress, reveal potentially connected events to freezing stress[J]. International journal of molecular sciences,2019,20(11):2771.
- [25] Yang F, Wang Y, Wang J, *et al.* Different eco-physiological responses between male and female *Populus deltoides* clones to waterlogging stress[J]. Forest Ecology and Management,2011,262(11):1963-1971.
- [26] He Y, Fu Q G, Zhu Z J. Effects of Chilling under Low Irradiance on Photosynthesis, Chlorophyll Fluorescence Quenching and Light Allocation in Pepper Leaves [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2013, 27 (4) : 479-486.
- [27] 张玉发. 优良的绿化和水土保持豆科植物—甜蜜三叶草 [J]. 草业科学,1993,10(6):54-55.
- [28] 刘国荣,王明玖. 高加索三叶草引种栽培研究[C]//内蒙古草业研究—内蒙古草原学会第九届代表大会学术论文集. 呼和浩特:内蒙古人民出版社,2004:215-219.
- [29] Wang K, Bai Z, Liang Q, *et al.* Transcriptome analysis of chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*) in response to low temperature stress [J]. BMC Genomics, 2018,19(1):319.
- [30] Margaret zorin, Hely F W. Importance of homologous strain of *rhizobiumtrifolium* in the domesticaion of hexaploid *Trifolium ambiguum* Bieb. [J]. Fifth Australian legume nodulation nodulation conference,1975,16-19.
- [31] Costin A B, Wimbush D J. Reaction of species to adverse conditions in the Snowy Mountains [J]. Herbage Abstr, 1964,1836.
- [32] 牟丹,马戈亮,卡着才让,等. 不同降温模式下高加索三叶草的转录组比较分析[J]. 草地学报,2021,29(7):1386-1396.
- [33] 李瑞雪,金晓玲,胡希军,等. 低温胁迫下 6 种木兰科植物的生理响应及抗寒相关基因差异表达[J]. 生态学报,2019,39(8):2883-2898.
- [34] 彭忠,王岚,徐芬,等. 基于主成份分析的园林植物耐荫性指标研究[J]. 草原与草坪,2016,36(3):90-96.
- [35] 董爱玲,颀建明,李杰,等. 低温驯化对低温胁迫下茄子幼苗生理活性的影响[J]. 甘肃农业大学学报,2017,52(1):74-79,86.
- [36] Cook D, Fowler S, Fiehn O, *et al.* A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2004,101(42):15243-15248.
- [37] 陈凯,江秀章,马松亚,等. 望天树苗期叶片对低温胁迫的生理响应及抗寒性评价[J]. 西北林学院学报,2019,34(3):67-73.
- [38] 王秀田,卢秋巍,苍晶,等. 低温驯化对冬小麦叶绿素荧光特性及抗氧化酶活性的影响[J]. 植物生理学报,2016,52(12):1959-1969.
- [39] 陈洁. 3 种含笑属植物抗寒性研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2015.
- [40] 赵建华,述小英,李浩霞,等. 不同果色枸杞鲜果品质性状分析及综合评价[J]. 中国农业科学,2017,50(12):2338-2348.
- [41] 谭殷殷,金晓玲,余秋岫,等. 5 种含笑属植物叶片抗寒结构指标的筛选与抗寒性评价[J]. 广西植物,2021:41(8):1296-1305.

(下转 138 页)