

紫花苜蓿光合特性及抗氧化物质对冷适应的响应

孙万斌¹, 马晖玲^{1*}, 周青平^{2**}

(1. 甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃省草业工程实验室, 中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070; 2. 西南民族大学青藏高原研究院, 四川若尔盖高寒湿地生态系统国家野外科学观测研究站, 四川省发改委工程实验室, 四川 成都 610041)

摘要:【目的】探究紫花苜蓿在冷适应过程中光合特性指标和抗氧化物质含量的变化。【方法】将10个紫花苜蓿品种的4周龄幼苗进行4℃冷适应处理, 分别在第0、7、14天测定其叶绿素含量、渗透压、相对电导率、光合特性指标、活性氧物质和抗氧化物质含量。【结果】在冷适应初期(0~7 d), 细胞膜受到损伤, 造成离子泄露, 叶片相对电导率升高, 但随着冷适应过程的持续(7~14 d), 离子泄露量减少, 相对电导率降低, 植株的抗寒性初步形成; 冷适应造成叶绿素a、b含量、净光合速率、PS II 实际光化学效率及PS II 最大光化学效率降低。【结论】紫花苜蓿幼苗在冷适应过程中, 其渗透压、抗坏血酸、氧化型谷胱甘肽和还原型谷胱甘肽含量持续升高, 幼苗通过提高细胞液的渗透压, 增加细胞液浓度, 增强细胞的渗透调节能力, 同时增加抗氧化物质含量, 提高其抗氧化能力, 从而减缓了超氧阴离子自由基和过氧化氢含量的持续升高。

关键词: 紫花苜蓿; 冷适应; 相对电导率; 光合特性; 抗氧化物质

中图分类号: S541⁺.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2024)03-0026-09

DOI: 10.13817/j.cnki.cyycp.2024.03.004



低温是植物经常遭受的一种逆境胁迫, 它限制作物的产量, 影响植物的自然分布, 研究植物对低温的应答机制, 提高其抗低温能力, 在农业生产上有重要意义^[1]。为了适应和抵抗低温胁迫, 植物在长期进化过程中形成了冷适应(cold adaption), 又称冷驯化(cold acclimation)的应答保护机制, 冷适应是指植物经过非致死低温处理, 可获得更强的抗冷能力的过程^[2]。光合生理过程是将光能转变为化学能的重要生物学途径, 为植物正常生长发育提供能量, 光合作用的强弱直接影响到牧草产量和品质^[3-4]。陈世茹等^[5]研究了低温处理下10个不同紫花苜蓿品种的叶绿素

荧光特性, 认为光合荧光参数的变化与紫花苜蓿的抗寒能力有关; 莫亿伟等^[6]的研究表明, 低温处理对柱花草叶绿素荧光参数和光合速率造成了影响。活性氧(ROS)主要包括超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)和过氧化氢(H_2O_2)等, 其化学性质极其活泼, 当ROS在细胞器中不断积累, 很容易对所处环境稳态造成损坏^[7], 其中抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSH)是植物体内重要的非酶类活性氧清除物质, 帮助植物对抗氧化胁迫^[8], Guo等^[9]的研究认为, 低温处理后, 耐冷水稻品种中AsA和GSH的含量显著升高; 孙蕊等^[10]研究表明, 抗寒小麦品种在冷适应期AsA含量迅速增加, AsA含量可以用于冬麦品种抗寒性的评价。

在植物抵御低温胁迫机制的研究中, 光合特性及抗氧化物质一直以来都是学者们关注的重点, 而紫花苜蓿光合特性及抗氧化物质对冷适应过程的响应研究报道较少, 因此, 本试验通过对10个紫花苜蓿品种4周龄幼苗经4℃冷适应处理, 分别在第0、7、14天对其

收稿日期: 2022-05-23; **修回日期:** 2022-05-26

基金资助: 国家重点专项(2017YFC0504806); 国家牧草产业技术体系(CARS-34)

作者简介: 孙万斌(1989-), 男, 甘肃临夏人, 博士研究生。

E-mail: 1205517373@qq.com

*通信作者。E-mail: mahl@gsau.edu.cn;

**通信作者。E-mail: qpingzh@aliyun.com

叶绿素含量、光合荧光指标、抗氧化物质含量、渗透压、相对电导率、活性氧含量进行测量,研究植株在冷适应过程中光合特性及抗氧化物质的变化,为进一步研究紫花苜蓿的抗寒生理机制提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试品种

供试苜蓿品种来源及秋眠级见表 1。

表 1 供试品种

Table 1 The alfalfa varieties used in this research

编号	品种	种子来源	秋眠级	品种特性
A-01	WL319HQ	北京正道生态科技有限公司	2.8	多叶,茎秆纤细,适口性好消化率高
A-02	WL343HQ	北京正道生态科技有限公司	3.9	持久性好,较长的营养生长期
A-03	WL363HQ	北京正道生态科技有限公司	4.9	早熟,耐刈割,抗病性好
A-04	阿尔冈金	甘肃创绿草业科技有限公司	2.0	耐旱、耐寒
A-05	甘农 1 号	甘肃创绿草业科技有限公司	1.7	抗寒,耐旱
A-06	甘农 3 号	甘肃创绿草业科技有限公司	3.0	高产、适合在有灌溉条件下栽培
A-07	皇后	甘肃创绿草业科技有限公司	2.0	抗寒,抗旱,根系非常发达
A-08	苜蓿王	甘肃创绿草业科技有限公司	2.5	抗寒,抗病,高蛋白,适口性好
A-09	太阳神	甘肃创绿草业科技有限公司	2.0	抗病性较好
A-10	驯鹿	甘肃创绿草业科技有限公司	1.5	抗寒

1.2 试验设计

挑选均一饱满的苜蓿种子 100 粒置于铺有两层滤纸的发芽盒中进行发芽,待种子萌发后挑选生长一致的幼苗移栽至装满基质育苗盘中,每穴一株,育苗基质为泥炭土(Pindstrup, Denmark)。幼苗培养条件为:光照周期 16 h,光照强度 $250 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,昼夜温度 22°C ,冷白色荧光灯提供光合有效辐射,用 0.5 g/L 花多多 1 号(N:P:K=20:20:20)均衡通用型水溶肥,每周施肥 2 次。4 周后将幼苗移入 4°C 光照培养箱,培养条件为:光照周期 16 h,光照强度 $250 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,昼夜温度 4°C ,光源为冷白荧光灯,浇水施肥操作同上。分别于处理第 0、7 和 14 天测定相关指标。

1.3 测定指标与方法

(1) 叶绿素 a(Chl a)、叶绿素 b(Chl b)含量

参考李亚姝等^[11]的方法测定紫花苜蓿叶片 Chl a 和 Chl b 含量。

(2) 渗透压(Cosm)

采用 OSMOMAT® 3000 冰点渗透压仪测量。取紫花苜蓿叶片 0.5 g ,用去离子水迅速将其表面冲洗干净,吸水纸吸干后立即放入液氮中,15 min 后取出置于注射器中挤出液汁,4 000 r/min 离心 1 min 后,取上清液 $50 \mu\text{L}$,用冰点渗透压仪测定得到 Cosm 值。

(3) 相对电导率(REC)

采用电导法^[12]测定相对电导率。

(4) 光合荧光指标

净光合速率(P_n)、气孔导度(G_s)、PS II 最大光化学效率(F_v/F_m)、PS II 实际光化学效率($\Phi\text{PS II}$)等指标采用便携式 Li-6800 光合仪(LI-COR 公司,美国, Li-6800)测定,选取 2 cm^2 叶室,温度设定为 25°C ,水分控制为 50%。

(5) 活性氧物质

过氧化氢(H_2O_2)含量采用刘俊等^[13]所述的方法,超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)含量采用李忠光等^[14]所述的方法。

(6) 抗氧化物质

抗坏血酸(AsA)、还原型谷胱甘肽(GSH)、氧化型谷胱甘肽(GSSG)采用相应试剂盒(苏州科铭)用分光光度法测定。

1.4 数据统计分析方法

数据利用 IBM SPSS Statistics 22.0 软件进行单因素方差分析(one-way ANOVA)新复极差法(Duncan)多重比较,用 Microsoft Excel 2019 进行数据初步整理,采用 Origin 2021 作柱状图,用 R 程序做相关性分析并做图。

2 结果与分析

2.1 冷适应对不同紫花苜蓿品种相对电导率和渗透压的影响

随着冷适应时间的延长,10 个品种 REC 均呈现先

增加后降低的变化趋势(图1-A)。冷适应0 d,10个品种幼苗的REC为6.47~8.65%,其中,A-06的REC最高,A-08的REC最小,二者差异显著($P<0.05$);冷适应7 d,A-05的REC最低,为10.13%,但与品种A-04、A-06、A-07无显著差异;冷适应14 d,REC为7.19%~8.57%,品种A-07的REC最低。

随着冷适应时间的延长,10个品种幼苗的Cosm均逐渐升高(图1-B)。冷适应0 d,A-07的最高,为534.87 mOsm/kg,显著高于其他品种($P<0.05$);冷适应7 d后,A-08的Cosm最高,但与A-04、A-05、A-06、A-07、A-09、A-10差异不显著;冷适应14 d,叶片Cosm明显升高,且A-08的Cosm仍最高,达626.32 mOsm/kg,但与品种A-05、A-07无显著差异。

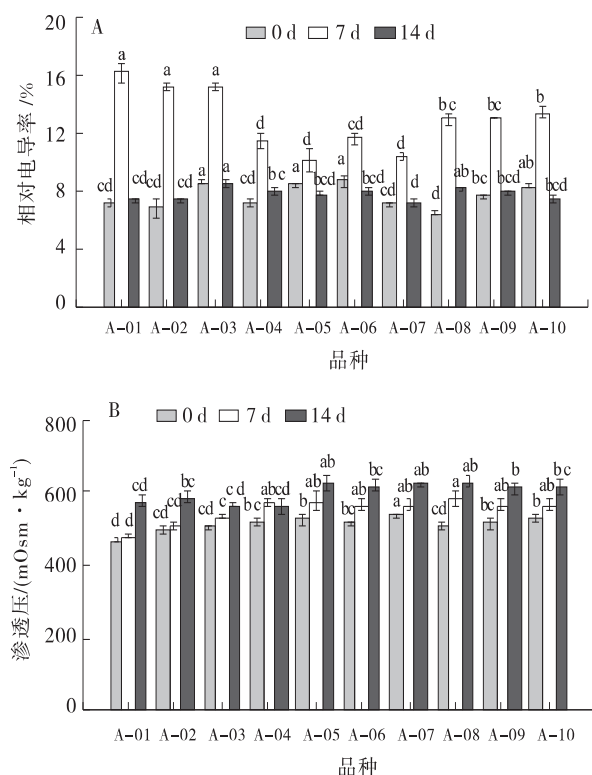


图1 不同紫花苜蓿品种冷适应下REC和Cosm变化

Fig. 1 Changes of the values of REC and Cosm in different alfalfa varieties under cold adaptation

注:不同小写字母表示不同品种间差异显著($P<0.05$),下同。

2.2 冷适应对不同紫花苜蓿品种叶绿素含量的影响

在冷适应过程中,不同品种Chl a含量变化趋势不同(图2-A)。冷适应0 d,A-03的Chl a含量最高,为1.47 mg/g,品种A-10的Chl a含量最低,二者差异显著($P<0.05$);冷适应7 d,A-01,A-03,A-04

和A-06的Chl a含量降低,而A-05和A-10的Chl a含量升高;冷适应14 d,A-03的Chl a含量进一步降低,仅为1.12 mg/g,显著低于A-01,A-02,A-05,A-06,A-07和A-08($P<0.05$)。

除A-02和A-05外,其他品种Chl b含量均随着冷适应时间的延长逐渐降低(图2-B)。冷适应0 d时,A-10的Chl b含量最高($P<0.05$),为1.47 mg/g,与A-01差异不显著,但显著高于其他品种($P<0.05$);冷适应7 d,A-01的Chl b含量最高,为1.09 mg/g,A-03的Chl b含量最低,仅为0.70 mg/g;冷适应14 d,10个苜蓿品种Chl b均较适应7 d时下降,其中A-01的Chl b含量最高,为0.78 mg/g,但与品种A-05、A-07无显著差异。

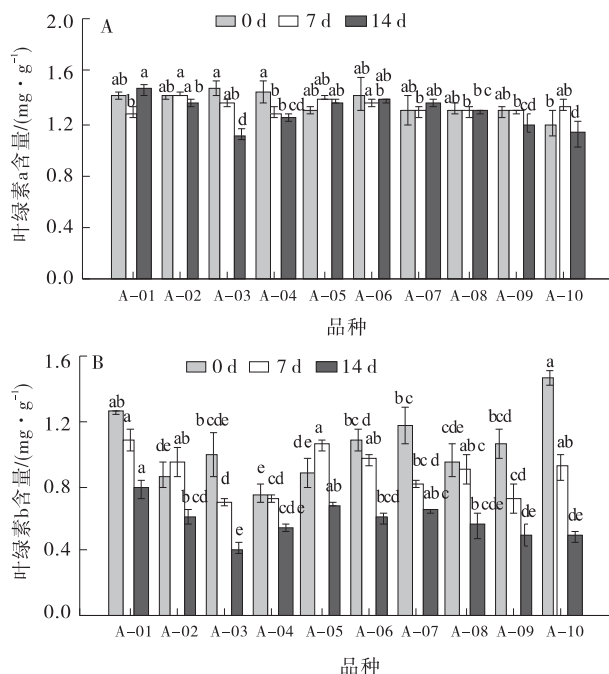


图2 紫花苜蓿品种冷适应下叶绿素含量的变化

Fig. 2 Changes of the contents of chlorophyll in different alfalfa varieties under cold adaptation

2.3 冷适应对不同紫花苜蓿品种光合荧光指标的影响

除A-08和A-09外,其他品种的 P_n 随冷适应时间的延长呈逐渐降低的趋势(图3-A)。冷适应0 d,A-07的 P_n 最大,为17.36 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,显著高于A-01和A-06($P<0.05$);冷适应7 d,A-06的 P_n 最高,A-03的 P_n 最低,二者差异显著($P<0.05$);冷适应14 d,A-04的 P_n 最高,为11.06 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$,但与品种A-01、A-05、A-06、A-07、A-08、A-09无显著差异,品种A-03的 P_n 仍为最低,仅为6.69

$\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$ 。

随着冷适应时间的延长,除A-02以外,其余尝试品种的 G_s 均呈先增加后降低的变化趋势(图3-B)。冷适应0 d和7 d均表现为A-06的 G_s 最大,显著高于其他品种($P<0.05$),且冷适应7 d时A-04和A-07的 G_s 增幅较0 d时大;冷适应14 d,A-04的 G_s 最高,但与A-07和A-09无显著差异。

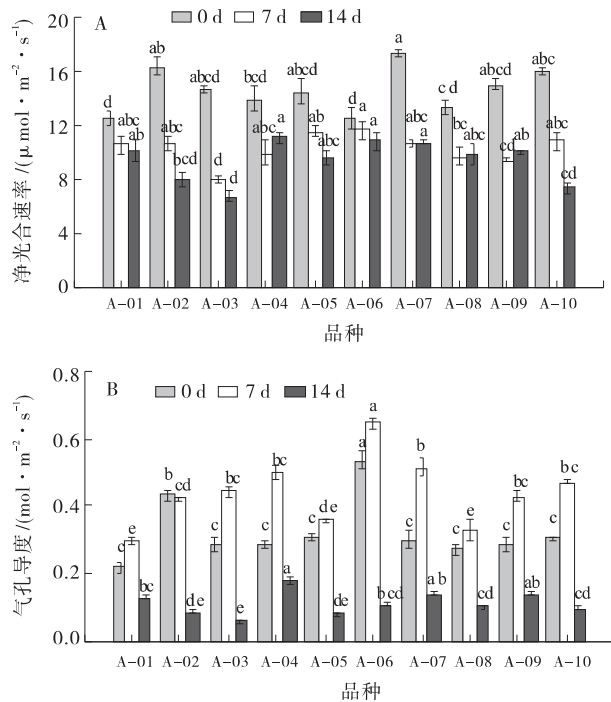


图3 不同紫花苜蓿品种冷适应下 P_n 和 G_s 的变化

Fig. 3 Changes of the values of P_n and G_s in different alfalfa varieties under cold adaptation

随着冷适应时间的延长,A-01和A-09的 F_v/F_m 呈持续降低的趋势,其余品种呈先降低后小幅上升的变化趋势,但14 d时的 F_v/F_m 均低于0 d(图4-A)。冷适应0 d时,A-06的 F_v/F_m 最大,为0.83,但与A-05、A-07和A-10差异不显著;冷适应7 d后,所有品种的 F_v/F_m 均降低,其中,A-09的降幅略高于其他品种;冷适应14 d,A-07的 F_v/F_m 最高,A-10的 F_v/F_m 最低,二者差异显著($P<0.05$)。

随着冷适应时间的延长,A-04、A-05、A-06、A-07、A-08的 ΦPSII 呈先降低后上升的变化趋势,其余品种的 ΦPSII 持续降低(图4-B)。冷适应0 d时,A-07的 ΦPSII 最大,为0.39,A-04的 ΦPSII 最小,显著低于其他品种($P<0.05$);冷适应7 d,A-10的 ΦPSII 最大,显著高于A-03和A-04($P<0.05$);冷适应14 d,仍表现为A-07的 ΦPSII 最大,显著高于

A-02、A-03、A-09和A-10($P<0.05$)。

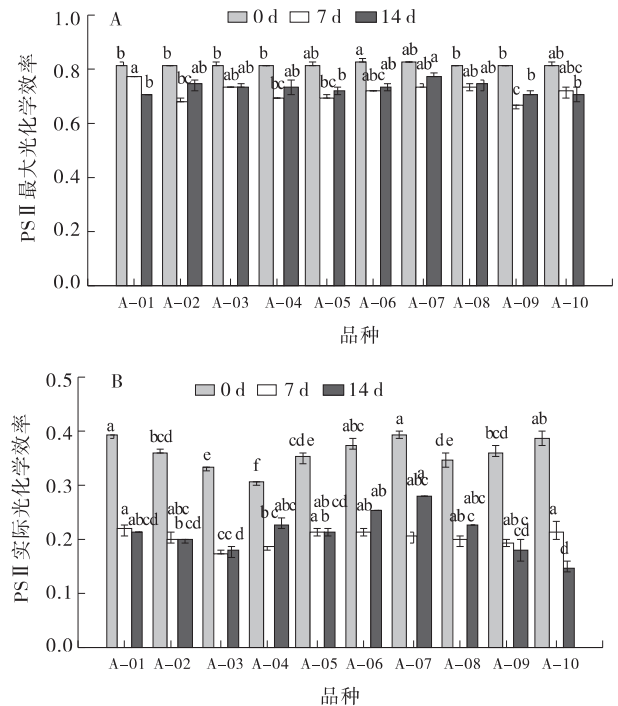


图4 不同紫花苜蓿品种冷适应下 F_v/F_m 和 ΦPSII 的变化

Fig. 4 Changes of F_v/F_m and ΦPSII in different alfalfa varieties under cold adaptation

2.4 冷适应对不同紫花苜蓿品种活性氧含量的影响

随着冷适应时间的延长,不同紫花苜蓿品种 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量基本呈现持续增高的趋势,但7~14 d较0~7 d的增高趋势明显减缓(图5-A)。冷适应第0 d, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 的含量为2.01~3.16 nmol/g;第7天为12.45~20.93 nmol/g,其中,A-09的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量显著低于其他品种($P<0.05$);第14天为16.13~22.77 nmol/g,品种A-10的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量最低。

10个品种 H_2O_2 含量变化趋势与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 类似(图5-B)。冷适应0 d时, H_2O_2 较低,为33.44~39.37 nmol/g;第7天时 H_2O_2 含量明显升高,A-02的 H_2O_2 含量最高,为258.73 nmol/g,A-09的 H_2O_2 含量最低,为239.95 nmol/g,二者差异显著($P<0.05$);冷适应第14天,品种A-04的 H_2O_2 含量最低,为270.10 nmol/g,与品种A-05、A-07、A-09、A-10无显著差异。

2.5 冷适应对不同紫花苜蓿品种抗氧化物质含量的影响

10个紫花苜蓿品种的GSH含量随冷适应时间的延长逐渐增高(图6-A)。冷适应第0天,各品种的GSH含量为78.43~86.13 $\mu\text{mol}/\text{g}$;7 d时,各品种的

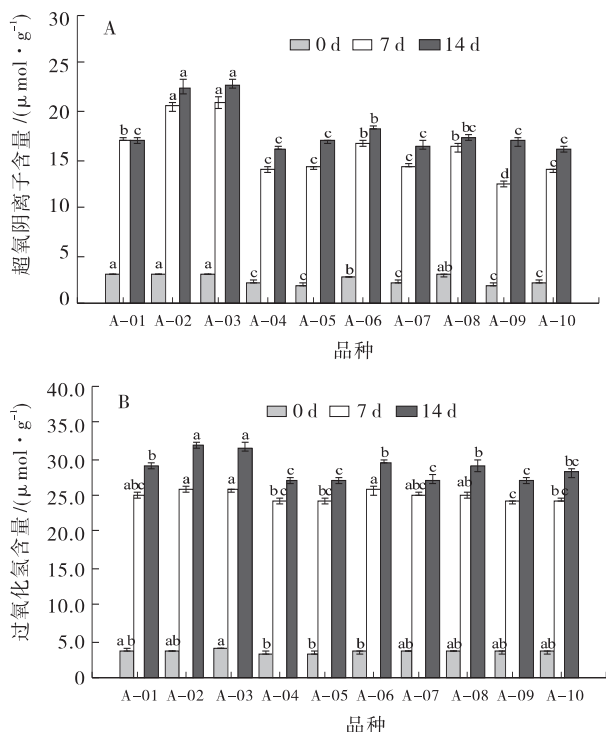


图5 不同紫花苜蓿品种冷适应下 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量的变化
Fig. 5 Changes of the contents of $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 in different alfalfa varieties under cold adaptation

GSH含量急剧升高。其中,A-10的GSH含量最高,为 $287.29 \mu\text{mol/g}$,A-02的GSH含量最低,为 $256.73 \mu\text{mol/g}$,二者差异显著($P < 0.05$);冷适应第14天,GSH含量 $336.22 \sim 376.79 \mu\text{mol/g}$ 之间,其中A-09的GSH含量最高,但与A-04、A-05、A-07、A-08和A-10差异不显著。

随冷适应时间的延长,各品种GSSG含量变化趋势同GSH(图6-B)。冷适应第0天,A-08的GSSG含量最高,A-06含量最低,二者差异显著($P < 0.05$);冷适应第7天,GSSG含量为 $89.58 \sim 98.76 \mu\text{mol/g}$,品种A-07的GSSG含量最高,A-01最低;冷适应第14 d,GSSG含量为 $124.34 \sim 137.98 \mu\text{mol/g}$,品种A-03的GSSG含量最高,但与品种A-01、A-02、A-08、A-09无显著差异。

随着冷适应时间的延长,10个品种AsA含量均呈现增高的变化趋势(图6-C)。冷适应第0天,各参试品种的AsA含量为 $24.53 \sim 25.96 \mu\text{mol/g}$;冷适应第7 d,AsA含量急剧增加,品种A-09含量最高,为 $1132.04 \mu\text{mol/g}$,但与品种A-04、A-07、A-10无显著差异;冷适应第14天,AsA含量继续增加,在 $165.20 \sim 185.04 \mu\text{mol/g}$,其中A-05的AsA含量最

高,但与品种A-01、A-04、A-07、A-08、A-09、A-10无显著差异,而品种A-03的AsA含量最低。

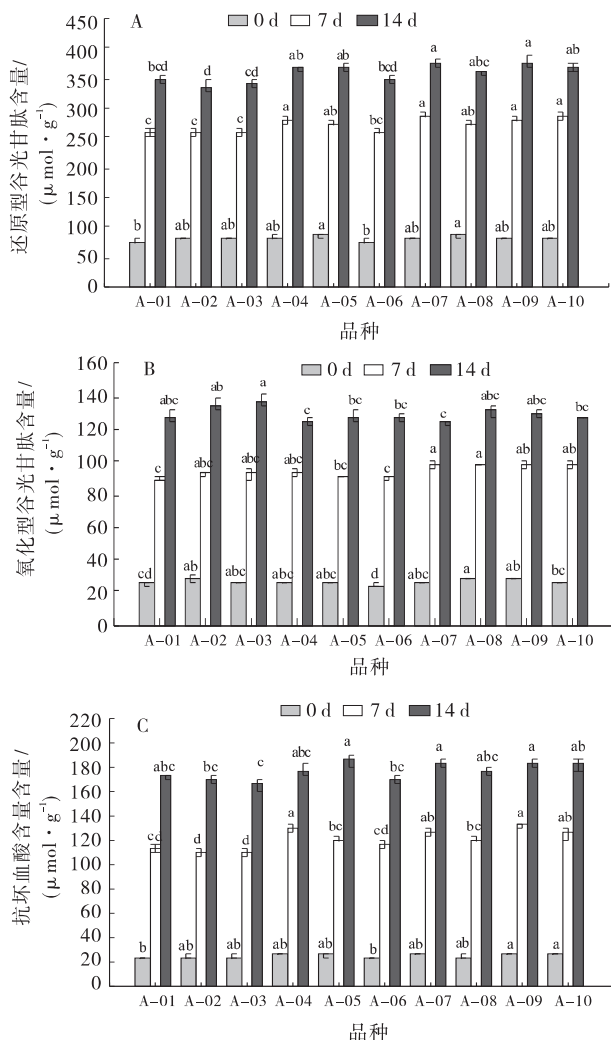


图6 不同紫花苜蓿品种冷适应下GSH、GSSG和AsA含量的变化
Changes of the contents of GSH, GSSG and AsA in different alfalfa varieties under cold adaptation

Fig. 6 Changes of the contents of GSH, GSSG and AsA in different alfalfa varieties under cold adaptation

2.6 冷适应不同时期各指标相关性分析

冷适应0 d(图7-A)时, C_{osm} 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量分别呈显著($P < 0.05$)和极显著($P < 0.01$)负相关,与AsA和 F_v/F_m 呈显著正相关($P < 0.05$),GSSG含量与GSH含量显著正相关($P < 0.05$), $\Phi PSII$ 与Chlb含量显著正相关($P < 0.05$)。在冷适应处理7 d(图7-B), C_{osm} 与REC极显著负相关($P < 0.01$),与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 、AsA和 F_v/F_m 均无显著相关性,该阶段的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 含量和 H_2O_2 含量呈极显著正相关($P < 0.01$),且均与AsA和GSH含量极显著负相关($P < 0.01$),此外, P_n 与Chlb

含量和 F_v/F_m 显著正相关 ($P < 0.05$)。在冷适应处理 14 d (图 7-C), Cosm 与其他指标均无显著相关, H_2O_2 与 AsA 和 GSH 含量仍极显著负相关 ($P < 0.01$), $O_2^{\cdot-}$ 和 AsA 和 GSH 含量分别呈显著 ($P < 0.05$) 和极显著

($P < 0.01$) 负相关, AsA 与 GSH 含量极显著正相关 ($P < 0.01$)。此外, 光合参数 P_n 与 G_s 、 $\Phi PSII$ 极显著正相关 ($P < 0.01$), Chl a 含量与 Chl b 和 $\Phi PSII$ 分别呈极显著 ($P < 0.01$) 和显著 ($P < 0.05$) 正相关。

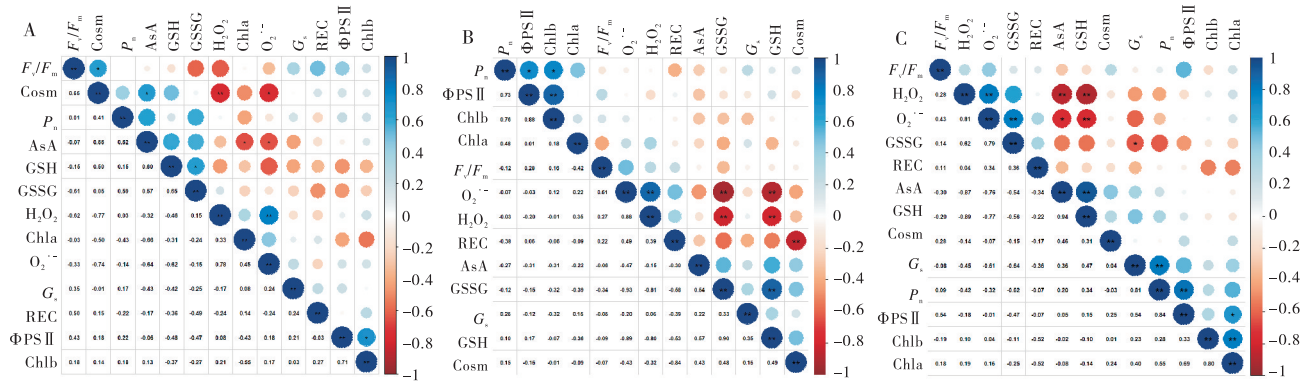


图 7 冷适应 0 d (A), 7 d (B) 和 14 d (C) 各指标相关性分析

Fig. 7 Correlation analysis of cold adaptation 0 d (a), 7 d (b) and 14 d (c)

注: * 表示 0.05 水平上显著; ** 表示相关性在 0.01 水平上显著; 蓝色代表正相关, 红色代表负相关, 颜色深浅显示相关程度; 数字表示相关系数。

3 讨论

3.1 相对电导率和渗透压的变化

相对电导率可以反映植物细胞膜受损情况, 马春平等^[15]通过比较不同紫花苜蓿品种的抗寒生理指标, 认为相对电导率能较为准确地反映苜蓿的抗寒性。本试验采用相对电导率来反映紫花苜蓿遭受低温胁迫造成损伤程度, 参试品种相对电导率呈先大幅升高, 后又降低到未受到低温胁迫处理前水平, 这可能是紫花苜蓿在冷适应初期受到低温胁迫使其叶片细胞膜受损, 随着冷适应时间的增加, 引发细胞内一系列生理调控过程, 形成抗寒能力, 提高了对低温的抵抗能力, 使得相对电导率恢复到之前水平。本试验通过测定紫花苜蓿叶片组织细胞液的渗透压反映细胞内容物质的浓度^[16]。结果表明, 随着冷适应时间的延长, 渗透压呈持续上升趋势, 细胞通过积累渗透调节物质, 增加细胞液的浓度, 降低细胞液冰点, 增强其抗冻性, 这与苏杨等^[17]和王奕骁等^[18]的研究结果相似。

3.2 光合色素含量的变化

叶绿体是对温度最为敏感的光合器官, Chl a、Chl b 是植物光合作用中最主要的功能色素^[19], 在多数非致死低温下, 叶绿素含量的降低主要是叶绿素本身被降解或其合成受阻^[20-21], Chl a 是光反应的中心色素分子, 在光反应中的能量转化中起重要作用; Chl b 是捕

光色素分子, 用以捕捉和传递光量子^[22], 当光系统 I (PS I) 遭到破坏时, 植物通过分解叶绿素来防止天线色素继续吸收过多的光能对 PS I 造成持续伤害^[23], 本研究中, 随着冷适应时间的增加, Chl a、Chl b 含量呈下降趋势, 可能是低温对紫花苜蓿的叶绿素合成造成影响, 并且 Chl b 含量降低幅度较大, 可能是防止在低温条件下吸收过多的光能对 PS I 造成破坏。

3.3 光合荧光指标的变化

植物光合作用受逆境的限制可分为两类: 一类为气孔限制, 当受到胁迫时, 叶片气孔会逐渐变小直至完全闭合, 影响大气 CO_2 通过气孔进入细胞, 使光合作用气体交换过程无法正常进行; 另一类为非气孔限制因素, 胁迫破坏植物绿素结构, 使光合作用光反应中心受损, 阻碍光合作用的进行^[24], 本试验中, P_n 呈持续下降的变化趋势, 而 G_s 呈先升高后降低的趋势, 且冷适应 14 d 时 G_s 低于 0 d 时水平, G_s 的降低可能与气孔限制有关, 而 P_n 的降低可能与气孔限制及 Chl a、Chl b 含量的降低有关。

F_v/F_m 是光系统 II (PSII) 反应中心最大光化学量子效率的估计值, 健康叶片的 F_v/F_m 一般在 0.75~0.85, 主要与叶片的受胁迫程度等因素有关^[25], 当植物受到低温等逆境胁迫时, 叶绿素吸收过量的光子会产生超氧化物、单线态氧和过氧化物, 对 PSII 造成损伤, 造成光抑制^[26], 初期阶段的光抑制是可逆的, 但持

续的光抑制会使光系统受到损伤^[27]。本试验中 F_v/F_m 先降低后小幅升高,可能是由于在冷适应初期阶段PSII反应中心复合体受到损伤,导致 F_v/F_m 降低,随后的升高可能与被损伤的PSII反应中心复合体上的相关蛋白被重新合成有关^[28]。 Φ PSII反映了实际光合系统对光能的转换效率^[29],本试验中 Φ PSII随冷适应时间的增加呈持续降低趋势,一方面,可能是紫花苜蓿在冷适应过程中,光合作用整体效能降低,导致 Φ PSII持续降低,另一方面,过多的激发能对PSII造成损伤,使得动态光抑制转变为持续光抑制^[27]。

3.4 活性氧和抗氧化物质含量的变化

低温会降低清除活性氧酶系的活性,导致活性氧清除酶系无法及时清除线粒体和叶绿体电子转移过程中形成的活性氧;另一方面,由于光合作用中光反应阶段PS I、PS II捕获光子的反应基本不受温度的影响,捕光复合物吸收过多的光能,使得光合电子传递链过度还原,导致PS I直接将氧分子还原成 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等物质;此外叶绿体电子传递链的传递效率在温度降低时出现降低,导致ROS类物质的积累^[30-31]。因此,导致苜蓿幼苗在冷适应过程中 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 含量持续升高;此外,7~14 d较0~7 d时, $O_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 含量增高趋势明显减缓,可能是紫花苜蓿在冷适应后期初步形成了较强的抗寒能力,增强了对活性氧等物质的清除能力。

谷胱甘肽存在于高等植物的大多数组织、细胞和亚细胞结构区域中,叶绿体中谷胱甘肽浓度最高,谷胱甘肽主要以还原形式存在,与ROS类物质发生化学反应,起到ROS清除剂的作用,此外谷胱甘肽还可以通过去除脂质过氧化反应形成的酰基过氧化物来稳定膜结构^[32];AsA是植物中含量丰富的抗氧化剂,叶绿体中产生的过氧化氢的解毒依赖于PSI附近,结合于类囊体膜上抗坏血酸过氧化物酶的活性^[33]。山溪等^[34]的研究表明,随着4℃处理时间的延长,耐寒甘蓝(*Brassica oleracea*)品系中GSH、GSSG、AsA含量显著增加;王继华等^[35]研究发现苜蓿在越冬前AsA和GSH含量升高,并且在越冬期间维持较高的水平。本试验中,随着冷适应时间的增加,GSH、GSSG、AsA等物质的含量呈增加趋势,与前人研究结果一致,且相关性分析发现,在冷适应7 d和14 d时,苜蓿幼苗的抗

氧化物质含量与ROS含量呈显著或极显著负相关,表明紫花苜蓿在冷适应过程中,通过合成和积累AsA、谷胱甘肽等活性氧清除物质,用以降低冷适应过程中产生的活性氧类物质对紫花苜蓿叶片的伤害,进而提高其抗寒能力。

4 结论

紫花苜蓿在冷适应过程中,通过提高细胞渗透压,增加细胞液浓度,增强组织细胞的渗透调节能力,同时增加抗氧化物质含量,以提高植株抗氧化能力,减缓超氧阴离子自由基和过氧化氢含量的持续升高。在冷适应初期(0~7 d),细胞膜受到损伤,造成离子泄露,使相对电导率升高;随着冷适应过程的持续(7~14 d),植株的抗寒性初步形成,离子泄露量减少,相对电导率降低。冷适应造成紫花苜蓿幼苗叶绿素含量、净光合速率、PS II实际光化学效率、PS II最大光化学效率降低。

参考文献:

- [1] 王芳,王洪,赵曦阳. 低温胁迫下植物的表型及生理响应机制研究进展[J]. 分子植物育种, 2019, 17(15): 5144—5153.
- [2] 夏金婵,吕强,郭梅芳,等. 植物冷驯化相关信号机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(4): 295—301.
- [3] Zhu X G, Stephen P, Donald R. Improving Photosynthetic Efficiency for Greater Yield[J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61(1): 235—261.
- [4] 夏璐,赵蕊,王怡针. 干旱胁迫对夏玉米光合作用和叶绿素荧光特性的影响[J]. 华北农学报, 2019, 34(3): 102—110.
- [5] 陈世茹,于林清,易津,等. 低温胁迫对紫花苜蓿叶片叶绿素荧光特性的影响[J]. 草地学报, 2011, 19(4): 596—600.
- [6] 莫亿伟,郭振飞,谢江辉. 温度胁迫对柱花草叶绿素荧光参数和光合速率的影响[J]. 草业学报, 2011, 20(1): 96—101.
- [7] 黄志明,陈宇,吴晶晶,等. 硝普钠对低温胁迫下枇杷幼果线粒体AsA—GSH循环代谢的影响[J]. 热带作物学报, 2011, 32(8): 1469—1474.
- [8] Coelho É M P, Barbosa M C, Mito M S, et al. The activity of the antioxidant defense system of the weed species *Senna obtusifolia* L. and its resistance to allelochemical

- stress [J]. Journal of chemical ecology, 2017, 43 (7) : 725—738.
- [9] Guo Z, Ou W, Lu S, *et al.* Differential responses of antioxidative system to chilling and drought in four rice cultivars differing in sensitivity [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006, 44(11/12): 828—836.
- [10] 孙蕊, 林奇, 王晓楠, 等. 低温下寒地冬小麦抗氧化生理指标的比较分析 [J]. 中国农学通报, 2015, 31(12): 1—5.
- [11] 李亚妹, 温雅洁, 赵晓东, 等. 施钾对紫花苜蓿苗期光合特性及抗薹马的影响 [J]. 草原与草坪, 2021, 41(4): 42—48+55.
- [12] 武文超, 汤丽斯, 刘慧霞, 等. 贮藏方式对伊犁绢蒿种子萌发及生理特性的影响 [J]. 草原与草坪, 2022, 42(1): 133—141.
- [13] 刘俊, 吕波, 徐朗莱. 植物叶片中过氧化氢含量测定方法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 548—551.
- [14] 李忠光, 龚明. 植物中超氧阴离子自由基测定方法的改进 [J]. 云南植物研究, 2005(2): 211—216.
- [15] 马春平, 宋丽萍, 崔国文. 紫花苜蓿抗寒生理指标的比较研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2006(6): 47—48.
- [16] 肖国超, 徐庆国. 水稻耐冷性的研究与进展 [J]. 作物研究, 2005(S1): 266—272.
- [17] 苏杨, 冼卓慧, 张俊涛, 等. “冰护”抗冻剂对低温胁迫下籼杜鹃‘金心双色’抗寒性的影响 [J]. 热带农业科学, 2020, 40(10): 60—67.
- [18] 王奕骁, 徐曼, 王茜, 等. 不同产地紫花苜蓿品种在东北地区的抗寒性评价及与根部贮藏性碳水化合物关系分析 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020(10): 99—104+109.
- [19] 薛香, 吴玉娥. 小麦叶片叶绿素含量测定及其与 SPAD 值的关系 [J]. 湖北农业科学, 2010, 49(11): 2701—2702+2751.
- [20] Green B R, Durnford D G. The chlorophyll—carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis [J]. Annual review of plant biology, 1996, 47(1): 685—714.
- [21] 张尚雄, 尼玛平措, 徐雅梅, 等. 3 个披碱草属牧草对低温胁迫的生理响应及苗期抗寒性评价 [J]. 草业科学, 2016, 33(6): 1154—1163.
- [22] 阿衣古力·阿布都瓦依提, 王铮, 木合塔尔·扎热, 等. 干旱胁迫对 3 个苜蓿品种的生长及光合特性的影响 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(14): 7—12.
- [23] Kudoh H, Sonoike K. Irreversible damage to photosystem I by chilling in the light: Cause of the degradation of chlorophyll after returning to normal growth temperature [J]. Planta, 2002, 215(4): 541—548.
- [24] 高冠龙, 冯起, 张小由, 等. 植物叶片光合作用的气孔与非气孔限制研究综述 [J]. 干旱区研究, 2018, 35(4): 929—937.
- [25] Li Z, Wakao S, B B Fischer, *et al.* Sensing and Responding to Excess Light [J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60(1): 239—260.
- [26] Hakala M, Tuominen I, Keränen M, *et al.* Evidence for the role of the oxygen—evolving manganese complex in photoinhibition of Photosystem II [J]. BBA — Bioenergetics, 2004, 1706(1): 68—80.
- [27] Krieger—Liszkay A, Kienzler K, Johnson G N. Inhibition of electron transport at the cytochrome b 6 f complex protects photosystem II from photoinhibition [J]. FEBS Letters, 2000, 486(3): 191—194.
- [28] Ji B H, Jiao D M. Relationships between D1 protein, xanthophyll cycle and photodamage—resistant capacity in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Chinese Science Bulletin, 2000, 45(17): 1569—1575.
- [29] Genty B, Briantais J M, Baker N R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — General Subjects, 1998, 990(1): 87—92.
- [30] Ensminger I, Busch F, Huner N P A. Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis [J]. Physiologia Plantarum, 2006, 126(1): 28—44.
- [31] Huner N, Öquist G, Hurry V, *et al.* Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold tolerant plants [J]. Photosynthesis Research, 1993, 37(1): 19—39.
- [32] Price A, Lucas P W, Lea P J. Age dependent damage and glutathione metabolism in ozone fumigated barley: a leaf section approach [J]. Journal of Experimental Botany, 1990, 41(10): 1309—1317.
- [33] Miyake C, Asada K. Thylakoid—bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids [J]. Plant and Cell Physiology, 1992, 33(5): 541—553.

- [34] 山溪,秦文斌,张振超,等. 低温胁迫对不同品系甘蓝幼叶 AsA—GSH 循环代谢的影响[J]. 南方农业学报, 2018,49(11):2230—2235.
- [35] 王继华,谭嘉力,郭振飞,等. 柱花草和苜蓿抗氧化系统及光合作用的季节性变化[J]. 草地学报,2007,15(5): 412—417.

Photosynthetic characteristics and response of antioxidant to cold adaptation of alfalfa

SUN Wan-bin¹, MA Hui-ling^{1*}, ZHOU Qing-ping^{2**}

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Institute of Qinghai-Tibet Plateau, Southwest Minzu University, Sichuan Zoige Alpine Wetland Ecosystem National Observation and Research Station, Engineering Laboratory of Sichuan Provincial Development and Reform Commission, Chengdu 610041, China)

Abstract:【Objective】In order to study the changes of photosynthetic characteristics and the contents of antioxidant substances of alfalfa during cold adaptation. 【Method】The 4—week—old seedlings of 10 alfalfa varieties were cold—adapted at 4 °C, and their chlorophyll content, osmotic pressure, relative electric conductivity, photosynthetic characteristics, the contents of reactive oxygen species and antioxidant substances were measured on the 0 th, 7 th, and 14th days, respectively. 【Result】The results showed that in the early stage of cold adaptation (0~7 d), the cell membrane was damaged, resulting in ion leakage and increased the relative conductivity of leaves. As the cold adaptation process continues (7~14 d), the amount of ion leakage decreased, the relative conductivity decreased, and the cold resistance of alfalfa was initially formed. Cold adaptation decreased the contents of chlorophyll a and chlorophyll b, net photosynthetic rate, actual photochemical efficiency of PS II, and maximum photochemical efficiency of PS II in alfalfa. 【Conclusion】The contents of osmotic pressure, ascorbic acid, oxidized glutathione and reduced glutathione of alfalfa seedlings increased continuously during cold adaptation. The osmotic pressure and concentration of cell fluid were increased to enhance the osmotic regulation ability of cells. At the same time, the content of antioxidant substances increased and the antioxidant capacity enhanced, which could reduce the content of superoxide anion free radical and hydrogen peroxide.

Key words: alfalfa; cold adaptation; relative electric conductivity; photosynthetic characteristics; antioxidant substances

(责任编辑 刘建荣)