

低温胁迫对WL系列紫花苜蓿品种抗氧化生理的影响

刘泽宇¹, 隋可¹, 袁梓桐¹, 张玉霞¹, 刘庭玉¹, 单新河², 张智勇³, 王显国^{2*}

(1. 内蒙古民族大学草业学院, 内蒙古自治区饲用作物工程中心, 内蒙古 通辽 028000; 2. 中国农业大学草业科学与技术学院, 北京 100193 4; 3. 通辽市农牧业科学研究所, 内蒙古 通辽 028000)

摘要:【目的】研究紫花苜蓿在低温胁迫下抗氧化生理特性的变化规律, 评价不同秋眠级品种的抗寒性。【方法】选取美国WL系列12个紫花苜蓿品种作为供试材料, 于科尔沁沙地种植, 越冬前挖取苜蓿越冬材料, 模拟4℃(CK)和-20℃低温胁迫处理, 测定根颈丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)活性, 结合相关性分析、主成分分析和隶属函数分析评价抗寒能力。【结果】与对照相比, 低温胁迫下供试的12个苜蓿品种的SOD、CAT和POD的活性和MDA含量均增加; 与其他品种苜蓿相比, WL168HQ、WL298HQ和WL354HQ的抗氧化酶活性较高, MDA的含量较低。对抗氧化酶活性和丙二醛含量进行相关性分析发现, 在低温胁迫下, CAT和SOD与MDA呈显著负相关($P < 0.05$)。【结论】运用隶属函数评价12个品种的抗寒性为: WL168HQ > WL329HQ > WL298HQ > WL319HQ > WL349HQ > WL358HQ > WL366HQ > WL377HQ > WL363HQ > WL354HQ > WL343HQ > WL440HQ。建议在科尔沁沙地种植WL系列苜蓿品种选择WL168HQ、WL298HQ、WL319HQ和WL329HQ秋眠级数低、抗寒性强的苜蓿品种。

关键词:紫花苜蓿; 品种; 低温胁迫; 抗氧化特性; 抗寒性; MDA

中图分类号:S541.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2025)02-0024-08

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2025.02.003



苜蓿(*Medicago sativa*)是多年生的豆科牧草, 因其产量高, 品质优良, 对环境的适应能力强, 被誉为“牧草之王”^[1], 我国的苜蓿种植区域主要集中在北方地区, 其中科尔沁地区作为新兴的苜蓿优势产区, 截止2021年科尔沁沙地种植苜蓿70万亩, 然而科尔沁沙地冬季寒冷少雪, 春季“倒春寒”等自然灾害时有发生, 极端低温天气使苜蓿的返青失败^[2], 导致翌年苜蓿

的产量和品质下降, 严重影响了我国牧草产业的健康发展。孟季蒙等^[3]在新疆石河子的引种筛选研究表明, WL324的抗寒性表现较好; 豆艳丽等^[4]在甘肃榆中县的研究表明, WL363HQ在多个性状中具有优势, 适宜在榆中县进行种植。王运涛等^[5]发现, WL343HQ抗寒表现较差, 不适宜在呼和浩特地区种植。因此, 研究低温胁迫下苜蓿的生理特性并筛选出高耐寒的苜蓿品种, 已成为当前我国苜蓿产业化发展过程中亟待解决的关键性问题之一。苜蓿在低温环境下, 细胞膜质过氧化过程加剧, 膜系统氧化性损伤严重^[6-7], 生成氧化分解产物丙二醛(malondialdehyde, MDA), 对生物膜造成伤害, 此时苜蓿会通过超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶清除一定范围内在低温胁迫刺激下植物代谢过程中产生的活性氧^[8], 以维持细胞膜的稳定性, 因此, 抗氧

收稿日期:2024-02-28; **修回日期:**2024-04-13

基金资助:国家牧草产业技术体系项目(CARS-34), 内蒙古自治区直属高校专项(GXKY22018), 内蒙古自治区生态农业国家民委重点实验室开放基金项目(MDK2023095)

作者简介:刘泽宇(1998-), 男, 内蒙古包头市人, 硕士研究生。E-mail: lzy13171242444@163.com

*通信作者, 研究方向为饲草高产栽培研究。

E-mail: grasschina@126.com

化酶活性和MDA含量可作为衡量苜蓿抗寒性强弱的生理指标^[9-11]。但抗寒性是一个复杂的数量性状,仅靠单一指标无法判定苜蓿的抗寒能力^[12-14],目前,苜蓿品种的抗寒性评价主要通过回归分析和隶属函数法^[15]。当前科尔沁沙地苜蓿抗寒性的研究主要集中在不同肥料种类、施用深度^[16-17]和末次刈割时间^[17]对苜蓿抗寒性的影响,对于不同苜蓿品种的研究主要集中在品种适应性和生产性能方面的研究^[11],对低温的生理响应和抗寒性评价研究较少^[18-20],鉴于此,本研究以国外WL秋眠和半秋眠的苜蓿品种为供试材料,测定低温胁迫下苜蓿根颈的抗氧化酶活性和丙二醛含量变化,用相关性分析、主成分分析和隶属函数评价方法对紫花苜蓿品种耐寒性进行分类和排序;探究苜蓿根颈对于低温胁迫的生理响应,以期为科尔沁沙地苜蓿引种栽培及抗寒种质资源鉴定提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为美国WL系列紫花苜蓿品种,品种名称见表1,苜蓿品种均由北京正道种业公司提供。

表1 供试品种名称及秋眠性

Table 1 Name of test varieties and fall dormancy

品种	秋眠级	秋眠性
WL168HQ	2.0	秋眠
WL298HQ	3.0	秋眠
WL319HQ	3.0	秋眠
WL329HQ	3.0	秋眠
WL349HQ	4.0	半秋眠
WL358HQ	4.0	半秋眠
WL354HQ	4.0	半秋眠
WL343HQ	4.0	半秋眠
WL366HQ	5.0	半秋眠
WL377HQ	5.0	半秋眠
WL363HQ	5.0	半秋眠
WL440HQ	6.0	半秋眠

1.2 试验设计

本试验于2023年4—11月在内蒙古通辽市科尔沁区钱家店镇(通辽市农牧科学研究所试验基地)进行。土质为白壤土,地势平坦,肥力中上等,海拔203 m,地理位置43°43' N,122°37' E。属温带大陆性气候。春季干旱多风;夏季短温热,降水集中;秋季凉爽;冬季干冷。无霜期为90~150 d。年降水量350~

450 mm。土壤基本理化性质为有机质26.0 g/kg,速效磷17.0 mg/kg,速效钾76.6 mg/kg,碱解氮47.5 mg/kg,全氮0.8 g/kg。

采用单因素随机区组试验设计,2023年4月播种,播种量为22.5 kg/hm²,行距为15 cm,小区面积为20 m²(4 m×5 m),共12个品种处理,每个处理3次重复,共36个小区。试验田按照当地苜蓿高产田进行田间管理。分别于6月26日、8月1日、8月31日进行3茬苜蓿的刈割利用。本试验于封冻前期,将长势均匀一致的苜蓿越冬器官带回室内,模拟低温冷藏和低温冷冻胁迫处理。将用蒸馏水洗净擦干后的苜蓿越冬器官分成均匀的两份,其中一份存放于4℃的冰箱冷藏,另一份参照朱爱民等^[15]的方法放入程式恒温恒湿试验箱中进行-20℃的低温处理。低温处理完成后与放于4℃冰箱的材料一同切取根颈下方1 cm长度的薄片,用于进行MDA含量和抗氧化酶活性等生理指标的测定。

1.3 测定的指标与方法

MDA含量、SOD活性、CAT活性、POD活性分别采用硫代巴比妥酸法、氮蓝四唑法紫外吸收法、愈创木酚比色法测定^[21]。

1.4 隶属函数法评价

采用模糊数学隶属函数法对苜蓿的耐寒性进行综合评价。首先,通过相关性分析确定最终用于评价的指标,并计算出各指标的隶属函数值^[22],如果某一指标和抗寒性呈正相关,则采用公式(1)进行计算,如果某一指标和抗寒性呈负相关,则采用公式(2)进行计算:

$$F_{ij} = [X_{ij} - X_{imin}] / [X_{imax} - X_{imin}] \quad (1)$$

$$F_{ij} = 1 - [X_{ij} - X_{imin}] / [X_{imax} - X_{imin}] \quad (2)$$

式中: F_{ij} 为*i*品种*j*指标隶属函数值; X_{ij} 为*i*品种*j*指标值; X_{imax} 为*i*品种*j*指标最大值; X_{imin} 为*i*品种*j*指标最小值。将*i*品种各项指标函数值累加后求平均值,均值越大则苜蓿品种耐寒性越强。

各综合指标的权重:

$$\omega_j = p_j / \sum_{j=1}^n p_j \quad j=1, 2, \dots, n \quad (3)$$

式中: ω_j 表示第*j*个综合指标在所有综合指标中的重要程度即权重; p_j 代表经主成分分析所得各苜蓿越冬材料第*j*个综合指标的贡献率。

综合抗寒能力大小:

$$D = \sum_{j=1}^n [\mu(X_j) \times w_j] \quad j=1, 2, \dots, n \quad (4)$$

式中: D 值为各苜蓿根颈在低温冷冻胁迫处理下由综合指标评价所得的抗寒性综合评价值。

1.5 统计分析

用 Excel 2021 进行数据的录入及整理。采用 SPSS 26.0 (IBM, 美国) 统计软件中的单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 $P < 0.05$ 水平下的 Least significant difference (LSD) 检验, 进行相关性分析、主成分分析和隶属函数综合评价。

2 结果与分析

2.1 低温胁迫下不同苜蓿品种 CAT 活性变化

不同苜蓿品种对低温胁迫下 CAT 的活性变化如表 2 所示, 在低温冷藏下, 苜蓿根颈的 CAT 活性在 40.89~53.43 U/(g·min), WL366HQ 品种的 CAT 活性最低为 40.89 U/(g·min), 显著低于 WL168HQ 和 WL354HQ 品种 ($P < 0.05$); 低温冷冻下, 各苜蓿品种的 CAT 活性均呈上升趋势, WL168HQ 和 WL354HQ 的 CAT 活性最高为 86.44 U/(g·min) 和 86.22 U/(g·min), 显著高于 WL363HQ 品种 ($P < 0.05$), 与其他品种之间差异不显著。

表 2 低温胁迫下不同苜蓿品种抗氧化酶活性变化

Table 2 Changes of antioxidant enzyme activities in different alfalfa varieties under low temperature stress

品种名称	过氧化氢酶活性/(U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)		过氧化物酶活性/(U·g ⁻¹ ·min ⁻¹)		超氧化物歧化酶活性/(U·g ⁻¹)	
	低温冷藏	低温冷冻	低温冷藏	低温冷冻	低温冷藏	低温冷冻
WL168HQ	53.43±4.43 ^{Ab}	86.44±2.27 ^{Aa}	755.60±66.62 ^{Ab}	1153.07±17.37 ^{ABa}	83.16±9.51 ^{Ab}	169.39±8.24 ^{Aa}
WL298HQ	50.44±.68 ^{ABa}	66.67±8.24 ^{ABa}	757.47±20.61 ^{Ab}	1037.87±23.51 ^{ABa}	79.82±15.89 ^{ABb}	126.20±4.85 ^{BCa}
WL319HQ	42.11±5.58 ^{ABb}	73.67±8.81 ^{ABa}	746.73±74.01 ^{Ab}	1130.00±37.70 ^{ABa}	77.80±5.08 ^{Ab}	119.82±10.74 ^{BCa}
WL329HQ	42.44±5.23 ^{ABb}	62.67±6.42 ^{Ba}	707.47±44.73 ^{ABb}	1329.07±72.97 ^{Aa}	58.11±8.21 ^{BCb}	113.35±21.33 ^{BCa}
WL349HQ	41.78±4.15 ^{ABb}	75.56±3.86 ^{ABa}	635.07±26.74 ^{Ba}	721.87±68.63 ^{Ba}	74.01±18.39 ^{ABb}	149.54±28.25 ^{ABa}
WL358HQ	51.88±0.54 ^{ABa}	64.89±2.79 ^{Ba}	740.53±54.27 ^{ABb}	1149.07±94.72 ^{ABa}	36.90±9.87 ^{BCb}	120.75±15.67 ^{BCa}
WL354HQ	53.33±2.18 ^{Ab}	86.22±16.88 ^{Aa}	694.27±93.20 ^{ABa}	810.80±15.41 ^{Ba}	42.57±8.47 ^{BCb}	109.00±6.45 ^{Ca}
WL343HQ	48.00±1.89 ^{ABb}	66.78±12.77 ^{ABa}	695.20±24.89 ^{ABb}	1154.13±82.48 ^{ABa}	27.82±6.97 ^{BCb}	125.96±20.53 ^{BCa}
WL366HQ	40.89±4.37 ^{Bb}	78.67±3.40 ^{ABa}	692.67±78.69 ^{ABab}	857.33±12.31 ^{ABa}	26.47±3.37 ^{BCb}	108.58±7.79 ^{Ca}
WL377HQ	44.56±2.18 ^{ABb}	66.00±8.02 ^{ABa}	712.80±68.04 ^{ABb}	1155.20±112.01 ^{ABa}	69.45±9.75 ^{ABCb}	111.58±6.23 ^{BCa}
WL363HQ	48.89±5.67 ^{ABa}	53.22±4.03 ^{Ba}	665.73±18.15 ^{ABb}	1014.67±20.84 ^{ABa}	20.95±2.85 ^{Cb}	165.02±4.32 ^{Aa}
WL440HQ	43.56±6.81 ^{ABb}	65.11±1.37 ^{Ba}	743.60±11.65 ^{ABb}	1035.33±16.33 ^{ABa}	49.87±21.84 ^{BCb}	108.15±11.33 ^{Ca}

注: 同行不同小写字母代表不同温度下差异在 $P < 0.05$ 水平显著; 同列不同大写字母代表不同品种下差异在 $P < 0.05$ 水平显著。

随着温度的降低, 不同品种的苜蓿 POD 活性均呈上升趋势, 低温冷藏下 WL168HQ、WL298HQ、WL319HQ 的 POD 活性显著高于 WL349HQ ($P < 0.05$), 其中 WL298HQ 的 POD 活性最高为 757.47 U/(g·min), 低温冷冻下, WL349HQ 的 POD 活性最低 721.87 U/(g·min), WL329HQ 的活性最高为 1 329.07 U/(g·min), 显著高于 WL354HQ 和 WL349HQ 品种 ($P < 0.05$), 与其他品种间差异不明显(表 2)。

低温冷藏下, WL168HQ 的 SOD 活性最高为 83.16 U/g, 其次为 WL298HQ 和 WL319HQ, 分别为

79.82 U/g 和 77.80 U/g, WL363HQ 的 SOD 活性最低为 20.95 U/g, 显著低于 WL168HQ、WL198HQ、WL319HQ、WL349HQ 和 WL377HQ 品种 ($P < 0.05$), 与其他品种间差异不显著。低温冷冻下, 各品种的 SOD 活性均增加, WL168HQ 的 SOD 活性最高为 169.39 U/g, 与 WL363HQ 品种间差异不显著。WL440HQ 的 SOD 活性最低为 108.15 U/g, 显著低于 WL168HQ、WL363HQ 和 WL349HQ 处理 ($P < 0.05$)(表 2)。

2.2 低温胁迫下不同苜蓿品种 MDA 含量变化

低温胁迫下, 不同苜蓿品种的 MDA 含量不同, 低

温冷藏下, WL168HQ和WL298HQ的MDA含量最低为0.52 nmol/g, 其次是WL377HQ, 为0.53 nmol/g, 显著低于WL354HQ ($P < 0.05$), 与其他品种间差异不显著; 低温冷冻下, WL319HQ的丙二醛含量最低为1.07 nmol/g, 其次为WL168HQ和WL298HQ, 显著低于WL440HQ、WL349HQ、WL358HQ品种 ($P < 0.05$), 与其他品种处理间差异不显著(表3)。

表3 低温胁迫下不同苜蓿品种丙二醛含量变化

Table 3 Changes of malondialdehyde content in different alfalfa varieties under low temperature stress

品种名称	丙二醛含量/(nmol·g ⁻¹)	
	低温冷藏	低温冷冻
WL168HQ	0.52±0.04 ^{Ba}	1.11±0.08 ^{Ba}
WL298HQ	0.52±0.04 ^{Bab}	1.15±0.08 ^{ABa}
WL319HQ	0.54±0.04 ^{Bab}	1.07±0.17 ^{Ba}
WL329HQ	0.59±0.05 ^{ABab}	1.22±0.05 ^{ABa}
WL349HQ	0.63±0.05 ^{ABab}	1.27±0.11 ^{Aa}
WL358HQ	0.56±0.02 ^{Bb}	1.22±0.07 ^{Aa}
WL354HQ	0.68±0.05 ^{Ab}	1.22±0.05 ^{ABa}
WL343HQ	0.54±0.07 ^{Bb}	1.16±0.14 ^{ABa}
WL366HQ	0.56±0.01 ^{Bb}	1.19±0.06 ^{ABa}
WL377HQ	0.53±0.03 ^{Bb}	1.23±0.16 ^{ABa}
WL363HQ	0.57±0.07 ^{ABab}	1.18±0.21 ^{ABa}
WL440HQ	0.62±0.004 ^{ABb}	1.28±0.08 ^{Aa}

注: 同行不同小写字母代表不同温度下差异在 $P < 0.05$ 水平显著; 同列不同大写字母代表不同品种下差异在 $P < 0.05$ 水平显著。

2.3 苜蓿根颈中MDA含量与抗氧化酶活性的相关性分析

不同温度处理下苜蓿根颈中MDA与POD、CAT、SOD呈负相关。低温冷藏处理下, CAT、SOD与MDA呈显著负相关($P < 0.05$), 低温冷冻处理下, CAT与POD呈显著正相关($P < 0.05$), CAT与MDA呈显著负相关($P < 0.05$)(表4)。

2.4 主成分分析

对抗氧化特性和丙二醛含量4个生理指标进行主成分分析结果表明, 前2个主成分(F1、F2)的贡献率

表4 苜蓿根颈中丙二醛与抗氧化酶活性的相关性分析

Table 4 Correlation analysis of alfalfa root crown malondialdehyde and antioxidant enzyme activity

温度处理	测定指标	过氧化氢酶	过氧化物酶	超氧化物歧化酶
低温冷藏	过氧化物酶	0.30		
	超氧化物歧化酶	0.19	0.08	
低温冷冻	丙二醛	-0.30*	-0.15	-0.37*
	过氧化物酶	0.33		
	超氧化物歧化酶	0.31*	0.18	
	丙二醛	-0.41*	-0.05	-0.16

注: “*”分别表示相关性在 $P < 0.05$ 水平显著。

为47.49%、34.78%。其中F1对应的特征向量中贡献较大的指标为CAT(0.79)和POD(0.69); F2对应的特征向量中贡献较大的指标为CAT(0.42)和POD(0.36)。因此将4个单一指标转化为2个综合指标, 累计贡献率达82.27%(表5)。

2.5 抗寒性评价

通过对抗氧化特性和丙二醛含量进行主成分分析, 将4个单一的生理指标转化为2个新的相互独立的综合指标F1、F2, 运用隶属函数对14个苜蓿品种进行综合评价, 结果表明, 苜蓿的抗寒性顺序依次是WL168HQ(0.92) > WL329HQ(0.57) > WL298HQ(0.55) > WL319HQ(0.47) > WL349HQ(0.42) > WL358HQ(0.37) > WL366HQ(0.31) > WL377HQ(0.30) > WL363HQ(0.25) > WL354HQ(0.23) > WL343HQ(0.22) > WL440HQ(0.21)。

3 讨论

POD、CAT和SOD等抗氧化酶是植物体内的酶促防御系统的重要保护酶类, 维持植物细胞体内自由基的产生和消除之间的平衡, 减弱低温对于膜结构的影响程度。MDA是膜质过氧化的产物, MDA含量的高低反映根颈细胞受低温胁迫的影响程度^[23-26]。

表5 12个WL系列不同休眠级苜蓿品种抗寒指标主成分分析

Table 5 Principal component analysis of cold resistance indexes of 12 WL alfalfa varieties with different fall dormancy levels

主成分	特征值	贡献率/%	累计贡献率/%	特征向量			
				过氧化物酶	超氧化物歧化酶	过氧化氢酶	丙二醛
F1	1.79	47.49	47.49	-0.69	0.66	0.79	-0.60
F2	1.21	34.78	82.27	-0.36	0.35	0.42	-0.32

表6 12个WL系列不同休眠级苜蓿品种抗寒指标隶属函数分析

Table 6 Membership function analysis of cold resistance indexes of 12 WL alfalfa varieties with different fall dormancy levels

品种	$\mu(X_1)$	$\mu(X_2)$	D值	排序
WL168HQ	1.00	0.81	0.92	1
WL298HQ	0.34	0.85	0.55	3
WL319HQ	0.47	0.48	0.47	4
WL329HQ	0.56	0.59	0.57	2
WL349HQ	0.32	0.56	0.42	5
WL354HQ	0.00	0.55	0.23	10
WL358HQ	0.07	0.78	0.37	6
WL343HQ	0.06	0.43	0.22	11
WL377HQ	0.52	0.00	0.30	8
WL363HQ	0.11	0.37	0.25	9
WL366HQ	0.32	0.30	0.31	7
WL440HQ	0.24	0.19	0.21	12
权重	0.57	0.43		

3.1 低温胁迫对不同品种苜蓿 POD 活性的影响

POD在细胞保护酶系统中主要起到降低过氧化物的作用^[24],申晓慧等^[27]研究田间低温胁迫下POD活性的变化,结果表明随着季节温度降低,POD活性上升;杨秀芳等^[26]对越冬前后的苜蓿POD活性研究表明,随着低温胁迫加剧,苜蓿体内的POD活性增加,抗寒性增强。本研究发现,随着低温胁迫的程度加深,不同品种苜蓿体内的POD活性呈上升趋势,其中WL329HQ、WL168HQ和WL377HQ 3个品种的POD活性较高,与其他品种之间差异显著($P < 0.05$),与申晓慧等^[27]和杨秀芳等^[28]的研究结果相一致。对POD和MDA的相关性分析发现,不同低温处理下POD活性与MDA含量呈负相关但差异不显著,这与张庆昕等^[29]的研究一致,说明在低温胁迫下POD的活性越高,MDA的含量越低,苜蓿抵抗寒冷的能力就越强。崔国文等^[30]的研究表明,随着秋末温度下降,POD活性呈增加趋势,但POD活性与抗寒性不呈正相关关系,这与本研究不一致,说明不同品种苜蓿材料POD活性差异显著。

3.2 低温胁迫对不同品种苜蓿 CAT 活性的影响

CAT可以将低温胁迫下产生的 H_2O_2 分解成水^[29-31]。当前学者关于CAT的研究较少,杨秀娟^[26]

对不同品种的苜蓿的低温胁迫研究表明,2个紫花苜蓿品种根颈中CAT活性均随着温度的降低而呈现先上升后下降的趋势,在初冬时达到最大值,进入深冬,则有不同程度的波动,且活性下降明显。张玉霞等^[18]对4个紫花苜蓿品种和1个黄花苜蓿的低温胁迫抗寒性评价研究表明,随着低温胁迫加剧,黄花苜蓿和4个紫花苜蓿品种CAT活性呈增加的趋势,这与本研究相一致。本研究发现,随着低温胁迫的程度加剧,不同品种体内的CAT活性增加,WL168HQ和WL354HQ的CAT活性较高,说明在低温胁迫下,CAT的活性更高,对低温的适应性更好。但这与杨秀娟^[26]等的研究结果不一致,这可能与其试验中设置的季节性低温胁迫温度较低,超出了本试验中设置的最低胁迫温度有关,造成结果出现差异。相关性分析研究表明,不同低温处理下CAT活性与丙二醛含量呈显著正相关($P < 0.05$)。低温胁迫下,苜蓿根颈CAT的变化规律还需要进一步研究。

3.3 低温胁迫对不同品种苜蓿 SOD 活性的影响

当植物受到低温胁迫时,会产生大量的活性氧(ROS),ROS能参与各种新陈代谢,是调控细胞生长及死亡的第二信使,在正常的生长环境中,ROS在植物体内应处于动态平衡的状态;低温胁迫下,ROS的大量产生会造成DNA受损、蛋白质失活、细胞膜质过氧化甚至细胞功能紊乱、死亡等一系列生化反应^[31],SOD作为清除ROS的第一道防线,能将超氧阴离子(O_2^-)歧化为过氧化氢(H_2O_2),其活性的强弱直接影响了植物的抗寒性^[32-33];范玉贞^[34]在对自然低温胁迫下的白三叶的抗寒性研究表明,随着低温胁迫加剧,SOD活性先上升后下降。冯昌军等^[35]研究表明,随着低温胁迫时间的延长,SOD活性呈先增加后降低的变化趋势,抗寒性强的苜蓿品种维持较高的SOD活性。本研究发现,随着低温胁迫的温度降低,SOD活性呈上升趋势,且WL168HQ和WL363HQ与其他品种的SOD活性差异显著($P < 0.05$),这与范玉贞^[34]和冯昌军等^[35]的研究结果不一致,可能是由于供试品种存在差异导致结果不同;张玉霞等^[18]的研究表明,低温胁迫下黄花苜蓿和“北极熊”紫花苜蓿的SOD活性呈上升趋势,这与本研究相一致。通过相关性分析的研究表明,不同低温处理下SOD活性与MDA含量呈显著正相关($P < 0.05$),这与申晓慧等^[27]的研究结果一致,

说明在低温胁迫下, SOD活性越高的品种, 对于低温的适应能力越强。

3.3 低温胁迫对不同品种苜蓿MDA含量的影响

植物受到低温胁迫时会发生膜质过氧化, 膜质过氧化最终的产物为MDA, 因此根颈细胞中MDA含量的高低一定程度上反映了细胞受伤害的程度^[20,36], 本研究表明, 随着温度的降低, 苜蓿根颈的MDA含量逐渐增加, 这说明低温胁迫会破坏细胞的结构, 温度越低, 细胞的膜质过氧化过程越剧烈, 细胞内积累的有毒有害物质就越多, 李双铭等^[37]在对结缕草的研究中也得出了与本研究相一致的结论。本研究表明, 低温胁迫下, 抗寒性较强的品种如WL168HQ、WL298HQ等根颈细胞的MDA含量较低, 抗寒性较弱的苜蓿品种如WL440HQ和等根颈细胞的MDA含量较高, 这与孙予璐等^[38]的研究相一致, 说明抗寒性强的品种体内的抗氧化酶活性较高, 能够及时消除低温胁迫产生的有害物质, 对低温的适应能力更强。通过相关分析研究表明, 低温胁迫下, MDA含量与SOD活性和CAT活性呈显著负相关($P < 0.05$), 这与张庆昕等^[29]研究结果相一致, 说明低温胁迫下SOD和CAT活性越强, 根颈细胞的MDA含量越低, 根颈抗寒性就越强。

3.4 苜蓿耐寒种质资源综合评价方法的选择

采用隶属函数进行抗寒性综合评价是当前研究中较适宜的评价方法。岳亚飞等^[39]利用隶属函数法对4个苜蓿品种抗寒性进行了综合评价, 得出品种皇后和巨能551抗寒性较强。王晓龙等^[40]运用隶属函数法对6个苜蓿品种萌发期耐寒性进行评价, 确定龙牧801和草原3号的萌发期耐低温能力较强。本研究通过隶属函数法对12个苜蓿品种进行综合评价得出WL168HQ、WL298HQ和WL329HQ为抗寒性较强品种。

4 结论

1) 对12个苜蓿品种的抗氧化酶和丙二醛的研究表明, 随着低温胁迫的加剧, 抗氧化酶的活性呈上升趋势, 丙二醛的含量呈增加趋势。

2) 运用隶属函数法综合评价得出, 品种抗寒性强弱顺序为WL168HQ>WL329HQ>WL298HQ>WL319HQ>

WL349HQ > WL358HQ>WL366HQ>WL377HQ>WL363HQ>WL354HQ>WL343HQ>WL440HQ。

综上, 建议科尔沁沙地种植WL系列苜蓿品种为WL168HQ、WL319HQ、WL329HQ和WL298HQ。

参考文献:

- [1] 韩国栋.《苜蓿简史稿》《苜蓿通史稿》[J]. 草原与草业, 2022,34(3):66.
- [2] 殷秀杰, 崔国文. 北方寒区苜蓿冻害原因及其防御措施[J]. 饲料博览, 2006(4):31-33.
- [3] 孟季蒙, 尹君亮. 新疆紫花苜蓿引种筛选研究[J]. 草原与草坪, 2006(2):59-61.
- [4] 豆艳丽, 钱续, 房耀武. 美国“WL”系列苜蓿品种在榆中县的引种试验[J]. 甘肃畜牧兽医, 2017, 47(3):103-104+112.
- [5] 王运涛, 孟德斌, 于林清, 等. 8个紫花苜蓿材料在呼和浩特地区的抗寒性和生产性能比较[J]. 中国草地学报, 2022,44(6):60-66.
- [6] Zhang H, Dong J, Zhao X, *et al.* Research Progress in Membrane Lipid Metabolism and Molecular Mechanism in Peanut Cold Tolerance [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019,10:838.
- [7] 梁慧敏, 夏阳, 杜峰, 等. 低温胁迫对草地早熟禾抗性生理生化指标的影响[J]. 草地学报, 2001(4):283-286.
- [8] 陈卫东, 张玉霞, 丛百明, 等. 磷肥对冷冻胁迫下紫花苜蓿根颈抗氧化特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021,49(12):58-66.
- [9] 夏全超, 张玉霞, 孙明雪, 等. 磷肥施用深度对苜蓿根颈抗氧化酶活性及抗寒性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022,50(7):41-47.
- [10] 朱爱民, 黄卫丽, 韩国栋, 等. 不同根颈直径苜蓿生理生化特性对低温胁迫的响应[J]. 草地学报, 2021,29(10):2214-2220.
- [11] 王晓龙, 杨翌, 来永才, 等. 8个苜蓿品种对低温胁迫的生理响应及抗寒性评价[J]. 中国草地学报, 2023,45(8):60-69.
- [12] 童长春, 刘晓静, 运向凯, 等. 苜蓿品种抗寒性与休眠级的相关性研究[J]. 草原与草坪, 2020,40(6):84-88+94.
- [13] 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.
- [14] 马文馨, 宋谦, 田新会, 等. 小黑麦不同材料的抗寒性评

- 价[J]. 草原与草坪, 2019, 39(3):85-91.
- [15] 陈卫东. 末次刈割时间调控苜蓿越冬的生理机制及抗寒性综合评价[D]. 通辽:内蒙古民族大学, 2022.
- [16] 常生龙, 李天银, 陈永岗, 等. 科尔沁沙地12个紫花苜蓿品种适应性研究[J]. 草原与草业, 2023, 35(2):33-39.
- [17] 孙明雪, 张玉霞, 丛百明, 等. 不同苜蓿的抗寒性差异及其与糖类物质含量的相关性研究[J]. 草地学报, 2021, 29(2):303-308.
- [18] 张玉霞, 丛百明, 王显国, 等. 苜蓿抗寒性与根系抗氧化酶活性相关性分析[J]. 草地学报, 2021, 29(2):244-249.
- [19] 陈卫东, 张玉霞, 丛百明, 等. 低温胁迫对不同苜蓿品种生理特性的影响[J]. 中国草地学报, 2021, 43(7):115-120.
- [20] 朱爱民, 张玉霞, 王显国, 等. 沙地生境不同苜蓿品种形态特征对低温的响应及其与抗寒性关系[J]. 草地学报, 2018, 26(6):1400-1408.
- [21] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 2000:129-174
- [22] 赵一航, 孟令东, 张晓萌, 等. 4个紫花苜蓿品种对低温胁迫的生理响应及抗寒性评价[J]. 草业科学, 2021, 38(4):683-692.
- [23] 曹昀, 郑祥, 杨阳, 等. 淹水对灰化苔草幼苗生长及抗氧化酶活性的影响[J]. 生态学杂志, 2016, 35(12):3273-3278.
- [24] 魏鑫, 王升, 王宏光, 等. 低温胁迫下不同类型蓝莓品种的抗寒性研究[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(19):131-137.
- [25] 陶雅, 孙启忠. 不同紫花苜蓿品种可溶性糖、全氮、丙二醛含量动态变化及其与抗寒性关系研究[J]. 中国农业科技导报, 2008(S1):56-60.
- [26] 杨秀娟. 紫花苜蓿抗寒性评价及其对秋冬季节低温适应性[D]. 北京:北京林业大学, 2006.
- [27] 申晓慧, 姜成, 冯鹏, 等. 寒区6个紫花苜蓿品种根系中MDA含量及抗氧化酶活性的比较研究[J]. 作物杂志, 2015(4):88-91.
- [28] 杨秀芳, 梁庆伟, 娜日苏, 等. 钾肥对紫花苜蓿越冬前后根颈抗氧化酶系统及丙二醛含量的影响[J]. 饲料研究, 2022, 45(7):72-74.
- [29] 张庆昕, 张玉霞, 孙明雪, 等. 钾肥对苜蓿低温胁迫下抗氧化酶活性的影响[J]. 中国农业科技导报, 2023, 25(8):186-195.
- [30] 崔国文. 紫花苜蓿田间越冬期抗寒生理研究[J]. 草地学报, 2009, 17(2):145-150.
- [31] Ao P, Li Z, Fan D, *et al.* Involvement of antioxidant defense system in chill hardening-induced chilling tolerance in *Jatropha curcas* seedlings [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(1):153-160.
- [32] 魏婧, 徐畅, 李可欣, 等. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. 植物生理学报, 2020, 56(12):2571-2584.
- [33] 张小英, 卫智军, 陈立波, 等. 四个紫花苜蓿品种对秋冬低温条件的生理适应性[J]. 中国草地学报, 2008(3):48-51.
- [34] 范玉贞. 自然低温胁迫对白三叶草的膜损伤与SOD活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(2):404-405+409.
- [35] 冯昌军, 罗新义, 沙伟, 等. 低温胁迫对苜蓿品种幼苗SOD、POD活性和脯氨酸含量的影响[J]. 草业科学, 2005(6):29-32.
- [36] 孙明雪, 张玉霞, 丛百明, 等. 水磷组合对紫花苜蓿根颈抗氧化特性及越冬率的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2022, 50(12):9-17.
- [37] 李双铭, 徐庆国, 杨勇, 等. 低温胁迫对结缕草抗氧化酶活性和脂肪酸含量的影响[J]. 草地学报, 2019, 27(4):906-912.
- [38] 孙予璐, 李建东, 孙备, 等. 不同品种紫花苜蓿主要抗寒生理指标对低温的响应[J]. 沈阳农业大学学报, 2017, 48(5):591-596.
- [39] 岳亚飞, 王旭哲, 苗芳, 等. 覆雪厚度对不同秋眠级苜蓿抗寒性及越冬率的影响[J]. 草业学报, 2016, 25(8):98-106.
- [40] 王晓龙, 杨翌, 李红, 等. 6个苜蓿品种种子萌发对低温的响应[J]. 中国草地学报, 2022, 44(7):79-86.

Antioxidant characteristics and cold resistance evaluation of WL series alfalfa varieties under low temperature stress

LIU Ze-yu¹, SUI Ke¹, YUAN Zi-tong¹, ZHANG Yu-xia¹, LIU Ting-yu¹,
SHAN Xin-he², ZHANG Zhi-yong³, WANG Xian-guo^{2*}

(1. College of Prataculture, Inner Mongolia Minzu University/Inner Mongolia Autonomous Region Forage Crop Engineering Technology Research Center, Tongliao 028000, China; 2. College of Grassland Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China; 3. Tongliao Institute of Agricultural and Animal Husbandry Sciences, Tongliao 028000, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the physiological responses of alfalfa to low-temperature stress and to identify varieties with high cold resistance. 【Method】 Twelve alfalfa varieties of the 'WL' series from the United States were selected as test materials and planted in the Horqin sandy land. Alfalfa overwintering materials were dug prior to overwintering in order to simulate 4 °C (CK) and -20 °C low temperature stress treatment. Malondialdehyde (MDA) content and the activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and peroxidase (POD) in the root neck were measured. Cold resistance was evaluated using correlation analysis, principal component analysis, and membership function analysis. 【Result】 The results showed that compared with the control, the activities of SOD, CAT and POD and the content of MDA in all 12 alfalfa varieties increased under low temperature stress. Compared with other varieties of alfalfa, WL168HQ, WL298HQ and WL354HQ showed relatively higher antioxidant enzyme activity and lower MDA content. Correlation analysis of antioxidant enzyme activities and malondialdehyde content revealed that CAT and SOD had significant negative correlations with MDA under low-temperature stress ($P < 0.05$). 【Conclusion】 Based on membership function analysis, the cold resistance of the 12 varieties was: WL168HQ > WL329HQ > WL298HQ > WL319HQ > WL349HQ > WL358HQ > WL366HQ > WL377HQ > WL363HQ > WL354HQ > WL343HQ > WL440HQ. It is recommended to choose WL168HQ, WL298HQ, WL319HQ, and WL329HQ alfalfa varieties for planting WL series alfalfa varieties in Horqin sandy land, due to their low fall dormancy level and high cold resistance

Key words: alfalfa; varieties; low temperature stress; antioxidant properties; cold resistance; MDA

(责任编辑:康宇坤)