东北农业科学　2025,50(5):76-85
Journal of Northeast Agricultural Sciences　DOI: 10.16423/j.cnki.1003-8701.2025.05.013

基于主成分对21份杂花苜蓿种质抗寒性综合评价

高　山[1],王　涛[1],郭兴玉[1],闫程铭[1],连　植[1],杨越涵[1],陈艳涛[2],李忠和[1],
于洪柱[1]*,朴红梅[3]*
(1. 吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)草地与生态研究所,吉林 公主岭 136100;2. 吉林省智成农业科技有限公司,长春 130033;3. 吉林省农业科学院(中国农业科技东北创新中心)农业经济与信息研究所,长春 130033)

摘　要:为筛选耐寒性较强的杂花苜蓿育种材料并探究其根系在抗寒过程中的生理响应机制,本研究选取了21份杂花苜蓿种质材料,以耐寒性较强的紫花苜蓿品种公农1号和公农5号为对照。在自然寒冷条件下,测定了杂花苜蓿根颈部位的过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、游离脯氨酸(Pro)和可溶性糖(SS)含量。采用主成分分析和隶属函数相结合的方法,对杂花苜蓿根部的低温耐受能力进行了综合评价。结果表明,在越冬期低温胁迫下,杂花苜蓿根部6个生理指标的变异系数介于16.71%~39.37%。通过主成分分析和隶属函数综合评价,筛选出9份耐寒性较好的杂花苜蓿种质资源。进一步以不同生理指标为因变量、综合评价值(*D*)为自变量构建了回归模型,并对*D*值进行聚类分析,将材料划分为3大类群。

关键词:杂花苜蓿;根系;生理特性;综合评价
中图分类号:S551.035.3　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:2096-5877(2025)05-0076-10

Comprehensive Evaluation of Cold Resistance in 21 *Medicago varia* Germplasm Based on Principal Components

GAO Shan[1], WANG Tao[1], GUO Xingyu[1], YAN Chengming[1], LIAN Zhi[1], YANG Yuehan[1], CHEN Yantao[2],
LI Zhonghe[1], YU Hongzhu[1]*, PIAO Hongmei[3]*
(1. *Institute of Grassland and Ecology, Jilin Academy of Agricultural Sciences*(*Northeast Agricultural Research Center of China*), *Gongzhuling* 136100; 2. *Jilin Zhicheng Agricultural Science and Technology Co., Ltd., Changchun* 130033; 3. *Institute of Agricultural Economy and Information, Jilin Academy of Agricultural Sciences*(*Northeast Agricultural Research Center of China*), *Changchun* 130033, China)

Abstract: To screen *Medicago varia* breeding materials with strong cold resistance and explore the physiological response mechanisms of their root systems under low-temperature stress, 21 Medicago varia germplasm accessions were selected in this study, with two cold-resistant *Medicago sativa* cultivars(Gongnong No. 1 and Gongnong No. 5) as controls. Under low-temperature stress conditions, the contents of catalase(CAT), peroxidase (POD), superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), free proline(Pro), and soluble sugar(SS) in the root crown of Medicago varia were measured. A comprehensive evaluation of the low-temperature tolerance of *Medicago varia* roots was conducted using principal component analysis and membership function analysis. The results showed that under low-temperature stress during the overwintering period, the variation coefficients of the six physiological indicators in Medicago varia roots ranged from 16.71% to 39.37%. Through principal component analysis and membership function evaluation, nine *Medicago varia* accessions with good cold resistance were identified. Furthermore, a regression model was constructed using different physiological indicators as dependent variables and the comprehensive evaluation value *D* as the independent variable. Cluster analysis of the *D* values

收稿日期:2024-10-29
基金项目:吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2024ZD013);吉林省农业科学院"院所基金项目"(E32014309);吉林省科技发展计划项目(20240303065NC)
作者简介:高　山(1991-),男,助理研究员,硕士,主要从事牧草育种研究。
通信作者:于洪柱,E-mail: y22080@163.com
朴红梅,E-mail: 627698256@qq.com

divided the materials into three major groups. This study provides theoretical basis and reference for the breeding of cold-resistant alfalfa varieties.

Key words: *Medicago varia*; Root; Physiological property; Comprehensive evaluation

杂花苜蓿(*Medicago varia*)是一种具有高产、优质、适口性好等特性的多年生豆科牧草,素有“牧草之王”的美誉[1-3]。近年来,随着我国奶业振兴和粮改饲等政策的实施,紫花苜蓿在饲草产业与生态建设中的种植地位日益凸显,其人工种植面积持续扩大[4]。然而,吉林省由于地处高海拔、高纬度地区,全年气温偏低,苜蓿在返青期易发生冻害,严重制约了产业的快速发展[5-6]。因此选育耐寒性强的苜蓿品种已成为北方牧草产业亟待解决的关键问题。

植物的耐寒性是长期自然选择过程中形成的适应性特征,主要体现在表型和生理生化两个方面。当环境温度降低时,植物会启动一系列复杂的代谢反应来应对外界变化。其中,表型变化可直接观察,而生理变化则需要通过实验手段检测。研究表明,植物在低温胁迫下会通过增加渗透调节物质含量来抵御伤害[7-8]。可溶性糖含量与植物的越冬能力密切相关,是评价品种耐寒性的重要指标[9]。游离脯氨酸作为主要的渗透调节物质,在低温条件下会大量积累,以维持细胞内的渗透平衡[10]。此外,活性氧代谢也是植物响应低温胁迫的重要机制。抗氧化酶系统(过氧化氢酶、过氧化物酶和超氧化物歧化酶)在清除活性氧、维持氧化还原平衡方面发挥关键作用[11]。同时,丙二醛(MDA)作为膜脂过氧化的产物,其含量可间接反映细胞膜受损程度,研究表明MDA含量较低的品种通常具有更强的耐寒性[12]。

目前,苜蓿耐寒性评价主要依赖于越冬率和返青率等表型指标,难以对入冬后的耐寒机制进行精准评估。考虑到根系作为养分储存器官对苜蓿越冬和再生的重要影响[13-15],本研究拟从根部生理指标入手,建立更全面的耐寒性评价体系。值得注意的是,现有研究多集中于紫花苜蓿品种的耐寒性评价,而对杂交后代杂花苜蓿种质资源的耐寒性研究较少[16]。因此,本研究以21份黄花苜蓿与紫花苜蓿杂交后代为材料,通过测定低温胁迫下根颈部的渗透调节物质含量、膜脂过氧化程度及保护酶活性等指标,系统探究不同苜蓿品系的低温响应机制,并对其耐寒性进行综合评价,以期为优质耐寒苜蓿品种的选育提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　试验地概况

试验地设在吉林省农业科学院草地与生态研究所牧草试验基地。公主岭试验地2024年12月平均温度为-15~-4 ℃,极端高温12月1日为4 ℃,极端低温12月18日为-21 ℃。土壤有机质含量为2.70%,全氮含量为0.14%,全磷含量为0.12%,速效氮含量为105.4 mg/kg,速效磷含量为20.8 mg/kg,总孔隙度为48.64%,容重为1.20 g/cm^3。

1.2　供试材料

供试材料1~21号来自吉林省农业科学院草地与生态研究所(表1),母本为紫花苜蓿MS-GN、

表1　苜蓿杂交组合配置

Table 1 Medicago sativa hybridization configuration

杂交组合 Hybridized combination	父本(野生单株) Parent(wild monoculture)	母本(不育系) Maternal(infertility lineage)	组合 Combination
1	YS-1	MS-GN	YS-1xGN
2	YS-4	MS-GN	YS-4xGN
3	YS-7	MS-GN	YS-7xGN
4	YS-9	MS-GN	YS-9xGN
5	YS-10	MS-GN	YS-10xGN
6	YS-12	MS-GN	YS-12xGN
7	YS-15	MS-GN	YS-15xGN
8	YS-18	MS-GN	YS-18xGN
9	YS-21	MS-GN	YS-21xGN
10	YS-23	MS-GN	YS-23xGN
11	YS-25	MS-GN	YS-25xGN
12	YS-26	MS-GN	YS-26xGN
13	YS-29	MS-GN	YS-29xGN
14	YS-32	MS-GN	YS-32xGN
15	YS-34	MS-GN	YS-34xGN
16	YS-37	MS-GN	YS-37xGN
17	YS-41	MS-GN	YS-41xGN
18	YS-44	MS-GN	YS-44xGN
19	YS-50	MS-GN	YS-50xGN
20	YS-51	MS-GN	YS-51xGN
21	YS-55	MS-GN	YS-55xGN

父本为收集的野生黄花苜蓿资源，杂交子代在大安盐碱化草甸进行了比较和筛选，表现优良的株系进行了繁育。对照22、23号材料分别为耐寒较强的公农1号紫花苜蓿和公农5号紫花苜蓿。

1.3 试验设计

试验小区于2023年5月进行人工条播，播深2~3 cm，小区面积为15 m^2(3 m×5 m)，行距30 cm，采用随机区组设计，重复3次。播前试验区未施肥，播后及时镇压。于土壤封冻期12月15日田间挖取长势均匀的苜蓿根颈组织迅速投入液氮并保存于−80 ℃冰箱，用于测定抗寒性相关的各项生理指标。

1.4 测定指标及方法

过氧化氢酶(CAT)活性采用紫外吸收法测定，过氧化物酶(POD)活性采用愈创木酚法测定，超氧化物歧化酶(SOD)活性采用氮蓝四唑光化还原法测定，丙二醛(MDA)含量采用硫代巴比妥酸法测定，可溶性糖(SS)含量采用蒽酮法测定，游离脯氨酸(Pro)含量采用茚三酮法测定。

1.5 数据分析

1.5.1 苜蓿生理指标主成分的标准化数值

$$Z\text{-}score\left(X_j\right)=\frac{X_j-\bar{X}}{\sigma}\ \left(j=1,2,\cdots n\right)\cdots\cdots\cdots(1)$$

$$Z\text{-}score\left(X_j\right)=\frac{\bar{X}-X_j}{\sigma}\ \left(j=1,2,\cdots n\right)\cdots\cdots\cdots(2)$$

式中，$Z\text{-}score(X_j)$为第j个综合指标值的标准化数值；X_j为第j个综合指标值；$\bar{X}$表示第j个指标平均值。测定指标与抗寒性呈正相关，用公式(1)计算；测定指标与抗寒性呈负相关，用公式(2)计算。

1.5.2 苜蓿根部生理指标的隶属函数

$$\mu\left(X_j\right)=\frac{X_j-X_{\min}}{X_{\max}-X_{\min}}\ \left(j=1,2,\cdots n\right)\cdots\cdots\cdots(3)$$

式中，$\mu(X_j)$为第j个指标值的隶属函数值；X_j为第j个指标值；X_{min}表示第j个指标最小值；X_{max}表示第j个指标最大值。

1.5.3 苜蓿根部生理指标的权重

$$W_j=\frac{V_j}{\sum_j^m V_j}\cdots\cdots\cdots(4)$$

式中，W_j表示权重为第j个指标在所有指标中的重要程度；V_j为经过主成分分析所得第j个指标的贡献率。

1.5.4 苜蓿根部综合耐低温D值

$$D=\sum_j^n \mu X_j\times W_j\ \left(j=1,2,\cdots n\right)\cdots\cdots\cdots(5)$$

式中，D为各苜蓿种质材料所得的抗寒性综合评价值。

1.5.5 苜蓿根部综合指标主成分分析

$$F_1=a_{11}x_1+a_{12}x_2+\cdots+a_{1n}x_p\cdots\cdots\cdots(6)$$

$$F_2=a_{21}x_1+a_{22}x_2+\cdots+a_{2n}x_p\cdots\cdots\cdots(7)$$

$$F_m=a_{n1}x_1+a_{n2}x_2+\cdots+a_{nn}x_p\cdots\cdots\cdots(8)$$

式中，$F_m(m=1,2,3,\cdots,m)$是主成分分析中的因变量；$X_{ij}(i=1,2,3,\cdots,n;j=1,2,3,\cdots,p)$是抗寒的指标标准化数据。

使用Microsoft Excel 2010软件进行数据处理并制作表格，Origin 2022进行作图；用DPS 7.0软件进行相关性分析、主成分分析、隶属函数分析、聚类分析；SPSS 20.0逐步回归分析。

2 结果与分析

2.1 低温环境不同苜蓿杂花苜蓿根颈生理指标变异统计

低温环境下不同苜蓿杂花苜蓿根颈部6个生理指标变异统计显示(表2)，同一生理指标在杂花苜蓿中存在较大差异。各生理指标变异系数介于16.71%~39.37%，表明所测定指标对于低温胁迫的响应程度各不相同。其中，CAT和MDA在6个

表2 低温下杂花苜蓿根颈生理指标变异统计

Table 2 Variation statistics of root neck physiological index of alfalfa strain at low temperature

生理指标 Physiological indicator	平均值 Average	标准差 SD	极小值 Min	极大值 Max	变异系数/% CV
CAT	868.11	41.14	464.62	1 720.13	39.37
POD	63 633.69	679.01	29 781.11	110 032.22	31.06
SOD	403.87	15.12	216.87	697.39	31.10
MDA	130.08	6.13	49.25	213.33	39.16
Pro	963.50	36.55	489.41	1 803.95	31.52
SS	87.13	1.75	50.59	118.68	16.71

指标中具有较大的变异系数,分别为39.37%和39.16%,SS的变异系数最小,仅为16.71%。

2.2　低温环境不同杂花苜蓿根颈生理指标相关性分析

低温下不同杂花苜蓿根颈生理指标相关性分析显示(表3),MDA含量分别与CAT和POD呈极显著正相关($P<0.05$),相关系数分别为0.251和0.294;SS含量与SOD呈极显著正相关($P<0.05$),相关系数为0.243。其余生理指标间未见显著性差异。

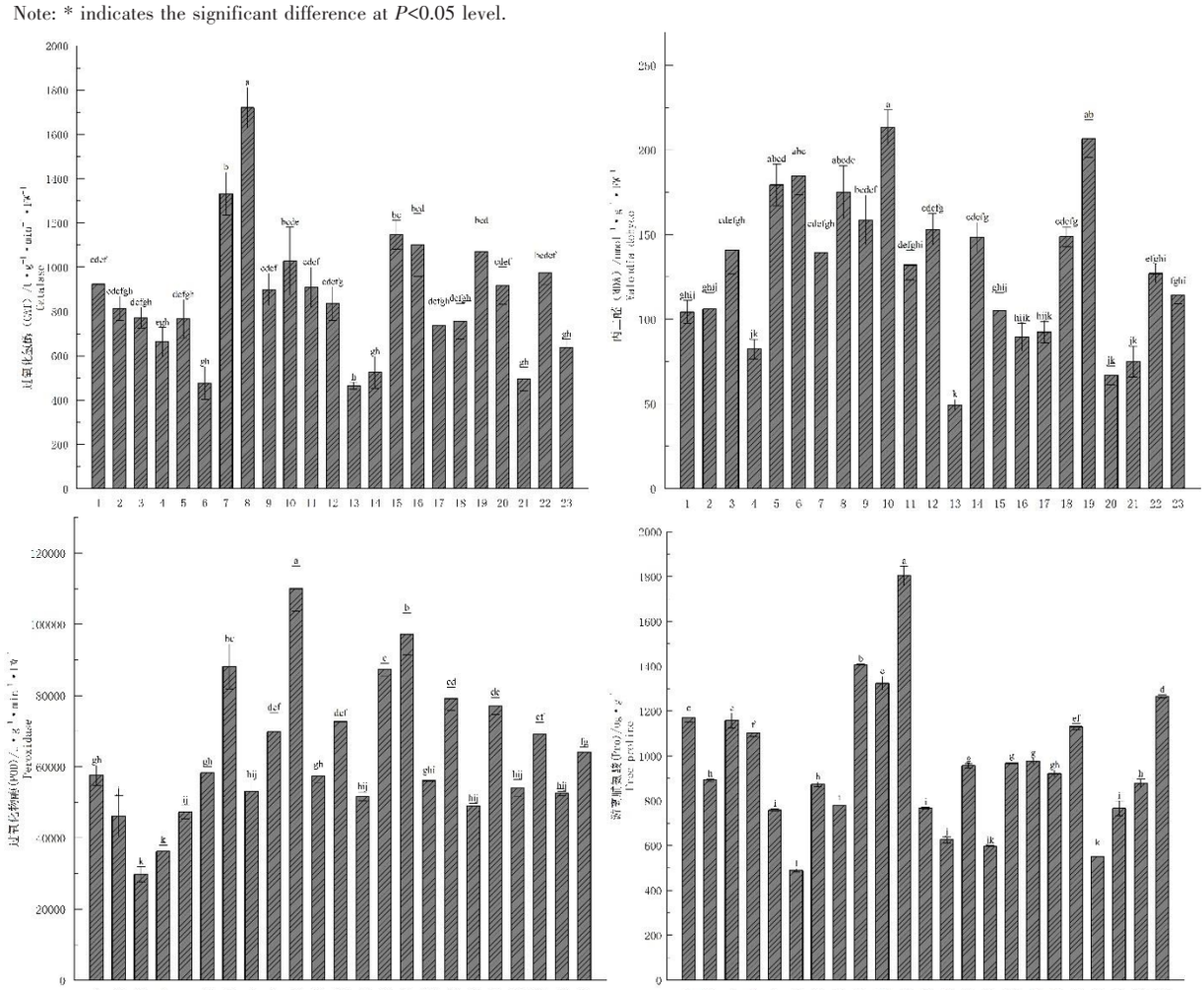
表3　低温下杂花苜蓿根颈生理指标相关性分析

Table 3 Correlation analysis of physiological indexes of root neck of mixed strain at low temperature

生理指标 Physiological indicator	CAT	POD	SOD	MDA	Pro	SS
CAT	1					
POD	0.186	1				
SOD	0.089	0.085	1			
MDA	0.251*	0.294*	0.128	1		
Pro	0.056	0.048	−0.180	0.183	1	
SS	0.235	0.175	0.243*	0.201	0.201	1

注:*表示$P<0.05$水平下差异显著。

Note: * indicates the significant difference at $P<0.05$ level.



注:柱形标注不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。

Note: Columns marked with different lower case letters indicate significant differences($P<0.05$), the same below.

图1　杂化苜蓿根颈CAT、POD、SOD酶活性和MDA含量变化

Fig.1 Changes in CAT, POD, SOD enzyme activity and MDA content in the roots of hybrid alfalfa

2.3 低温环境不同杂花苜蓿品系根颈中3种抗氧化酶活性和MDA的比较

由图1可知，低温对不同杂花苜蓿根颈抗氧化酶活性和MDA含量存在显著差异性。其中，杂花苜蓿8号的CAT含量最高，较对照品种22号高76.24%，较对照品种23号高169.57%，且差异均达显著水平(P<0.05)。杂花苜蓿7号的CAT含量较对照23号高108.86%，差异达显著水平(P<0.05)。由此可知，7号和8号杂花苜蓿具有较高的CAT活性；杂花苜蓿7、10、14、15、17、19号的POD活性显著高于两个对照品种(P<0.05)，表明这几个杂花苜蓿具有较高POD活性；杂花苜蓿18、20号的SOD活性均显著高于两个对照品种(P<0.05)，18号比22号和23号分别高49.46%和80.35%，20号比22号和23号分别高35.17%和63.11%，达差异达显著水平(P<0.05)。综合得知，杂花苜蓿18和20号材料具有较高的SOD活性；在MDA含量中发现，杂花苜蓿4、13、20、21号的MDA含量均显著低于两个品种，且差异均达显著水平(P<0.05)。由此可知，杂花苜蓿4、13、20、21号具有较低的MDA含量。

2.4 低温环境不同杂花苜蓿品系根颈中主要渗透调节物质含量的变化

由图2可知，杂花苜蓿9、10、11号的Pro含量均显著高于两个对照品种(P<0.05)。而杂花苜蓿1、3、4、14、16、17、19号的Pro含量显著高于对照品种22号(P<0.05)。综合得知，杂花苜蓿9、10、11号材料具有较高的Pro含量；除杂花苜蓿4号和13号外，其余品系的SS含量均显著高于对照22号(P<0.05)。杂花苜蓿1、8、14、17、18号的SS含量显著高于对照品种23号(P<0.05)。综合得知，杂花苜蓿1、8、14、17、18号材料具有较高的SS含量。

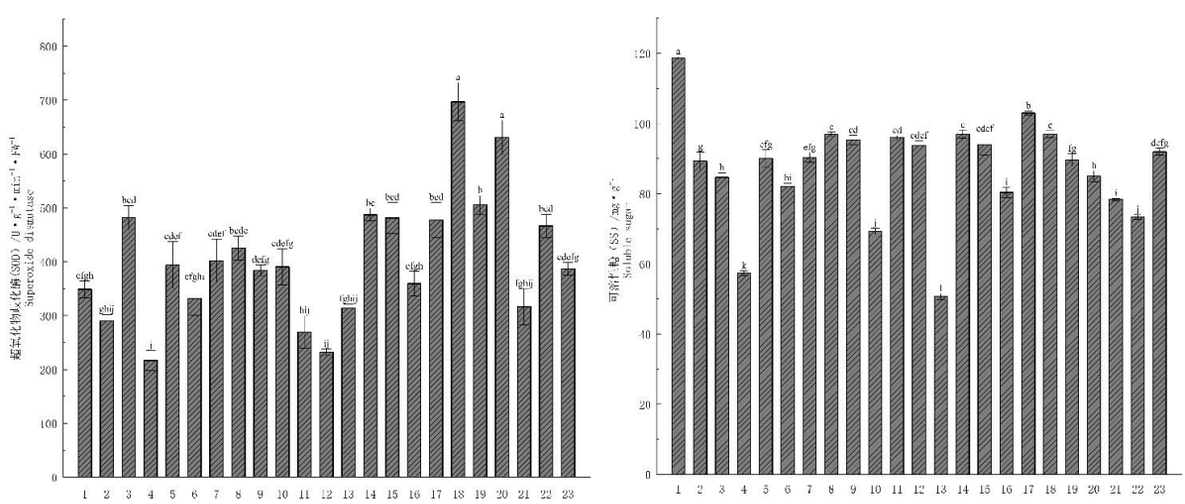


图2 杂花苜蓿根颈Pro和SS含量变化

Fig. 2 Pro and SS content changes in the hybrid lines

2.5 主成分分析

主成分分析结果表明(表4)，前两个主成分F1和F2的贡献率分别为49.39%和31.16%，由此，将6个单项指标转化为2个综合指标，累计贡献率为80.55%。其中，第一主成分(F1)对应的特征值为1.977，特征向量CAT、POD、MDA和SS是贡献较大的指标，分别为0.655、0.552、−0.698和0.668。第二主成分(F2)对应的特征值为1.248，特征向量主要由SOD(−0.734)和Pro(0.788)构成。主成分分析显示，CAT、POD、MDA、SS、SOD和Pro这6个指标进一步利用主成分载荷矩阵可得到主成分线性方程，分别为：F1=0.466CAT+0.393POD+0.287SOD−0.496MDA+0.281Pro+0.475SS；

F2=0.086CAT+0.023POD−0.657SOD−0.192MDA+0.706Pro−0.062SS。

2.6 隶属函数分析

为避免单一生理指标评价苜蓿耐低温性的片面性问题，本研究基于主成分分析方法，对21个苜蓿杂花苜蓿及两个对照品种进行隶属函数综合评价，表5结果表明，综合评价D值同时高于公农1号和公农5号两个对照品种的杂花苜蓿顺序依次为：10号>11号>19号>9号>8号>7号>1号>12号>14号。

2.7 聚类分析

根据隶属函数D值对不同杂花苜蓿进行聚类分析(图3)，当分类值D=12时，可将23个苜蓿材料划分为3类，类群Ⅰ包括品系1、7、8、9、10、11、19号，主要表现为CAT、POD、Pro和SS含量较高；第

表4　主成分分析表

Table 4 Principal component analysis table

生理指标 Physiological indicator	特征向量 Feature vector		线性载荷系数 Linear load coefficient	
	F1	F2	F1	F2
CAT	0.655	−0.096	0.466	−0.086
POD	0.552	0.026	0.393	0.023
SOD	0.404	−0.734	0.287	−0.657
MDA	−0.698	−0.215	−0.496	−0.192
Pro	0.306	0.788	0.218	0.706
SS	0.668	−0.069	0.475	−0.062
特征值	1.977	1.248		
贡献率/%	49.39	31.16		
累计贡献率/%	49.39	80.55		

表5　主成分得分值及隶属函数

Table 5 Principal component scores and membership functions

品系 Strain	F1	F2	μ1	μ2	*D*值 *D* value	*D*排序 *D* sort
1	0.721 0	0.527 0	0.776 4	0.589 3	0.704 0	7
2	−0.980 2	0.363 4	0.462 2	0.557 9	0.499 2	17
3	−0.469 8	0.055 7	0.556 5	0.499 0	0.534 2	15
4	−2.784 2	1.333 6	0.129 0	0.743 8	0.366 8	21
5	−0.016 1	−0.207 9	0.640 3	0.448 5	0.566 1	13
6	−0.809 9	−0.321 4	0.493 6	0.426 7	0.467 8	19
7	1.388 2	−0.278 8	0.899 6	0.434 9	0.719 8	6
8	1.910 4	−0.664 6	0.996 1	0.361 0	0.750 4	5
9	1.037 9	1.229 8	0.834 9	0.723 9	0.792 0	4
10	1.791 1	1.363 9	0.974 1	0.749 6	0.887 2	1
11	0.518 9	2.670 6	0.739 1	1.000 0	0.840 0	2
12	0.044 0	0.612 3	0.651 4	0.605 6	0.633 7	8
13	−3.482 4	−0.362 3	0.000 0	0.418 9	0.162 0	23
14	0.650 7	−0.323 3	0.763 4	0.426 4	0.633 0	9
15	1.011 1	−1.476 4	0.830 0	0.205 4	0.588 4	11
16	−0.563 0	0.034 6	0.539 2	0.494 9	0.522 1	16
17	0.391 3	−0.562 6	0.715 5	0.380 5	0.585 9	12
18	0.760 6	−1.716 2	0.783 7	0.159 5	0.542 2	14
19	1.931 5	0.087 7	1.000 0	0.505 1	0.808 5	3
20	−0.637 3	−2.548 5	0.525 5	0.000 0	0.322 2	22
21	−1.757 0	−0.045 7	0.318 7	0.479 5	0.380 9	20
22	−0.451 9	−0.551 6	0.559 8	0.382 6	0.491 2	18
23	−0.205 0	0.780 4	0.605 4	0.637 8	0.617 9	10
权重/%	49.39	31.16	61.31	38.69		

Ⅱ类群包括品系4、13、20、21号,主要表现为MDA含量较低;第Ⅲ类群包括品系2、3、5、6、12、14、15、16、17、18、22、23号,主要表现为SOD酶活性较高。

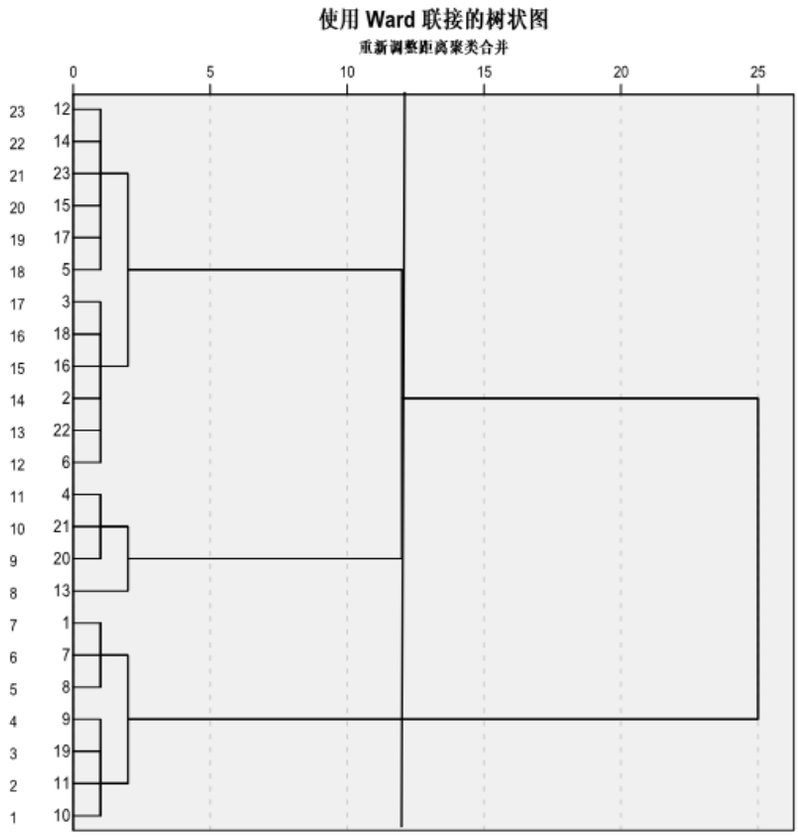


图3 杂花苜蓿品系*D*值聚类分析

Fig.3 Cluster analysis of *D* values of alfalfa lines

2.8 抗寒指标选择及回归模型建立

以隶属函数综合评价值(*D*)为变量,以CAT、POD、SOD、MDA、Pro和SS各单项标准化指标值为自变量进行回归分析,建立一元线性回归方程(表6):

表6 回归分析

Table 6 Regression analysis

生理指标 Physiological indicator	回归系数 Regression coefficient	标准回归系数 Standardized regression coefficient	*t*值 *t* value	*P*值 *P* value
常量	0.583 2		679.169 7	0.000 4
CAT	0.047 0	0.265 7	679.169 7	0.000 7
POD	0.046 7	0.263 5	690.199 6	0.000 5
SOD	−0.016 3	−0.092 2	234.902 8	0.000 1
MDA	−0.071 3	−0.403 2	998.711 2	0.000 1
Pro	0.077 8	0.439 3	1 126.907 5	0.000 2
SS	0.049 9	0.282 5	702.315 5	0.000 4

注:决定系数R^2=0.986 5。

Note: Determination coefficient R^2=0.986 5.

D=0.583 2+0.047 0CAT+0.046 7POD−0.016 3SOD−0.071 3MDA+0.077 8Pro+0.049 9SS,该方程呈极显著相关,其决定相关系数R^2=0.986 5,回归精度在91.64%~99.92%(表7),表明该回归方程模型精度较高。分析结果表明,6个单项指标对苜蓿材料耐低温均有显著影响。因此,上述6个指标可作为供试材料耐低温筛选的指标,与主成分分析结果一致。

表7　回归拟合精度分析

Table 7 Precision analysis of the regression fitting

品系 Strain	原始值 Raw value	回归值 Return value	拟合误差 Error of fitting	相对误差 Error of fitting	估计精度/% Estimated accuracy
1	0.704 0	0.704 5	−0.000 5	0.064 0	93.60
2	0.499 2	0.499 1	0.000 1	0.011 7	98.83
3	0.534 2	0.534 0	0.000 2	0.038 3	96.17
4	0.366 8	0.366 7	0.000 1	0.021 2	97.88
5	0.566 1	0.566 0	0.000 1	0.020 8	97.92
6	0.467 8	0.468 2	−0.000 4	0.083 6	91.64
7	0.719 8	0.720 3	−0.000 5	0.065 1	93.49
8	0.750 4	0.750 4	0.000 0	0.000 8	99.92
9	0.792 0	0.792 0	0.000 0	0.006 1	99.39
10	0.887 2	0.887 4	−0.000 2	0.021 0	97.90
11	0.840 0	0.840 0	0.000 0	0.001 8	99.82
12	0.633 7	0.633 2	0.000 5	0.081 0	91.90
13	0.162 0	0.162 0	0.000 0	0.014 6	98.54
14	0.633 0	0.633 2	−0.000 2	0.029 4	97.06
15	0.588 4	0.588 0	0.000 4	0.069 7	93.03
16	0.522 1	0.522 3	−0.000 2	0.032 6	96.74
17	0.585 9	0.585 7	0.000 2	0.040 1	95.99
18	0.542 2	0.542 3	−0.000 1	0.026 6	97.34
19	0.808 5	0.808 1	0.000 4	0.045 7	95.43
20	0.322 2	0.322 2	0.000 0	0.001 2	99.88
21	0.380 9	0.381 0	−0.000 1	0.021 7	97.83
22	0.491 2	0.491 3	−0.000 1	0.015 7	98.43
23	0.617 9	0.617 7	0.000 2	0.027 5	97.25

3　讨论与结论

3.1　抗氧化酶(CAT、POD、SOD)与丙二醛(MDA)对低温胁迫的响应机制

低温胁迫可诱导苜蓿植株产生一系列生理生化响应,其中抗氧化酶系统的激活是重要的防御机制。研究表明,在低温胁迫下,苜蓿体内的过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)等抗氧化酶活性显著增强,这些酶协同作用可有效清除过量积累的活性氧(ROS),从而减轻膜脂过氧化损伤。值得注意的是,不同苜蓿品种因其遗传特性差异,表现出不同程度的耐寒性,其中抗氧化酶活性较高的品种通常具有更强的抗逆能力[17]。前人研究证实,苜蓿根颈部在逆境条件下可产生较高的酶活性[18]。田永雷等[19]的研究进一步表明,低温胁迫可显著提高苜蓿根颈部的SOD、POD和CAT活性,这是植物抵御寒害的重要生理机制。因此,通过测定地下根部抗氧化酶活性来评价苜蓿耐低温能力,对筛选优良耐寒品种具有重要指导意义[20]。本研究发现,不同苜蓿杂花苜蓿根颈抗氧化酶活性对低温胁迫表现出显著的差异性响应,这一结果与前人研究结论一致。值得注意的是,部分杂花苜蓿的酶活性与对照品种存在显著差异,表明紫花苜蓿与黄花苜蓿的杂交确实能够提高后代的耐低温能力。

丙二醛(MDA)作为膜脂过氧化的终产物,其含量可有效反映植物受低温伤害的程度[21]。在低温环境下,植物细胞膜透性增加,导致MDA大量积累。因此,MDA含量与品种耐寒性密切相关,已成为评价植物抗逆性的重要指标之一[22]。本研究发现,仅杂花苜蓿4、13、20、21号的MDA含量显著低于两个对照品种(P<0.05),这一结果提示单一指标评价苜蓿耐低温能力存在局限性,建议采用多指标综合评价体系。

3.2 可溶性糖与游离脯氨酸对低温胁迫的响应特征

在低温胁迫下，苜蓿通过积累渗透调节物质来维持细胞稳态，其中可溶性糖和游离脯氨酸的积累是最重要的生理响应之一。正常情况下，植物体内可溶性糖和游离脯氨酸含量保持相对稳定，但在逆境条件下会显著增加。同时，淀粉等贮藏物质会转化为可溶性糖，通过渗透调节作用增强植物的抗寒能力。研究表明，低温诱导的耐冷性与糖代谢调节密切相关，脯氨酸及可溶性糖含量的提高可显著增强植物的抗寒能力[23-25]。本研究发现，多数杂花苜蓿根颈部的脯氨酸和可溶性糖含量均高于对照品种，这一结果证实杂交后代确实具有更强的耐低温能力。

3.3 苜蓿耐低温评价体系的建立

植物耐低温能力是由多基因控制的复杂性状，不同种质材料因其遗传特性差异而表现出不同的耐寒性。因此，采用单一指标评价品种耐低温能力存在明显局限性，建议结合多元统计方法，建立科学的综合评价模型，以提高评价结果的可靠性[26]。赵一航等[27]采用综合隶属函数法对4个苜蓿品种进行耐低温评价，成功筛选出两个耐寒性较强的品种。基于此，本研究以紫花苜蓿与黄花苜蓿杂交后代及耐寒性较强的公农1号和公农5号对照品种为试验材料，选取6个生理指标，运用主成分分析和隶属函数分析法对试验材料的耐低温能力进行综合评价，以期客观反映各材料的耐低温特性。

主成分分析和隶属函数综合评价得出，耐低温同时高于两个对照品种的杂花苜蓿顺序依次为：10号>11号>19号>9号>8号>7号>1号>12号>14号。在此基础上，构建的回归模型为：

D=0.583 2+0.047 0CAT+0.046 7POD−0.016 3SOD−0.071 3MDA+0.077 8Pro+0.049 9SS。

主成分分析和回归分析杂花苜蓿品系生理指标CAT、POD、SOD、MDA、Pro和SS这6个指标差异性并通过综合评价D值将23份材料划分为3大类群，可为后续选育亲类群本材料提供选择。

参考文献：

[1] 王虹，师尚礼，刘正璟.优质、速生、抗虫紫花苜蓿多元杂交后代优良株系的性状分离与评价筛选[J].植物遗传资源学报，2015，16(6)：8.
WANG H, SHI S L, LIU Z J. Differentiation and selection of excellent germplasm resources of multiple cross hybrid progeny of good quality, fast-growing and insect-resistant alfalfa parents[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(6): 8. (in Chinese)

[2] 姜慧新，沈益新，翟桂玉，等.施磷对紫花苜蓿分枝生长及产草量的影响[J].草地学报，2009，17(5)：588-592.
JIANG H X, SHEN Y X, ZHAI G Y, et al. Effect of phosphate fertilizer on the shoot growth and forage yield of *Medicago sativa* L.[J]. Acta Agrestia Sinica, 2009, 17(5): 588-592. (in Chinese)

[3] 杨淑慎，山仑，王江浪，等.四个不同基因型苜蓿的生物学和生理学特性比较[J].干旱地区农业研究，2006，24(6)：4.
YANG S S, SHAN L, WANG J L, et al. Study on biological and physiological characteristics of four different alfalfa genotypes [J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2006, 24(6): 4. (in Chinese)

[4] 袁庆华.西部优良牧草-紫花苜蓿[J].中国畜牧兽医，2003，30(5)：1.
YUAN Q H. Excellent western forage-*Medicago sativa* L. [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2003,30(5): 1. (in Chinese)

[5] 陈晶晶，王英哲，金艳，等.不同紫花苜蓿杂交组合对冻害胁迫的生理响应[J].草业科学，2018,35(5)：1138-1144.
CHEN J J, WANG Y Z, JIN Y, et al. Physiological responses of different alfalfa hybrid combinations to freezing stress[J]. Pratacultural Science, 2018, 35(5): 1138-1144. (in Chinese)

[6] 王鹏远，刘涛，韩鹏，等.内蒙古地区紫花苜蓿融冻型冻害的时空动态[J].中国草地学报，2018，40(2)：34-41，94.
WANG P Y, LIU T, HAN P, et al. Spatial-temporal characteristics of alfalfa thawing-freezing injury in Inner Mongolia[J]. Chinese Journal of Grassland, 2018, 40(2): 34-41, 94. (in Chinese)

[7] 王月胜.不同苜蓿品种根系特征及其抗寒性关系的研究[D].兰州：甘肃农业大学，2008.
WANG Y S. Research of root system characteristics and the relationship between roots and cold tolerance in alfalfa cultivars [D]. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2008. (in Chinese)

[8] MCKERSIE B D, CHEN Y, BOWLEY S R, et al. Superoxide dismutase enhances tolerance of freezing stress in transgenic alfalfa(*Medicago sativa* L.) [J]. Plant Physiology, 1993, 103(4): 1155-1163.

[9] 陶雅，玉柱，孙启忠，等.紫花苜蓿的抗寒生理适应性研究[J].草业科学，2009，26(9)：151-155.
TAO Y, YU Z, SUN Q Z, et al. The study on physiological adaptability to cold resistance of alfalfa[J]. Pratacultural Science, 2009, 26(9): 151-155. (in Chinese)

[10] 袁淑珍，栗淑媛，乔辰.低温胁迫对螺旋藻细胞内游离脯氨酸含量的影响[J].现代农业科技，2010(18)：35-37.
YUAN S Z, LI S Y, QIAO C. Effect of low temperature stress on content of free proline in Spirulina[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2010(18): 35-37. (in Chinese)

[11] 郑锋，白小明，冉福，等.10份沿阶草族种质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(12)：21-32.
ZHENG F, BAI X M, RAN F, et al. Physiological response and cold resistance of ten Ophiopogoneae germplasms under low temperature stress[J]. Chinese Journal of Grassland, 2023, 45 (12): 21-32. (in Chinese)

[12] 彭丽,翟学昌,万劲,等.5种地被植物抗寒性初步研究[J].安徽农业科学,2009,37(13):5952-5953.
PENG L, ZHAI X C, WAN J, et al. Preliminary study on the cold resistance of 5 cover plants[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2009, 37(13): 5952-5953. (in Chinese)

[13] 王志鹏,于铁峰,安海波,等.基于产量及越冬特性对40个紫花苜蓿品种在科尔沁地区综合评价[J].草业科学,2024,41(3):664-674.
WANG Z P, YU T F, AN H B, et al. A comprehensive evaluation of 40 alfalfa varieties in the Horgin regionbased on yield and overwintering characteristics[J]. Pratacultural Science, 2024, 41(3): 664-674. (in Chinese)

[14] KRASNUK M, JUNG G A, WITHAM F H. Electrophoretic studies of the relationship of peroxidases, polyphenol oxidase, and indoleacetic acid oxidase to cold tolerance of alfalfa[J]. Cryobiology, 1975, 12(1): 62-80.

[15] WILDING M D, STAHMANN M A, SMITH D. Free amino acids in alfalfa as related to cold hardiness[J]. Plant Physiology, 1960, 35(5): 726-732.

[16] 杨秀芳,梁庆伟,张晴晴,等.基于不同生长度日的刈割对科尔沁沙地紫花苜蓿产量、品质和越冬率的影响[J].草地学报,2019,27(4):1068-1074.
YANG X F, LIANG Q W, ZHANG Q Q, et al. Effect of different growing degree-days cutting on yield, quality and winter survival rate of alfalfa in Keergin sandy land[J]. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(4): 1068-1074. (in Chinese)

[17] DUKE S H, DOEHLERT D C. Root respiration, nodulation, and enzyme activities in alfalfa during cold acclimation[J]. Crop Science, 1981, 21: 489-495.

[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.
ZHANG Y X, CONG B M, WANG X G, et al. Correlation analysis of cold resistance and antioxidant enzyme activities in alfalfa roots[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(2): 244-249. (in Chinese)

[19] 田永雷,张玉霞,王显国,等.播期、品种对沙地紫花苜蓿抗氧化特性与越冬率的影响[J].草地学报,2019,27(5):1277-1283.
TIAN Y L, ZHANG Y X, WANG X G, et al. Effects of sowing dates and varieties on antioxidant characteristics and overwintering rate of alfalfa in sandy land[J]. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(5): 1277-1283. (in Chinese)

[20] 张丽娟.低温胁迫对紫花苜蓿幼苗及根颈保护酶活性的影响[D].长春:东北师范大学,2008.
ZHANG L J. Effects of lower temperature stress on activity of protective enzymes in alfalfa seedlings and crowns[D]. Changchun: Northeast Normal University, 2008. (in Chinese)

[21] 赵建涛,岳亚飞,张前兵,等.不同秋眠级紫花苜蓿品种抗寒性对新疆北疆地区覆雪厚度的响应[J].草业学报,2022,31(8):24-34.
ZHAO J T, YUE Y F, ZHANG Q B, et al. Relationship between cold resistance of alfalfa, degree of fall-dormancy and snow cover thickness in Northern Xinjiang[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(8): 24-34. (in Chinese)

[22] 周娟娟,魏巍,桑旦,等.藏北高寒区越冬期间野生早熟禾根系生理特征及抗寒性比较[J].草业科学,2019,36(8):2008-2016.
ZHOU J J, WEI W, SANG D, et al. et al. Comparison between physiological characteristics and cold resistance of wild Poa root during the overwintering period in alpine regions in northern Tibet[J]. Pratacultural Science, 2019, 36(8): 2008-2016. (in Chinese)

[23] 李倩,李长慧,孙启忠,等.门源县越冬成功的3种紫花苜蓿抗寒性研究[J].草地学报,2021,29(3):631-634.
LI Q, LI C H, SUN Q Z. et al. Study on cold resistance of three alfalfas successfully overwintered in Menyuan County[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(3): 631-634. (in Chinese)

[24] 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.
LI S M, XU Q G, YANG Y, et al. Effects of low temperature stress on the antioxidant enzyme activities and fatty acid contents in *Zoysiagrass*[J]. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(4): 906-912. (in Chinese)

[25] ANNICCHIARICO P. Lucerne shoot and root traits associated with adaptation to favourable or drought-stress environments and to contrasting soil types[J]. Field Crops Research, 2007, 102(1): 51-59.

[26] 陈小姝,赵跃,蒋春姬,等.花生品种幼苗耐低温鉴定的生理生化指标筛选[J].中国油料作物学报,2020,42(4):649-657.
CHEN X S, ZHAO Y, JIANG C J, et al. Physiological and biochemical indexes in different peanut seedlings with low-temperature tolerance[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2020, 42(4): 649-657. (in Chinese)

[27] 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.
ZHAO Y H, MENG L D, ZHANG X M, et al. Evaluation of physiological response and cold resistance of four alfalfa cultivars to low temperature stress[J]. Pratacultural Science, 2021, 38(4): 683-692. (in Chinese)

(责任编辑:穆　楠)