

网络出版时间:2021-06-11 12:46 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.12.008
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20210610.0837.001.html

磷肥对冷冻胁迫下紫花苜蓿根颈 抗氧化特性的影响

陈卫东¹, 张玉霞¹, 丛百明², 孙明雪¹, 夏全超¹, 张庆昕¹, 杜晓艳¹

(1 内蒙古民族大学 农学院, 内蒙古 通辽 028041; 2 内蒙古通辽市畜牧兽医科学研究所, 内蒙古 通辽 028000)

【摘要】【目的】探究科尔沁沙地紫花苜蓿抗寒性对磷肥施用种类和用量的响应, 为科尔沁沙地苜蓿抗寒越冬提供理论依据和技术指导。【方法】以‘公农 1 号’紫花苜蓿为材料, 采用二因素(磷肥种类和施肥量)随机区组试验设计, 于秋季施用 0, 100, 200, 300, 400 kg/hm² (以 P₂O₅ 计)重过磷酸钙和磷酸二铵, 对紫花苜蓿越冬材料人工模拟低温冷冻条件(-20 ℃), 以冷藏(4 ℃)为对照, 研究紫花苜蓿根颈的丙二醛(MDA)含量、抗氧化酶(超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT))活性和可溶性蛋白(SP)含量的变化, 并对上述指标的相关性进行分析。【结果】在低温冷藏和低温冷冻条件下, 随着 2 种磷肥施用量的增加, 紫花苜蓿根颈 MDA 含量呈先降后升的趋势, 均在 300 kg/hm² (P₂O₅)处理下最低; 紫花苜蓿根颈 SOD、POD、CAT 活性和 SP 含量则呈先升后降的趋势, 在 300 kg/hm² (P₂O₅)处理下 3 种酶活性和 SP 含量达到高点。在施肥量相同时, 与施用磷酸二铵相比, 施用重过磷酸钙的紫花苜蓿根颈 MDA 含量更低, SOD、POD、CAT 活性和 SP 含量大多更高。与低温冷藏条件相比, 相同肥料处理在低温冷冻条件下紫花苜蓿 MDA、SP 含量增加, SOD、POD、CAT 活性增强, 其中在施肥量为 300 kg/hm² (P₂O₅)时, 施用重过磷酸钙紫花苜蓿根颈的 SP 含量最高, SOD、POD、CAT 活性最强, 分别为 38.85 mg/g、135.59 U/g、387.57 U/(min·g)和 47.71 U/(min·g)。相关性分析结果表明, 在低温冷冻条件下, 施用重过磷酸钙和磷酸二铵紫花苜蓿根颈的 MDA 含量, 均与 SOD、POD、CAT 活性和 SP 含量呈显著(P<0.05)或极显著负相关(P<0.01)。【结论】2 种磷肥均通过提高低温冷冻胁迫下苜蓿根颈的 SOD、POD、CAT 活性和 SP 含量, 降低 MDA 含量, 提高苜蓿抗寒性。在科尔沁沙地秋季施用 300 kg/hm² 重过磷酸钙有利于苜蓿安全越冬。

【关键词】 紫花苜蓿; 磷肥; 冷冻胁迫; 抗氧化活性

【中图分类号】 S541⁺.101

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)12-0058-09

Physiological and antioxidant activities of phosphate fertilizers on alfalfa roots under freezing stress

CHEN Weidong¹, ZHANG Yuxia¹, CONG Baiming², SUN Mingxue¹,
XIA Quanchao¹, ZHANG Qingxin¹, DU Xiaoyan¹

(1 Agricultural College, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028041, China;
2 Tongliao Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Tongliao, Inner Mongolia 028000, China)

Abstract:【Objective】This study explored the response of alfalfa to cold resistance in Horqin sandy land to type and dosage of phosphate fertilizers to provide theoretical basis and technical guidance for cold-tolerant alfalfa overwintering.【Method】Alfalfa variety of ‘Gongnong No. 1’ was treated using a two-factor (phosphorous fertilizer type and fertilizer amount) randomized block experiment design with 0, 100,

【收稿日期】 2021-01-06

【基金项目】 内蒙古自然科学基金项目(2020MS03081); 国家自然科学基金项目(31960352); 内蒙古自治区“双一流”建设一带一路作物学项目(NMDGJ0018)

【作者简介】 陈卫东(1997-), 男, 内蒙古赤峰人, 在读硕士, 主要从事牧草种质资源与利用研究。E-mail:1416386697@qq.com

【通信作者】 张玉霞(1965-), 女, 内蒙古赤峰人, 教授, 博士, 主要从事栽培与抗性生理研究。E-mail:yuxiazhang685@163.com

200,300 and 400 kg/hm² calcium phosphate and diammonium phosphate (calculated as P₂O₅) in autumn. Then alfalfa overwintering materials were stored under artificially simulated low-temperature freezing conditions (-20 °C) using cold storage (4 °C) as control. Changes in alondialdehyde (MDA) content, activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT)) and soluble protein (SP) content were determined and correlations among above indicators were analyzed. **【Result】** Under low-temperature storage and low-temperature freezing conditions, with the increase of application rates of phosphate fertilizers, MDA contents in root neck of alfalfa decreased first and then increased with the lowest in treatment of 300 kg/hm² (P₂O₅). Activities of SOD, POD and CAT and content of SP in root neck showed a trend of increasing first and then decreasing. They all reached peaks in treatment of 300 kg/hm² (P₂O₅). With same fertilizer amount, applying double superphosphate led to lower MDA content and higher activities of SOD, POD and CAT and content of SP in comparison of diammonium phosphate. Compared with low-temperature storage conditions, low-temperature freezing conditions caused higher contents of MDA and SP and activities of SOD, POD and CAT at same applying amount. The peak values of 38.85 mg/g, 135.59 U/g, 387.57 U/(min·g) and 47.71 U/(min·g) were obtained in application of double superphosphate at the application rate of 300 kg/hm² (P₂O₅). Under low temperature freezing conditions, MDA contents in root neck of alfalfa applied with double superphosphate and diammonium phosphate had significant ($P < 0.05$) or extremely significant ($P < 0.01$) and negative correlation with activities of SOD, POD and CAT and content of SP. **【Conclusion】** Both phosphate fertilizers can increase activities of SOD, POD and CAT as well as SP content in root neck of alfalfa under low temperature freezing stress, reduce MDA content, and improve cold resistance. Application of 300 kg/hm² double superphosphate in autumn is beneficial to safe overwintering of alfalfa in Horqin sandy land.

Key words: alfalfa; phosphate fertilizer; freezing stress; antioxidant properties

紫花苜蓿 (*Medicago saliva* L.) 是豆科苜蓿属多年生牧草, 有“牧草之王”的美称^[1-2], 具有高产、适应性强、营养价值高等优良特性及保持水土、改良土壤等作用, 是目前世界各地广泛种植的优质牧草^[3]。近年来, 在国家扶持政策和区域化农业布局优化调整的引导下, 我国紫花苜蓿栽培面积突破历史新高, 达到 377 万 hm², 其中科尔沁沙地的紫花苜蓿生产也得以快速发展, 成为新兴的紫花苜蓿优势生产区^[4-5]。然而科尔沁沙地由于风沙大、降水量小、冬季极端低温、春季温度低等因素, 不能保证紫花苜蓿安全越冬^[6], 这严重限制了紫花苜蓿在当地的持续稳定生产^[7-9]。目前通过增施磷肥提高植物抗氧化特性使抗寒性增强的研究较多^[10-11], 有关苜蓿抗寒研究多集中在地上部分的生长与生理研究方面^[12-13], 而关于磷肥在低温胁迫处理下对紫花苜蓿根颈抗氧化特性影响的报道较少^[14-15]。为此, 本试验采用大田试验对紫花苜蓿进行磷肥种类及其不同施用量处理, 于越冬前期挖取紫花苜蓿越冬材料模拟低温胁迫, 检测低温胁迫下紫花苜蓿根颈的抗氧化特性及可溶性蛋白 (SP) 含量, 分析不同磷肥处理下紫花苜蓿越冬材料在低温胁迫下抗氧化特性的变

化, 明确在科尔沁沙地紫花苜蓿安全越冬的磷肥施用种类及施用量, 为科尔沁沙地紫花苜蓿抗寒越冬提供理论依据和技术指导。

1 材料与方法

1.1 试验地概况

试验地位于内蒙古通辽市内蒙古民族大学科技示范园区 (43°36'N, 122°22'E), 年平均气温 6.4 °C, ≥10 °C 年活动积温 3 184 °C, 年平均日照时数 3 000 h, 无霜期 150 d, 年平均降水量 379.1 mm, 蒸发量是降水量的 5 倍, 年平均风速 3~4 m/s, 为典型的温带大陆性季风气候。试验田土壤为沙土, 是新开垦的沙化草地, 0~20 cm 土层土壤 pH 值为 8.3, 土壤有机质含量 6.4 g/kg, 全氮含量 0.36 g/kg, 碱解氮含量 35.37 mg/kg, 速效钾含量 77.51 mg/kg, 速效磷含量 3.70 mg/kg。

1.2 试验设计

供试苜蓿材料为‘公农 1 号’紫花苜蓿品种, 种子购自北京百斯特草业有限公司。试验材料于 2018-07-17 播种, 播种量 22.5 kg/hm², 条播行距 15 cm, 播种前撒施氯化钾 150 kg/hm² (K₂O), 苜蓿生

长过程中适时进行喷灌、除草、防治病虫害等田间管理。8月20日采用沟施方式施用不同种类和不同施用量的磷肥,磷肥种类为重过磷酸钙(P_2O_5 含量为44%)和磷酸二铵(P_2O_5 含量为46%),施用量设0(对照,CK),100,200,300,400 kg/hm² 5个磷肥(P_2O_5)施用水平。采用二因素随机区组试验设计,每个处理设3个重复,共30个小区,小区面积为4 m×5 m,四周设保护行。

于封冻期前(11月15日)取样,挖取苜蓿越冬器官,每小区取样50株(粗细均匀一致),平均分成2份,其中1份置于4℃冰箱低温储存,另1份于程序式低温处理箱模拟低温处理。低温处理时采用脱脂棉包裹,加水适量,再用锡纸包裹,注明编号,以0℃为起点,以4℃/h的速率降温,到达设定温度(-20℃)后保持6h,然后按照4℃/h的速率升温至4℃,取出置于4℃下保持12h,然后进行抗氧化生理指标的测定。

1.3 测定指标及方法

参考文献[16]的方法测定生理指标,其中丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸比色法,过氧化物酶(POD)活性测定采用愈创木酚比色法,超氧化物歧化酶(SOD)活性测定采用氮蓝四唑比色法,过氧化氢酶(CAT)活性测定采用紫外吸收法,可溶性蛋白(SP)含量测定采用考马斯亮蓝比色法。

1.4 数据处理

用Microsoft Excel 2010进行数据处理,结果用“平均值±标准差”表示,用DPS软件进行二因素试

验统计分析和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 磷肥对紫花苜蓿根颈MDA含量的影响

如表1所示,在低温冷藏(4℃)条件下,随着2种磷肥施用量的增加,紫花苜蓿根颈MDA含量呈先降低后升高的趋势,均在300 kg/hm²(P_2O_5)处理下MDA含量最低,且显著低于不施磷肥和施用100 kg/hm²(P_2O_5)处理($P<0.05$);在100,200,300 kg/hm²(P_2O_5)处理下,施用重过磷酸钙的紫花苜蓿根颈MDA含量显著低于施用磷酸二铵($P<0.05$)。

低温冷冻(-20℃)条件下,施用0,100,200,300,400 kg/hm²重过磷酸钙处理的紫花苜蓿根颈MDA含量,分别较低温冷藏(4℃)条件下增加了104.67%,131.67%,143.64%,23.40%和56.86%;施用0,100,200,300,400 kg/hm²磷酸二铵处理的紫花苜蓿根颈MDA含量,分别较低温冷藏(4℃)条件下增加了104.67%,51.04%,70.77%,47.92%和33.93%,说明低温冷冻导致膜脂过氧化严重。

在低温冷冻条件下,2种磷肥不施肥处理的紫花苜蓿MDA含量显著高于各施肥处理($P<0.05$),施用300和400 kg/hm²(P_2O_5)处理的MDA含量显著低于施用100和200 kg/hm²(P_2O_5)处理($P<0.05$),说明秋季施用磷肥能够提高紫花苜蓿的抗寒性,施用量以300~400 kg/hm²(P_2O_5)为宜。

表1 不同磷肥种类及施用量下紫花苜蓿根颈MDA含量的变化

Table 1 Changes of MDA content in alfalfa rhizomes under different types and application rates of phosphate fertilizers

温度处理 Temperature treatment	施肥量/(kg·hm ⁻²) Amount of fertilizer applied	磷肥种类 Type of phosphate fertilizer	
		重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄
低温冷藏(4℃) Low temperature refrigeration (4℃)	0	1.07±0.07 aA	1.07±0.07 aA
	100	0.60±0.01 bB	0.96±0.03 bA
	200	0.55±0.01 bcB	0.65±0.01 cA
	300	0.47±0.01 cB	0.48±0.02 dA
	400	0.51±0.02 bcA	0.56±0.02 cdA
低温冷冻(-20℃) Low temperature freezing (-20℃)	0	2.19±0.15 aA	2.19±0.15 aA
	100	1.39±0.13 bA	1.45±0.01 bA
	200	1.34±0.14 bA	1.11±0.06 cB
	300	0.58±0.01 cA	0.71±0.01 dA
	400	0.80±0.03 cA	0.75±0.04 dA

注:数据后标不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平下相同磷肥种类不同磷肥用量间差异显著,标不同大写字母表示在 $P<0.05$ 水平下相同磷肥用量不同磷肥种类间差异显著。下表同。

Note: Different lowercase letter indicate significant differences among different application amounts at the level of $P<0.05$, and different uppercase letters indicate significant differences among different fertilizer types at the level of $P<0.05$. The same below.

2.2 磷肥对紫花苜蓿根颈 SOD 活性的影响

表 2 显示,在低温冷藏(4 ℃)条件下,随着 2 种磷肥施用量的增加,紫花苜蓿根颈 SOD 活性呈先增强后减弱的趋势,均在 300 kg/hm² (P₂O₅) 处理下达到最强,且显著高于其他处理($P < 0.05$);在 100, 200, 300, 400 kg/hm² (P₂O₅) 处理下,施用重过磷酸钙的紫花苜蓿根颈 SOD 活性显著高于施用磷酸二铵($P < 0.05$)。

在低温冷冻(-20 ℃)条件下,施用 0, 100, 200, 300, 400 kg/hm² 重过磷酸钙处理的紫花苜蓿根颈 SOD 活性,分别较低温冷藏(4 ℃)条件下增加了 12.71%, 8.99%, 12.43%, 29.26% 和 25.30%;施用 0, 100, 200, 300, 400 kg/hm² 磷酸二铵处理的紫

花苜蓿根颈 SOD 活性,分别较低温冷藏(4 ℃)条件下增加了 12.71%, 5.64%, 9.07%, 34.12% 和 73.69%,说明低温冷冻导致活性氧大量产生,紫花苜蓿根颈通过增强 SOD 活性清除活性氧。

在低温冷冻条件下,施用 100~300 kg/hm² 重过磷酸钙处理的紫花苜蓿根颈 SOD 活性,显著高于对应的磷酸二铵处理($P < 0.05$);在 2 种磷肥处理下,200~400 kg/hm² (P₂O₅) 处理紫花苜蓿根颈 SOD 活性显著高于不施磷肥处理($P < 0.05$)。说明秋季施用磷肥能够提高低温冷冻条件下紫花苜蓿的 SOD 活性,且重过磷酸钙的作用强于磷酸二铵,施用量为 300 kg/hm² (P₂O₅) 时 SOD 活性最强。

表 2 不同磷肥种类及施用量下紫花苜蓿根颈 SOD 活性的变化

Table 2 Changes of SOD activity in alfalfa rhizomes under different types and application rates of phosphate fertilizers

温度处理 Temperature treatment	施肥量/(kg·hm ⁻²) Amount of fertilizer applied	磷肥种类 Type of phosphate fertilizer	
		重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄
		U/g	
低温冷藏(4 ℃) Low temperature refrigeration (4 ℃)	0	55.57±0.45 dA	55.57±0.45 eA
	100	80.55±0.78 cA	60.29±1.19 dB
	200	91.85±1.35 bA	82.92±1.16 bB
	300	104.90±0.89 aA	92.08±1.15 aB
	400	82.03±1.16 cA	72.28±1.29 cB
低温冷冻(-20 ℃) Low temperature freezing (-20 ℃)	0	62.63±4.72 dA	62.63±4.72 cA
	100	87.79±1.42 cA	63.69±0.70 cB
	200	103.27±2.12 bA	90.44±1.59 bB
	300	135.59±9.95 aA	123.50±1.06 aB
	400	102.78±1.62 bB	125.54±0.81 aA

2.3 磷肥对紫花苜蓿根颈 POD 活性的影响

表 3 显示,在低温冷藏(4 ℃)条件下,随着 2 种磷肥施用量的增加,紫花苜蓿根颈 POD 活性呈先增强后减弱的趋势,均在 300 kg/hm² (P₂O₅) 处理下达

到最强,且显著高于其他处理($P < 0.05$);在施用 100, 200, 300, 400 kg/hm² (P₂O₅) 处理下,施用重过磷酸钙的紫花苜蓿根颈 SOD 活性显著高于施用磷酸二铵($P < 0.05$)。

表 3 不同磷肥种类及施用量下紫花苜蓿根颈 POD 活性的变化

Table 3 Changes of POD activity in alfalfa rhizomes under different types and application rates of phosphate fertilizers

温度处理 Temperature treatment	施肥量/(kg·hm ⁻²) Amount of fertilizer applied	磷肥种类 Type of phosphate fertilizer	
		重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄
		U/(min·g)	
低温冷藏(4 ℃) Low temperature refrigeration (4 ℃)	0	132.91±1.86 eA	132.91±1.86 eA
	100	210.62±2.55 cA	149.95±2.84 dB
	200	199.55±1.69 dA	185.62±0.65 cB
	300	377.11±4.95 aA	285.23±4.57 aB
	400	223.08±2.14 bA	209.90±3.04 bB
低温冷冻(-20 ℃) Low temperature freezing (-20 ℃)	0	171.35±2.18 eA	171.35±2.18 dA
	100	205.26±3.66 dB	250.90±4.08 bA
	200	247.45±2.74 cA	223.21±1.72 cB
	300	387.57±5.02 aA	333.33±2.66 aB
	400	319.80±2.51 bA	263.40±9.96 bB

在低温冷冻(-20 ℃)条件下,各施肥处理的紫花苜蓿根颈 POD 活性较低温冷藏处理增强,说明低温冷冻导致过氧化物大量产生,紫花苜蓿通过增强 POD 活性提高抗氧化特性。

在低温冷冻条件下,施用 200~400 kg/hm² 重过磷酸钙处理的紫花苜蓿根颈 POD 活性,显著高于相同施用量的磷酸二铵处理($P<0.05$);在 2 种磷肥处理下,施用 100,200,300,400 kg/hm² 处理的紫花苜蓿根颈 POD 活性显著高于不施肥处理($P<0.05$),施用 300 kg/hm² (P₂O₅)处理的紫花苜蓿根颈 POD 活性显著高于其他处理($P<0.05$)。说明秋季施用磷肥能够提高苜蓿在低温冷冻条件下的 POD 活性,且施用重过磷酸钙的效果优于磷酸二铵,施用量以 300 kg/hm² (P₂O₅)下 POD 活性最强。

2.4 磷肥对紫花苜蓿根颈 CAT 活性的影响

由表 4 可见,在低温冷藏(4 ℃)条件下,随着 2 种磷肥施用量的增加,紫花苜蓿根颈 CAT 活性呈先增强后减弱的趋势,在 300 kg/hm² (P₂O₅)处理下紫花苜蓿根颈 CAT 活性最强,且显著高于除 400 kg/hm² (P₂O₅)处理外的其他处理($P<0.05$);在施

用 300 和 400 kg/hm² (P₂O₅)处理下,施用重过磷酸钙的紫花苜蓿根颈 CAT 活性显著高于施用磷酸二铵($P<0.05$)。

在低温冷冻(-20 ℃)条件下,0,100,200,300 kg/hm² 重过磷酸钙处理紫花苜蓿根颈 CAT 活性,分别较低温冷藏(4 ℃)条件下增加 22.23%,23.78%,8.20%和 8.16%;0,100,200,300,400 kg/hm² 磷酸二铵处理紫花苜蓿根颈 CAT 活性,分别较低温冷藏(4 ℃)条件下增加 22.23%,27.18%,13.32%,11.50%和 16.21%,说明低温冷冻导致 CAT 大量产生,苜蓿通过增强 CAT 活性来提高抗氧化能力。

在低温冷冻条件下,100,200,300,400 kg/hm² 磷肥处理的紫花苜蓿根颈 CAT 活性显著高于不施肥处理($P<0.05$),施用 300 kg/hm² 处理显著高于其他处理(除磷酸二铵的 400 kg/hm² 处理外)($P<0.05$),说明秋季施用磷肥能够提高苜蓿在低温冷冻条件下的 CAT 活性,施用量以 300 kg/hm² 下 CAT 活性最强。

表 4 不同磷肥种类及施用量下紫花苜蓿根颈 CAT 活性的变化

Table 4 Changes of POD activity in alfalfa rhizomes under different types and application rates of phosphate fertilizers

温度处理 Temperature treatment	施肥量/(kg·hm ⁻²) Amount of fertilizer applied	磷肥种类 Type of phosphate fertilizer	
		重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄
		U/(min·g)	
低温冷藏(4 ℃) Low temperature refrigeration (4 ℃)	0	28.11±0.43 cA	28.11±0.43 cA
	100	30.99±1.18 cA	30.76±2.18 cA
	200	36.72±0.55 bA	34.91±0.64 bA
	300	44.11±0.15 aA	41.91±1.10 aB
	400	42.66±1.63 aA	40.40±0.82 aB
低温冷冻(-20 ℃) Low temperature freezing (-20 ℃)	0	34.36±0.27 cA	34.36±0.27 cA
	100	38.36±0.27 bA	39.12±0.84 bA
	200	39.73±1.36 bA	39.56±0.83 bA
	300	47.71±0.79 aA	46.73±0.55 aA
	400	40.32±1.91 bB	46.95±0.28 aA

2.5 磷肥对紫花苜蓿根颈 SP 含量的影响

表 5 显示,在低温冷藏(4 ℃)条件下,随着 2 种磷肥施用量的增加,紫花苜蓿根颈 SP 含量呈先升高后降低的趋势,均以 300 kg/hm² (P₂O₅)处理紫花苜蓿根颈 SP 含量最高,且显著高于其他处理($P<0.05$);在施用 300 和 400 kg/hm² (P₂O₅)处理下,施用重过磷酸钙的紫花苜蓿根颈 SP 含量显著高于施用磷酸二铵处理($P<0.05$)。

在低温冷冻(-20 ℃)条件下,0,100,200,300,400 kg/hm² 重过磷酸钙处理紫花苜蓿根颈 SP 含量,分别较低温冷藏(4 ℃)条件下增加 20.91%,

2.97%,20.12%,6.56%和 12.84%;0,100,200,300,400 kg/hm² 磷酸二铵处理紫花苜蓿根颈 SP 含量,分别较低温冷藏(4 ℃)条件下增加 20.91%,16.44%,27.75%,7.38%和 20.11%,说明低温冷冻下苜蓿通过提高 SP 含量增强抗寒性。

在冷冻条件下,施用 100,200,300,400 kg/hm² (P₂O₅)处理(除 100 kg/hm² 重过磷酸钙处理外)的紫花苜蓿根颈 SP 含量显著高于不施肥处理($P<0.05$),且 2 种肥料均以 300 kg/hm² (P₂O₅)处理的 SP 含量最高,说明秋季施用磷肥能够提高苜蓿在低温冷冻条件下的 SP 含量,施用量以 300 kg/hm²

(P_2O_5)效果最好。

表 5 不同磷肥种类及施用量下紫花苜蓿根颈 SP 含量的变化

Table 5 Changes of SP content in alfalfa rhizomes under different types and application rates of phosphate fertilizers

温度处理 Temperature treatment	施肥量/(kg·hm ⁻²) Amount of fertilizer applied	磷肥种类 Type of phosphate fertilizer		mg/g
		重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄	
低温冷藏(4℃) Low temperature refrigeration (4℃)	0	16.21±0.34 eA	16.21±0.34 eA	
	100	20.90±0.53 dA	21.84±1.33 dA	
	200	25.64±0.41 cA	24.94±0.68 cA	
	300	36.46±1.34 aA	32.37±0.75 aB	
	400	30.52±0.15 bA	27.99±0.37 bB	
低温冷冻(-20℃) Low temperature freezing (-20℃)	0	19.60±0.82 cA	19.60±0.82 cA	
	100	21.52±0.88 cB	25.43±0.66 bA	
	200	30.80±2.92 bA	31.86±0.30 aA	
	300	38.85±3.49 aA	34.76±0.65 aB	
	400	34.44±0.74 abA	33.62±0.86 aA	

2.6 紫花苜蓿根颈 MDA 含量与抗氧化酶活性及 SP 含量的相关性

表 6 显示,在低温冷藏(4℃)条件下,重过磷酸钙处理的紫花苜蓿根颈 MDA 含量与 POD 活性、SP 含量呈显著负相关($P<0.05$);磷酸二铵处理的紫花苜蓿根颈 MDA 含量与 CAT 活性、SP 含量呈极显著负相关($P<0.01$),与 POD、SOD 活性呈显著负相关($P<0.05$)。在-20℃低温冷冻条件下,重过磷酸钙处理的紫花苜蓿根颈 MDA 含量与 CAT

活性、SP 含量呈显著负相关($P<0.05$),与 POD、SOD 活性呈极显著负相关($P<0.01$);磷酸二铵处理的紫花苜蓿根颈 MDA 含量与 POD、SOD 活性呈显著负相关($P<0.05$),与 CAT 活性、SP 含量呈极显著负相关($P<0.01$)。表明 POD、SOD、CAT 活性及 SP 含量越高,MDA 含量越低,紫花苜蓿根颈受伤程度越轻,磷肥能够提高苜蓿在低温冷冻条件下的抗氧化酶活性,抑制膜脂过氧化,提高苜蓿抗寒性。

表 6 紫花苜蓿根颈中 MDA 含量与抗氧化酶活性及 SP 含量的相关性

Table 6 Correlation between MDA and antioxidant enzyme activities and SP content in alfalfa root neck

温度处理 Temperature treatment	施肥种类 Fertilization type	指标 Index	MDA	POD	SOD	CAT	SP
低温冷藏(4℃) Low temperature refrigeration (4℃)	重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	MDA	1				
		POD	-0.90*	1			
		SOD	-0.71	0.87*	1		
		CAT	-0.80	0.80	0.79	1	
		SP	-0.81*	0.87*	0.90*	0.98**	1
	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄	MDA1					
		POD	-0.91*	1			
		SOD	-0.90*	0.90*	1		
		CAT	-0.97**	0.83*	0.93**	1	
		SP	-0.96**	0.89*	0.95**	0.97**	1
低温冷冻(-20℃) Low temperature freezing (-20℃)	重过磷酸钙 Ca(H ₂ PO ₄) ₂ ·CaHPO ₄	MDA	1				
		POD	-0.93**	1			
		SOD	-0.94**	0.94**	1		
		CAT	-0.90*	0.98**	0.94**	1	
		SP	-0.91*	0.93**	0.97**	0.89*	1
	磷酸二铵 (NH ₄) ₂ HPO ₄	MDA	1				
		POD	-0.89*	1			
		SOD	-0.84*	0.74	1		
		CAT	-0.94**	0.94**	0.87*	1	
		SP	-0.99**	0.90*	0.79	0.90*	1

注: * 表示显著相关($P<0.05$), ** 表示极显著相关($P<0.01$)。

Note: * indicates significant correlation ($P<0.05$), ** indicates extremely significant correlation ($P<0.01$).

3 讨论

苜蓿根颈是豆科牧草重要的营养运输器官,其受伤程度直接影响牧草抗寒能力的强弱^[17-18]。MDA 是膜脂氧化的产物之一,其含量反映了脂质过氧化强度和膜系统受伤害程度及对逆境环境的响应程度,是逆境生理中的一个重要指标^[19-20]。李婷等^[15]研究表明,随着低温胁迫的逐渐增强,紫花苜蓿根颈中的 MDA 含量有增加趋势,导致其含量增加的最主要原因是:随着温度的下降,紫花苜蓿根颈受到伤害,导致膜脂过氧化加重,细胞膜受到损伤,膜脂过氧化产物 MDA 含量升高。本研究结果表明,与低温冷藏相比,低温冷冻条件下紫花苜蓿 MDA 含量升高,施磷肥处理紫花苜蓿根颈 MDA 含量显著低于不施磷肥处理($P < 0.05$),且在 $300 \text{ kg/hm}^2 (\text{P}_2\text{O}_5)$ 处理下 MDA 含量最低。说明在科尔沁地区秋季施用磷肥有利于降低苜蓿根颈受伤害程度,对苜蓿安全越冬起到促进作用。

SOD、POD、CAT 是植物体内重要的抗氧化酶和细胞膜保护酶系统,逆境条件下这些保护酶能够及时清除植物体内多余的氧自由基,保护细胞膜尽可能少受外界低温破坏,从而增强植物的抗寒性^[21]。李婷等^[15]研究表明,在封冻期(11月20日以后)随着磷肥用量增加,紫花苜蓿根颈抗氧化酶活性呈现逐渐降低趋势,认为秋季施用过量磷肥会降低紫花苜蓿根颈的抗寒能力,在施用重过磷酸钙 $159.1 \text{ kg/hm}^2 (\text{P}_2\text{O}_5)$ 时抗氧化酶活性最强。本试验结果表明,随着磷肥用量的增加,低温冷藏与低温冷冻条件下紫花苜蓿根颈抗氧化酶活性均呈现先增加后降低的趋势,在施用重过磷酸钙 $300 \text{ kg/hm}^2 (\text{P}_2\text{O}_5)$ 时抗氧化酶活性最强,这与李婷等^[15]所得结果不同,出现这种差异的原因是本试验没有将磷肥作为种肥施入。侯立刚等^[22]研究表明,低温胁迫下,水稻叶片抗氧化酶活性明显升高,适当增磷后,水稻叶片的抗氧化酶活性均高于未施磷处理;随着施磷量增加,水稻叶片抗氧化酶活性上升幅度明显增加,这与本试验结果相同,说明施磷可以增强苜蓿低温胁迫下清除活性氧的能力。本试验结果表明,紫花苜蓿秋季施用 300 kg/hm^2 磷肥的处理,在低温胁迫下根颈 SOD、POD 和 CAT 活性最高,清除活性氧能力最强,且施用重过磷酸钙的效果优于施用磷酸二铵。

可溶性蛋白(SP)是重要的渗透调节物质,植物通过渗透调节作用积累有机酸、糖类和蛋白等小分

子有机物,使低温条件下细胞维持一定的膨压,减少细胞水分的流失,避免因结冰引起的伤害^[23-25]。柯野等^[26]研究表明,随着施磷量的增加,甘蔗叶片中 SP 含量呈现先升高后降低的变化趋势,导致这种变化的原因是,适当使用磷肥可以促进甘蔗叶片保持良好的渗透调节作用,而过量施用磷肥会对 SP 含量产生抑制作用,前人在对马尾松^[27]、小麦^[28]、大蒜^[29]的研究中也得到了同样的结果,这与本试验结果相同,即在低温冷藏与低温冷冻条件下,增施磷肥的各处理紫花苜蓿根颈 SP 含量均升高,在施用重过磷酸钙 $300 \text{ kg/hm}^2 (\text{P}_2\text{O}_5)$ 时 SP 含量最高。

4 结论

重过磷酸钙通过增强低温驯化期紫花苜蓿根颈 POD 活性和 SP 含量,极显著提高冷冻处理下紫花苜蓿根颈的 SOD、POD 活性及显著提高 CAT 活性和 SP 含量,从而实现对活性氧的清除,提高紫花苜蓿的抗氧化和渗透调节能力;磷酸二铵则通过极显著提高低温驯化期及冷冻期紫花苜蓿根颈 CAT 活性和 SP 含量、显著提高 SOD 和 POD 活性,从而提高紫花苜蓿的抗氧化能力,降低 MDA 含量,增强渗透调节能力,提高苜蓿抗寒性。增施磷肥可提高苜蓿的抗寒性,其中重过磷酸钙对苜蓿抗寒性的增强效果优于磷酸二铵,以 $300 \text{ kg/hm}^2 (\text{P}_2\text{O}_5)$ 处理效果最佳。

[参考文献]

- [1] 刘 铎,白 爽,杨庆山,等.紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)耐盐碱研究进展[J].生物学杂志,2021,38(1):98-101,105.
Liu D, Bai S, Yang Q S, et al. A review on the saline-alkaline tolerance of alfalfa (*Medicago sativa* L.) [J]. Journal of Biology, 2021, 38(1): 98-101, 105.
- [2] 孙 林,任秀珍,格根图,等.紫花苜蓿茎叶水浸提液对 2 种禾本科牧草的化感效应[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(12):49-53.
Sun L, Ren X Z, Ge G T, et al. Allelopathic effect of aqueous extracts from alfalfa stem and leaf on two gramineous forages [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2013, 41(12): 49-53.
- [3] 卢欣石.中国苜蓿产业发展问题[J].中国草地学报,2013,35(5):1-5.
Lu X S. Problems with the development of alfalfa industry in China [J]. Chinese Journal of Grassland, 2013, 35(5): 1-5.
- [4] 康桂兰.不同钾肥对紫花苜蓿产量和品质的影响[J].天津农业科学,2014,20(7):81-82.
Kang G L. Effect of different potassium fertilizer on the yield and quality of alfalfa [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2014,

- 20(7):81-82.
- [5] 郝培彤,宁亚明,高秋,等.科尔沁沙地不同苜蓿品种越冬期根颈耐寒生理机制的研究[J].草业学报,2019,28(9):87-95.
Hao P T, Ning Y M, Gao Q, et al. A study of crown physiological mechanisms for cold tolerance of different alfalfa varieties in Horqin sandy land [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(9): 87-95.
- [6] 朱爱民,张玉霞,王显国,等.8个苜蓿品种抗寒性的比较[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(1):45-52.
Zhu A M, Zhang Y X, Wang X G, et al. Comparison of cold resistance of 8 alfalfa varieties [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2019, 47(1): 45-52.
- [7] 梁庆伟,张晴晴,娜日苏,等.28个紫花苜蓿品种在阿鲁科尔沁旗的生产性能评价[J].黑龙江畜牧兽医,2018(23):130-137.
Liang Q W, Zhang Q Q, Na R S, et al. Evaluation on the production performance of 28 alfalfa varieties in aluhorqin banner [J]. Heilongjiang Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2018(23): 130-137.
- [8] 孙建平,张志华,董宽虎.晋北地区不同紫花苜蓿品种生产性能比较[J].草业科学,2016,33(11):2300-2305.
Sun J P, Zhang Z H, Dong K H. Production performance comparison of different alfalfa varieties in north Shanxi [J]. Grass Industry Science, 2016, 33(11): 2300-2305.
- [9] 贾倩民,陈彦云,刘秉儒,等.干旱区盐碱地不同栽培草地土壤理化性质及微生物数量[J].草业科学,2014,31(7):1218-1225.
Jia Q M, Chen Y Y, Liu B R, et al. Soil physico-chemical properties and microbial quantities in different pastures in arid area of saline-alkali soil [J]. Prairie Science, 2014, 31(7): 1218-1225.
- [10] 王天,宋佳承,闫士朋,等.低温胁迫下磷肥施用量对油橄榄生长发育的影响[J].植物营养与肥料学报,2020,26(5):879-890.
Wang T, Song J C, Yan S P, et al. Growth and development of olive under low temperature stress influenced by phosphate fertilizer application [J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2020, 26(5): 879-890.
- [11] 鲁春艳,冯喜兵,郭改改,等.秋季喷肥对红地球葡萄抗寒性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2014,42(12):126-132.
Lu C Y, Feng X B, Guo G G, et al. Effect of autumn foliar application of fertilizers on cold resistance of Red Globe grapes [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2014, 42(12): 126-132.
- [12] 崔国文,马春平.紫花苜蓿叶片形态结构及其与抗寒性的关系[J].草地学报,2007(1):70-75.
Cui G W, Ma C P. Research on leaf morphology and cold resistance of alfalfa [J]. Acta Grassland, 2007(1): 70-75.
- [13] 魏臻武,王德贤,贺连昌.超氧化物歧化酶在苜蓿抗寒锻炼过程中的作用[J].草业科学,2006(7):15-18.
Wei Z W, Wang D X, He L C. Effect of superoxide dismutase on cold acclimation of alfalfa [J]. Grass Industry Science, 2006(7): 15-18.
- [14] 沈祥军,张玉霞,王显国,等.不同水平磷钾肥对沙地紫花苜蓿根颈抗寒性物质的影响[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2017,32(2):116-121.
Shen X J, Zhang Y X, Wang X G, et al. Effects of phosphorus and potassium fertilizer on the cold resistance of alfalfa roots and necks in sandy soil [J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (Nat Sci Ed), 2017, 32(2): 116-121.
- [15] 李婷,张玉霞,王显国,等.低温胁迫下紫花苜蓿根颈抗氧化酶对不同水平磷钾肥处理的响应[J].内蒙古民族大学学报(自然科学版),2017,32(3):243-247.
Li T, Zhang Y X, Wang X G, et al. Effects of phosphorus and potassium fertilizer on the cold resistance of alfalfa [J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities (Nat Sci Ed), 2017, 32(3): 243-247.
- [16] 王学奎.植物生理生化实验原理和技术[M].北京:高等教育出版社,2005.
Wang X G. Principles and techniques of plant physiological and biochemical experiments [M]. Beijing, Higher Education Press, 2005.
- [17] 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.
Zhu A M, Zhang Y X, Wang X G, et al. Responses of morphological characteristics of different alfalfa varieties to low temperature and their relationship with cold resistance in sandy habitats [J]. Journal of Grassland Science, 2018, 26(6): 1400-1408.
- [18] 刘光瑞,李明雨,毕盛楠,等.不同苜蓿品种抗寒性研究及综合评价[J].草学,2019(3):16-23,35.
Liu G R, Li M Y, Bi S N, et al. Study on cold resistance and comprehensive evaluation of different alfalfa varieties [J]. Herbalism, 2019(3): 16-23, 35.
- [19] 周鑫,喻秀艳,张昭昇,等.涝渍胁迫对楨楠幼树不同功能根系生理生化特性的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(12):95-103.
Zhou X, Yu X Y, Zhang Z S, et al. Effects of waterlogging stress on physiological and biochemical characteristics of different functional root systems of *Phoebe zhenan* saplings [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2019, 47(12): 95-103.
- [20] 潘媛媛,张毅,石玉,等.外源亚精胺对等渗盐胁迫下番茄幼苗抗氧化系统的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2019,47(3):57-66.
Pan Y Y, Zhang Y, Shi Y, et al. Effects of exogenous spermidine on antioxidant system of tomato seedlings under isotonic salt stress [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2019, 47(3): 57-66.
- [21] 陈文荣,叶杰君,李永强,等.佛手低温胁迫相关基因的差异表达[J].生态学报,2013,33(5):1594-1606.
Chen W R, Ye J J, Li Y Q, et al. Analysis of cold-regulated gene expression of the fingered citron (*Citrus medica* L. var.

- sarcodactylis* Swingle) [J]. *Journal of Ecology*, 2013, 33(5): 1594-1606.
- [22] 侯立刚, 陈温福, 马巍, 等. 低温胁迫下不同磷营养对水稻叶片质膜透性及抗氧化酶活性的影响 [J]. *华北农学报*, 2012, 27(1): 118-123.
Hou L G, Chen W F, Ma W, et al. Effects of different phosphate fertilizer application on permeability of membrane and antioxidative enzymes in rice under low temperature stress [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(1): 118-123.
- [23] 崔国文. 紫花苜蓿田间越冬抗寒生理研究 [J]. *草地学报*, 2009, 17(2): 145-150.
Cui G W. The physiological responses of cold resistance in alfalfa during overwintering period in the field [J]. *Journal of Grassland Science*, 2009, 17(2): 145-150.
- [24] 李硕, 张毅, 姚棋, 等. 等渗盐胁迫下 BR 对番茄生长及渗透调节特性的影响 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2020, 48(4): 130-136, 145.
Li S, Zhang Y, Yao Q, et al. Effects of brassinolide on seedling growth and osmotic regulation characteristics of tomato under iso-osmotic salt stress [J]. *Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed)*, 2020, 48(4): 130-136, 145.
- [25] 王佳珍, 刘倩, 高娅妮, 等. 植物对盐碱胁迫的响应机制研究进展 [J]. *生态学报*, 2017, 37(16): 5565-5577.
Wang Q Z, Liu Q, Gao Y N, et al. Review on the mechanisms of the response to salinity-alkalinity stress in plants [J]. *Journal of Ecology*, 2017, 37(16): 5565-5577.
- [26] 柯野, 谢璐, 蓝林, 等. 低磷胁迫对甘蔗幼苗生长和生理特性的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2019, 47(20): 114-118.
Ke Y, Xie L, Lan L, et al. Effects of low phosphorus stress on growth and physiological characteristics of sugarcane seedlings [J]. *Giangu Agricultural Sciences*, 2019, 47(20): 114-118.
- [27] 乔光, 崔博文, 文晓鹏, 等. 不同种源马尾松幼苗对低磷胁迫的生理响应 [J]. *种子*, 2017, 36(8): 32-36, 41.
Qiao G, Cui B W, Wen X P, et al. Physiological and biochemical responses to low phosphorus stress for different masson pine (*Pinus massoniana*) provenances [J]. *Seed*, 2017, 36(8): 32-36, 41.
- [28] 郑金凤, 李成璞, 董少鸣, 等. 低磷胁迫对小麦代换系叶绿素和类胡萝卜素含量的影响及染色体效应 [J]. *华北农学报*, 2010, 25(5): 161-165.
Zheng J F, Li C P, Dong S M, et al. The effect of phosphorus deficiency stress on chlorophyll content and corticoid content and chromosome of wheat substitution lines [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(5): 161-165.
- [29] 冯磊, 刘世琦, 成波, 等. 不同水培磷素水平对大蒜产量、光合特性和品质的影响 [J]. *中国土壤与肥料*, 2014(3): 38-43.
Feng L, Liu S Q, Cheng B, et al. Effects of different phosphorus levels on yield, photosynthetic characteristics and quality of garlic under hydroponic culture [J]. *Soil and Fertilizer in China*, 2014(3): 38-43.

(上接第 57 页)

- [20] 李信恺, 孙涛, 旺扎, 等. 西藏地区燕麦与箭筈豌豆不同混播比例对牧草产量和质量的影响 [J]. *草地学报*, 2011, 19(5): 830-833.
Li J K, Sun T, Wang Z, et al. Effects on mixture sowing ratio on the yield and quality of both vetch and oat in Tibet [J]. *Acta Grassland Sinica*, 2011, 19(5): 830-833.
- [21] 王伟, 徐成体. 河南县燕麦和箭筈豌豆不同混播比例草地生产性能的综合评价 [J]. *青海畜牧兽医杂志*, 2016, 46(1): 10-12.
Wang W, Xu C T. Evaluation on production performance of different mixture ratio of oat and common vetch in Henan county [J]. *Qinghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine Sinica*, 2016, 46(1): 10-12.
- [22] 张宏宇, 杨恒山, 李春辉, 等. 不同混播方式下苜蓿+无芒雀麦人工草地生产力动态研究 [J]. *内蒙古民族大学学报(自然科学版)*, 2008, 23(1): 55-58.
Zhang H Y, Yang H S, Li C H, et al. Research on the dynamics of productive forces of alfalfa+awnless brome man-made grassland under the different patterns of mixed sowing [J]. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2008, 23(1): 55-58.
- [23] 祁军, 郑伟, 张鲜花, 等. 不同豆禾混播模式的草地生产性能 [J]. *草业科学*, 2016, 33(1): 116-128.
Qi J, Zheng W, Zhang X H, et al. Determination and comparison of the production performance of pastures among different spatial structure of legume-grass mixtures [J]. *Pratacultura Science*, 2016, 33(1): 116-128.
- [24] 王富强, 向洁, 郭宝光, 等. 拉萨河谷区箭筈豌豆和黑麦混播间播建植方式研究 [J]. *草业学报*, 2018, 27(8): 39-49.
Wang F Q, Xiang J, Guo B G, et al. Establishment of *Vicia sativa*-*Secale cereale* mixed and intercropping methods for the Lhasa valley area [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(8): 39-49.
- [25] 李春喜, 叶润蓉, 周玉碧, 等. 高寒牧区燕麦与箭筈豌豆混播生产性能及营养价值评价 [J]. *草原与草坪*, 2016, 36(5): 40-45.
Li C X, Ye R R, Zhou Y B, et al. Evaluation on production performance and nutritive value of oat and common vetch mixture in alpine pastoral region [J]. *Grassland and Lawn*, 2016, 36(5): 40-45.
- [26] Li C J, Li Y Y, Yu C B, et al. Crop nitrogen use and soil mineral nitrogen accumulation under different crop combinations and patterns of strip intercropping in northwest China [J]. *Plant and Soil*, 2011, 342(1/2): 221-231.
- [27] 郑敏娜, 梁秀芝, 韩志顺, 等. 不同苜蓿品种在雁门关地区的生产性能和营养价值研究 [J]. *草业学报*, 2018, 27(5): 97-108.
Zheng M N, Liang X Z, Han Z S, et al. Productivity and nutritional value of 28 alfalfa varieties in the Yanmenguan area of Shanxi province [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2018, 27(5): 97-108.