

doi:10.11733/j.issn.1007-0435.2026.04.030

引用格式:马香香,南丽丽,杨丽丽,等.油菜素内酯对低温胁迫下紫花苜蓿生长及生理特性的影响[J].草地学报,2026,34(4):1492—1501

MA Xiang-xiang, NAN Li-li, YANG Li-li, et al. Effects of Brassinolide on Growth and Physiological Characteristics of Alfalfa under Low Temperature Stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2026, 34(4):1492—1501

油菜素内酯对低温胁迫下紫花苜蓿生长及生理特性的影响

马香香,南丽丽*,杨丽丽,王利群,田戈,郭佳雨

(甘肃农业大学草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/农业农村部饲草种质创新与新品种选育重点实验室,
甘肃兰州730070)

摘要:为探明低温胁迫下喷施油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)对紫花苜蓿(*Medicago sativa*)幼苗生长和生理特性的影响,本研究以抗寒苜蓿新品系(P4)和‘陇东苜蓿’(*Medicago sativa* ‘Longdong’)为研究对象,低温胁迫(4℃)13 d后,对叶面喷施不同浓度的外源BR(0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mg·L⁻¹, 分别代表T₀, T₁, T₂, T₃, T₄处理), 5天后测定其幼苗形态和生理指标。结果表明:低温胁迫显著抑制了苜蓿幼苗的生长;然而,施加不同浓度BR后,供试苜蓿幼苗株高、叶长、叶宽、叶面积、地上与地下生物量、根冠比、根系总长度、根总表面积、根直径、根体积、根尖数、根系活力、苯丙氨酸解氨酶、肉桂酸-4-羟基化酶、4-香豆酸辅酶A连接酶和总黄酮含量指标均显著高于T₀($P < 0.05$);丙二醛含量显著降低($P < 0.05$)。隶属函数综合评价显示不同浓度BR处理依次表现为:T₂ > T₁ > T₃ > T₄ > T₀, 表明喷施0.25~1.00 mg·L⁻¹的BR均能缓解低温对苜蓿幼苗生长的影响,但以0.5 mg·L⁻¹(T₂)的BR处理效果最优,其研究结果为合理利用BR解决苜蓿栽培中的冷害问题提供了理论依据。

关键词:紫花苜蓿;低温胁迫;油菜素内酯;生理特性;隶属函数

中图分类号:S541.9

文献标识码:A

文章编号:1007-0435(2026)04-1492-10

Effects of Brassinolide on Growth and Physiological Characteristics of Alfalfa under Low Temperature Stress

MA Xiang-xiang, NAN Li-li*, YANG Li-li, WANG Li-qun, TIAN Ge, GUO Jia-yu

(College of Pratacultural Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem, Ministry of Education/ Key Laboratory of Forage Gerplasm Innovation and New Variety Breeding of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Lanzhou, Gansu Province 730070, China)

Abstract: In order to explore the effects of spraying brassinosteroid (BR) on the growth and physiological characteristics of alfalfa (*Medicago sativa*) seedlings under low temperature stress, the new cold-resistant alfalfa line (P4) and Longdong alfalfa (*Medicago sativa* ‘Longdong’) were used as the research objects in this study. After 13 days of low temperature stress (4℃), different concentrations of exogenous BR (0.00, 0.25, 0.50, 0.75, and 1.00 mg·L⁻¹, representing T₀, T₁, T₂, T₃, T₄ treatment, respectively) were sprayed on the leaves. After 5 days, the morphological and physiological indexes of the seedlings were measured. The results showed that low temperature stress significantly inhibited the growth of alfalfa seedlings. However, after applying different concentrations of BR, the plant height, leaf length, leaf width, leaf area, aboveground and underground biomass, root shoot ratio, total root length, total root surface area, root diameter, root volume, root tip number, root activity, phenylalanine ammonia lyase, cinnamic acid-4-hydroxylase, 4-coumaric acid coenzyme A ligase and total flavonoid content of alfalfa seedlings were significantly higher than those of T₀ ($P < 0.05$).

收稿日期:2025-06-16;修回日期:2025-08-04

基金项目:油菜秸秆与紫花苜蓿混贮效果研究及示范推广(ZC-STK-2024A-013);国家现代农业产业技术体系(CARS-34)共同资助

作者简介:马香香(1998-),女,汉族,安徽滁州人,硕士研究生,主要从事牧草栽培与育种研究,E-mail: 1963962817@qq.com; *通信作者
Author for correspondence, E-mail: nanll@gsau.edu.cn

The content of malondialdehyde decreased significantly ($P < 0.05$). The comprehensive evaluation of membership function showed that different concentrations of BR treatments were in the order of $T_2 > T_1 > T_3 > T_4 > T_0$, indicating that spraying $0.25\text{--}1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BR could alleviate the effects of low temperature on the growth of alfalfa seedlings, while the $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (T_2) BR treatment was the best. The results provided a theoretical basis for the rational use of BR to solve the problem of chilling injury in alfalfa cultivation.

Key words: Alfalfa; Low temperature stress; Brassinosteroid; Physiological Characteristics; Membership Function

低温胁迫是影响植物生长发育、地理分布及作物生产力的关键因素,尤其在北方及高海拔地区,由低温引起的作物损失巨大^[1-2]。紫花苜蓿(*Medicago sativa*) (简称苜蓿)作为多年生优质豆科牧草,因其高生物量、丰富的营养价值、良好的适口性和广泛的适应性而备受赞誉,在我国北方地区广泛种植^[3-4]。然而,北方冬季严寒以及春季倒春寒频发,常使苜蓿难以顺利越冬,返青率大幅降低,对牧草产业发展造成了严重制约^[5]。因此,探究如何缓解低温对紫花苜蓿的伤害,对促进我国北方紫花苜蓿生产具有重要意义。

油菜素内酯(Brassinosteroid, BR)作为一种具有显著生理活性的类固醇类植物激素,广泛调控植物生长发育及逆境胁迫响应^[6-7],因其广谱、无毒、渗透性强、内吸快、微量高效等特点而备受关注^[8]。寇江涛等^[9]研究表明,外源2,4-表油菜素内酯(2,4-epibrassinolide, EBR)可缓解盐胁迫对紫花苜蓿根系的抑制,通过提升渗透调节和抗氧化能力,减少活性氧(Reactive oxygen species, ROS)的积累和膜脂过氧化,促进根系生长,增强抗盐性。苯丙素代谢途径是植物次生代谢的核心途径之一,广泛参与植物生长发育进程和防御机制^[10]。苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是苯丙素代谢途径的起始步骤,肉桂酸4-羟基化酶(Cinnamate4-hydroxylase, C4H)是连接苯丙代谢上游与下游代谢产物合成的枢纽酶,4-香豆酸辅酶A连接酶(4-coumaric acid coenzyme A ligase, 4CL)是木质素合成及其他苯丙烷类化合物代谢流向的调控点^[11]。PAL、C4H和4CL参与木质素、黄酮类等次生代谢产物的合成,其活性变化与植物对逆境的响应密切相关^[12]。申雨肖等^[13]研究指出,适宜的BR浓度可显著增加半夏[*Pinellia ternate* (Thunb.)]黄酮的含量,促进苯丙烷代谢途径,提高PAL的活性。

Ahammed等^[14]发现外源EBR能够显著提升黄瓜(*Cucumis sativus*)植株的次生代谢途径活性,进而增强相关关键酶的催化效能,并加速黄酮类化合物的合成与累积过程。Li等^[15]研究指出,将刺槐(*Robinia pseudoacacia*)幼苗的根浸没于BR溶液

里,可显著提升刺槐幼苗的存活概率,对其正常的生长发育进程起促进作用。王丽君等^[16]研究认为,喷施适宜浓度的BR能够显著提高植物幼苗的总根长、总根表面积、根平均直径、根尖数、地上部和地下部鲜质量,而丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量显著下降,从而缓解胁迫伤害。黄一龙等^[17]研究表明,EBR能明显提高紫花苜蓿脯氨酸含量,减少可溶性蛋白的流失,维持较高的抗氧化能力,减轻高温胁迫对苜蓿幼苗生长的抑制作用。

综上,外源BR对不同作物在不同逆境下的响应存在差异,而利用BR缓解低温胁迫对苜蓿幼苗的伤害少见报道。为此,本研究以紫花苜蓿为试验材料,探究不同浓度外源BR处理对苜蓿幼苗生长和生理特性的影响,以期对苜蓿高产栽培和耐寒性研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以前期筛选的抗寒苜蓿新品系P4和地方品种陇东紫花苜蓿(*M. sativa* 'Longdong', 记为LD)为试验材料^[20],其中P4为'7890'×'陇东苜蓿',材料7890由农业部全国畜牧兽医总站牧草种质资源搜集保护项目协作组从俄罗斯瓦维洛夫植物基因库引进^[18]。

1.2 试验设计

试验于2024年5月在甘肃农业大学生长室进行,苜蓿种子用10% NaClO溶液消毒后均匀播种于砂培塑料杯(杯高15 cm,直径8 cm)中,每杯38粒苜蓿种子。出苗后隔2 d浇灌70 mL Hoagland营养液,每杯保留长势一致的幼苗18株;待株高达20 cm左右时,参考普布卓玛等^[19]的试验设计,设置6个处理分别为:CK(25℃)、4℃低温胁迫13 d + $0.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BR (T_0)、4℃低温胁迫13 d + $0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BR (T_1)、4℃低温胁迫13 d + $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BR (T_2)、4℃低温胁迫13 d + $0.75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BR (T_3)、4℃低温胁迫13 d + $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BR (T_4),前期实验已筛选出4℃低温

胁迫下处理 13 d 为敏感时间点^[20], BR 以叶面喷施的方式于每日 17:00 喷施, 每杯均匀喷施 50 mL, 每天喷施 1 次, CK 喷施清水, 共喷施 4 次, 5 d 后测定相关形态与生理指标, 每个处理 3 次重复。

1.3 测定指标与方法

1.3.1 形态指标测定 绝对株高: 随机选取 10 株苜蓿用卷尺测量绝对高度, 取均值;

叶长、叶宽、叶面积: 选取植株自顶部向下数的第 3 片叶, 利用 LI-3000C 叶面积仪进行测量, 每个处理重复 10 次。

生物量: 将 10 株苜蓿幼苗从茎与根的连接处用剪刀将其分割, 获得地上部和地下部并称量其鲜重, 并将样品置于 105℃ 的烘箱中杀青 20 min 后在 75℃ 下烘干至恒重。

根冠比=地下部分干重/地上部分干重;

苜蓿根系形态: 使用根系扫描仪 (Epson Experssion 12000XL, Japan) 对苜蓿根系进行扫描并将图片保存至电脑, 根系扫描仪分辨率设置为 300 dpi; 利用 WinRHIZO 软件进行根系图片分析, 得到根系总表面积、根系平均直径、根系总长度、根体积和根尖数等根系参数^[6]。

1.3.2 生理指标测定 参考邹琦^[21]的方法, 根系活力和丙二醛 (MDA) 含量分别采用 2, 3, 5-氯化三苯基四氮唑 (TTC) 法和硫代巴比妥酸法测定; 苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 参照徐友^[22]的方法测定; 肉桂酸 4-羟基化酶 (Cinnamate 4-hydroxylase, C4H) 参照 Lamb 等^[23]方法测定; 4-香豆酸辅酶 A 连接酶 (4-coumaric acid coenzyme A ligase, 4CL) 参照 Knobloch 等^[24]方法测定; 总黄酮含量: 参考许英一等^[25]超声波辅助乙醇提取法测定; 每项指标 3 次重复。

1.4 数据统计分析

使用 Excel 2019 整理数据, SPSS 25.0 进行单因素分析 (ANOVA), 利用 Origin 2024 软件绘制图。

采用隶属函数法进行综合评价, 得到最佳 BR 浓度, 与冷胁迫呈正相关的指标, 使用隶属函数 $F_{ij} = (X_{ij} - X_{jmin}) / (X_{jmax} - X_{jmin})$ 公式计算; 与冷胁迫呈负

相关的指标, 则利用隶属函数 $F_{ij} = 1 - (X_{ij} - X_{jmin}) / (X_{jmax} - X_{jmin})$ 计算^[20]。其中 F_{ij} 表示低温胁迫下 i 紫花苜蓿的 j 性状的隶属值; X_{ij} 代表 i 紫花苜蓿的 j 性状测定值; X_{jmin} 和 X_{jmax} 分别为 j 性状中测定的最小值和最大值; 单个指标的权重: $W_j = I_j / \sum I_j$ 计算, 综合评价: $D = \sum (F_{ij} \times W_j)$ ^[20]。

2 结果与分析

2.1 油菜素内酯对低温胁迫下苜蓿株高、叶长、叶宽及叶面积的影响

如图 1 所示, 低温胁迫下, 与 CK 处理相比, 供试苜蓿株高、叶长、叶宽及叶面积均显著下降 ($P < 0.05$)。随 BR 浓度增加, 供试苜蓿形态指标呈先升高后下降趋势, 并在 T_2 处理时达到最大值, 其值均显著大于 T_0 处理 ($P < 0.05$), 但均显著小于 CK ($P < 0.05$)。 T_2 处理时, LD 和 P4 的株高、叶长、叶宽、叶面积分别为 25.7 cm 和 27.0 cm, 1.61 cm 和 1.71 cm, 0.75 cm 和 0.85 cm, 0.86 cm² 和 1.03 cm²。LD 的株高、叶长、叶宽、叶面积均显著低于 P4 ($P < 0.05$); 同时, T_2 处理下, LD 和 P4 的株高、叶长、叶宽、叶面积较 T_0 分别增加了 49.48% 和 38.67%, 36.07% 和 34.35%, 141.94% 和 105.83%, 230.06% 和 176.29%; 且 LD 的各项指标增幅均大于 P4。

2.2 油菜素内酯对低温胁迫下苜蓿生物量及根冠比的影响

低温胁迫下, 供试苜蓿地上生物量、地下生物量及根冠比较 CK 显著下降 ($P < 0.05$) (图 2)。随 BR 浓度升高, 供试苜蓿地上地下生物量及根冠比呈先上升后下降趋势, 并在 T_2 处理时达到最高值, 其值均大于 T_0 处理, 但均小于 CK。 T_2 处理时, LD 和 P4 的地上生物量、地下生物量、根冠比分别为 1.06 g·m⁻² 和 1.31 g·m⁻², 1.20 g·m⁻² 和 1.55 g·m⁻², 1.13 和 1.19; LD 的地上生物量、地下生物量、根冠比均低于 P4, 同时, T_2 处理下, LD 和 P4 的地上生物量、地下生物量及根冠比分别是 T_0 的 1.89 和 1.93 倍, 2.90 和 2.97 倍, 1.54 和 1.56 倍, 且 LD 的各项指标增长倍数均小于 P4。

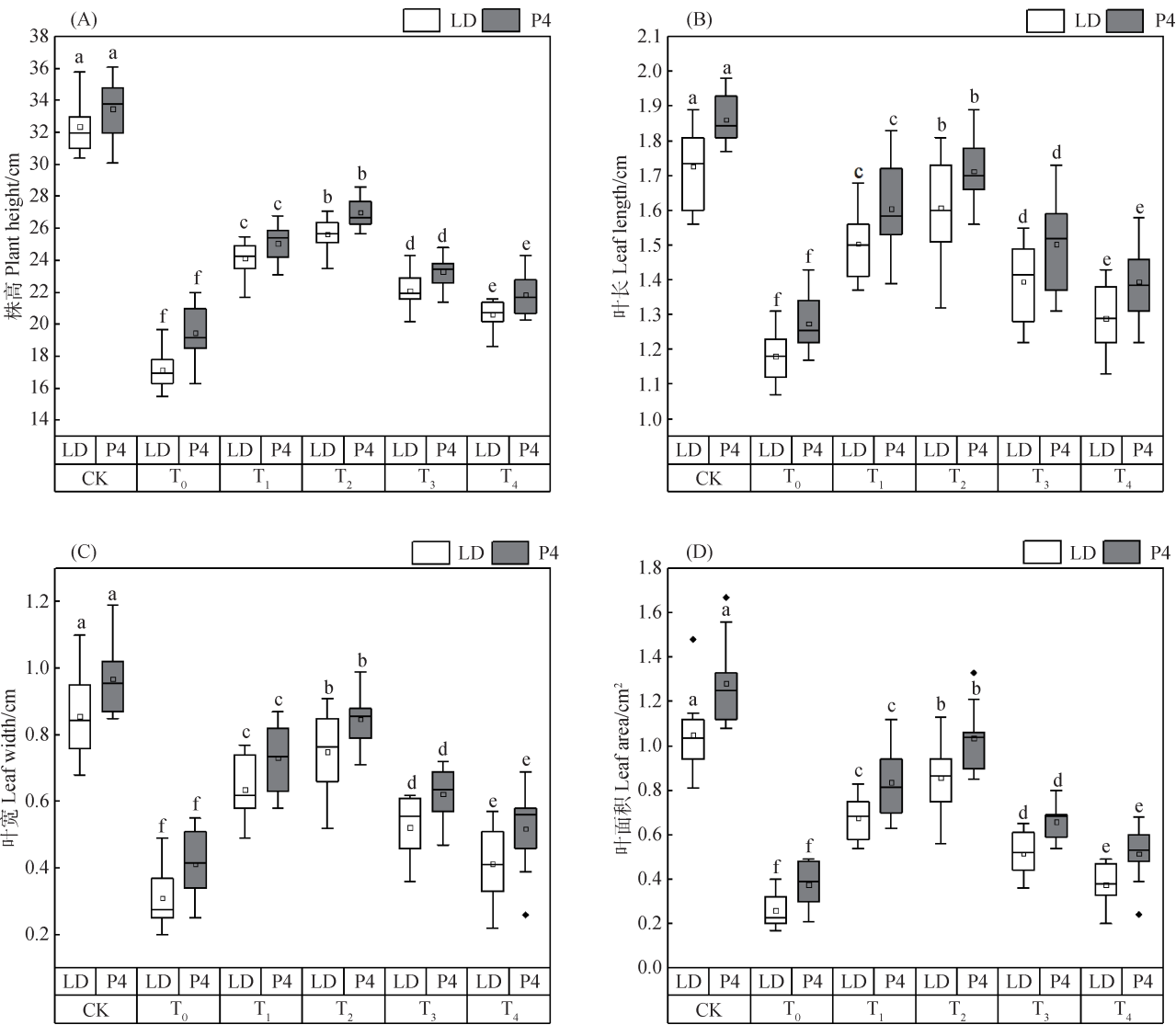


图 1 油菜素内酯对低温胁迫紫花苜蓿株高、叶长、叶宽及叶面积的影响

Fig. 1 Effects of brassinolide on plant height, leaf length, leaf width and leaf area of alfalfa under low temperature stress

注:LD,陇东紫花苜蓿;P4,抗寒紫花苜蓿新品系;CK,25℃常温处理;T₀,4℃低温处理 13 d+0.00 mg·L⁻¹BR;T₁,4℃低温处理 13 d+0.25 mg·L⁻¹BR;T₂,4℃低温处理 13 d+0.50 mg·L⁻¹BR;T₃,4℃低温处理 13 d+0.75 mg·L⁻¹BR;T₄,4℃低温处理 13 d+1.00 mg·L⁻¹BR,不同小写字母表示同一材料不同浓度间差异显著(P<0.05),下同

Note: LD, *Medicago sativa* 'Longdong'; P4, cold-resistant alfalfa new line; CK, 25°C normal temperature treatment; T₀, 4°C low temperature treatment for 13 d+0.00 mg·L⁻¹BR; T₁, 4°C low temperature treatment for 13 d+0.25 mg·L⁻¹BR; T₂, 4°C low temperature treatment for 13 d+0.50 mg·L⁻¹BR; T₃, 4°C low temperature treatment for 13 d+0.75 mg·L⁻¹BR; T₄, 4°C low temperature treatment for 13 d+1.00 mg·L⁻¹BR, Different lowercase letters indicate that the difference between different concentrations of the same material is significant (P<0.05), the same as below

2.3 油菜素内酯对低温胁迫下苜蓿根系形态指标的影响

由图 3 可知,供试苜蓿在低温胁迫下根系形态与 CK 相比均显著减少(P<0.05),随 BR 浓度递增,供试苜蓿根系形态均呈先升后降趋势,并在 T₂ 处理时达到最大值,其值均显著大于 T₀ 处理(P<0.05),但均显著小于 CK(P<0.05)。T₂ 处理下,LD 和 P4 的根系总长度、根系总表面积、根系平均直径、根体

积、根尖数分别为 105.95 cm 和 122.09 cm,10.16 cm² 和 11.82 cm²,0.34 mm 和 0.40 mm,0.38 cm³ 和 0.47 cm³,190.00 和 234.33;LD 根系形态指标均低于 P4;同时,T₂ 处理时,LD 和 P4 的根系总长度、总表面积、平均直径、根体积、根尖数分别为 T₀ 的 2.31 和 2.44 倍,2.08 和 2.11 倍,2.35 和 2.41 倍,2.29 和 2.33 倍,1.85 和 1.98 倍;且 LD 的根系形态指标增长倍数均低于 P4。

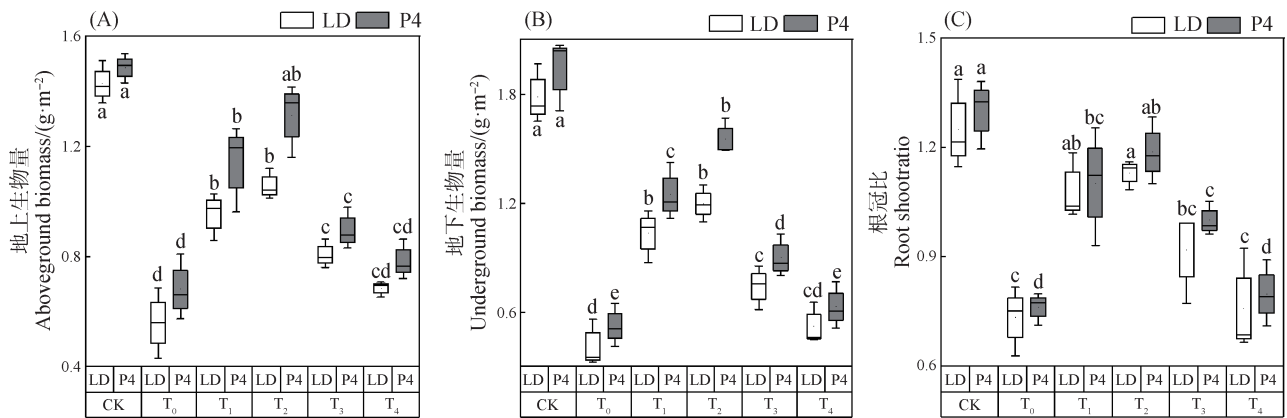


图2 油菜素内酯对低温胁迫紫花苜蓿生物量和根冠比的影响

Fig. 2 Effects of brassinolide on biomass and root-shoot ratio of alfalfa under low temperature stress

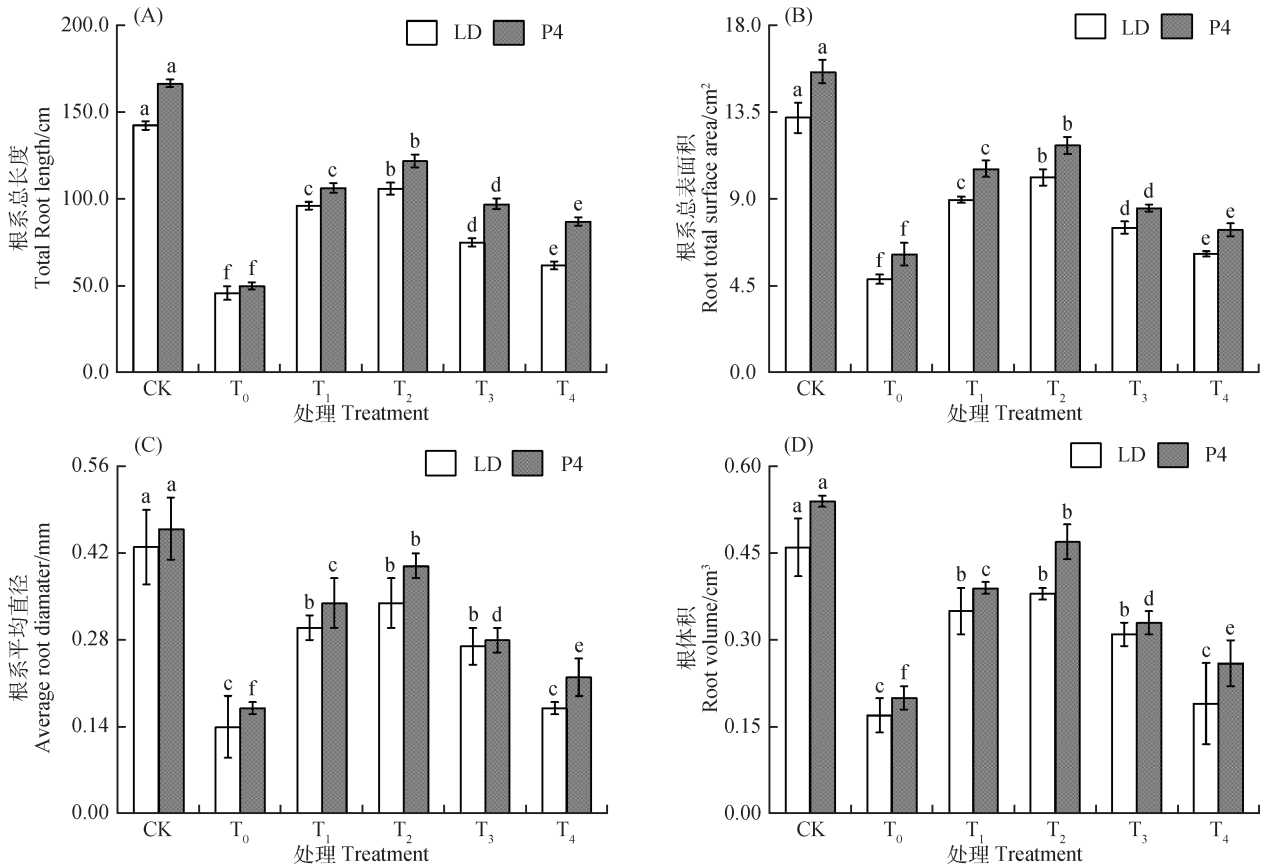


图3 油菜素内酯对低温胁迫紫花苜蓿根系形态指标的影响

Fig. 3 Effects of brassinolide on root morphological indexes of alfalfa under low temperature stress

2.4 油菜素内酯对低温胁迫下苜蓿根系活力和丙二醛含量的影响

由图4可知,4℃胁迫后,供试苜蓿根系活力与CK相比显著下降,而MDA显著升高($P < 0.05$)。LD和P4根系活力随BR浓度的递增呈先升后降趋势,并在T₂处理下达到最大值,其值显著高于T₀处理($P <$

0.05),但显著低于CK($P < 0.05$)。T₂处理时,LD和P4的根系活力较T₀增加了109.66%和115.73%。而MDA随BR浓度的升高呈先降后升趋势,并在T₂时达到最小值,其值显著小于T₀处理($P < 0.05$),但显著大于CK($P < 0.05$)。在T₂处理下,LD和P4的MDA较T₀处理显著降低了72.29%和73.29%。

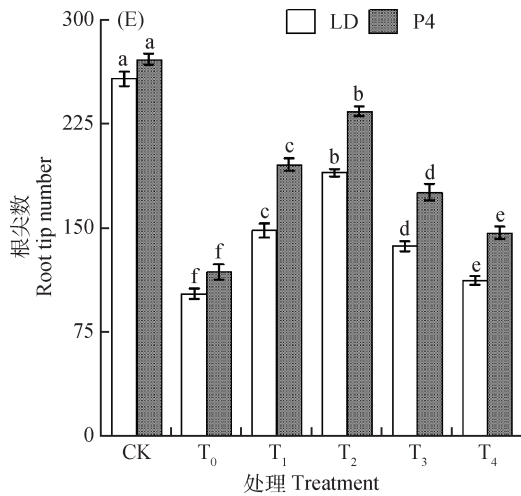


图4 油菜素内酯对低温胁迫紫花苜蓿根系活力和丙二醛含量的影响

Fig. 4 Effects of brassinolide on root activity and malondialdehyde content of alfalfa under low temperature stress

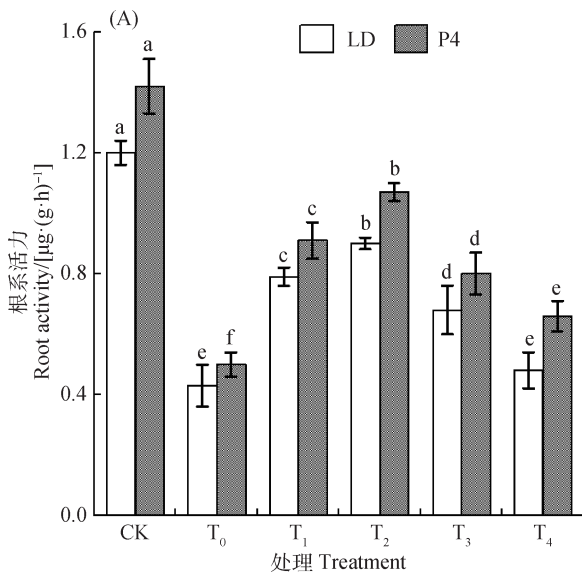


图5 油菜素内酯对低温胁迫紫花苜蓿关键酶活性和总黄酮含量的影响

Fig. 5 Effects of brassinolide on key enzyme activity and total flavonoid content of alfalfa under low temperature stress

2.6 隶属函数综合评价

利用隶属函数法对不同浓度外源BR处理进行综合评价。由表1可知, T₀, T₁, T₂, T₃, T₄处理下的D值分别为0.0731, 0.5441, 0.6994, 0.3940, 0.2226;不同浓度BR处理由强到弱依次表现为: T₂ > T₁ > T₃ > T₄ > T₀。表明经低温胁迫和BR喷施处理后, T₂处理对苜蓿低温胁迫缓解效果最佳。

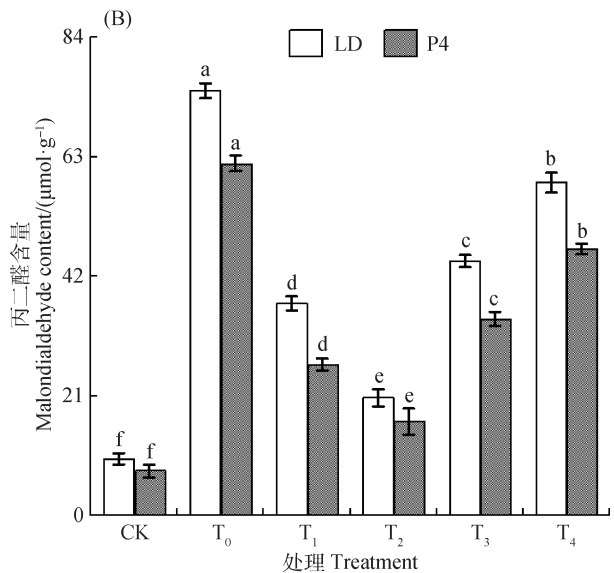
3 讨论

3.1 低温胁迫下苜蓿形态特征对外源BR的响应

植物抗逆性鉴定中, 形态学指标被广泛应用。

2.5 油菜素内酯对低温胁迫下苜蓿关键酶活性和总黄酮含量的影响

如图5可知, 低温胁迫下, 供试苜蓿苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸4-羟基化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶A连接酶(4CL)、总黄酮含量较CK显著升高($P < 0.05$)。随BR浓度增加, 供试苜蓿PAL、C4H、4CL、总黄酮含量呈先升后降趋势, 并在T₂处理时达到最高, 其值均显著大于CK和T₀处理($P < 0.05$); T₂处理下, LD的关键酶活性和总黄酮含量均显著低于P4($P < 0.05$); 同时, T₂处理时, LD的PAL、C4H、4CL和总黄酮含量分别较T₀处理增长了1.48倍、1.51倍、1.27倍、1.44倍; P4的PAL、C4H、4CL和总黄酮含量分别较T₀处理增长了1.45倍、1.45倍、1.07倍、1.37倍; 且LD的PAL、C4H、4CL和总黄酮含量增长倍数均高于P4。



例如, 株高、叶长和叶宽等指标可直观、快速地反映出植株的生长状况以及对逆境胁迫的敏感程度^[26]。逆境胁迫下, 植物通常表现出典型的胁迫症状, 如组织失水、植株萎蔫等表型变化, 显著降低株高、茎粗等生长指标及鲜重、干重等生物量指标, 严重时甚至导致植株死亡^[27]。本研究中, 低温处理显著抑制了苜蓿幼苗的生长发育, 具体表现为株高、叶长、叶宽、叶面积、生物量、根冠比均显著下降。喷施不同浓度BR后均能在不同程度上缓解低温胁迫对苜蓿幼苗生长的抑制作用, 并以0.50 mg·L⁻¹(T₂)的BR处理效果最为显著, 这与石欣隆等^[28]研究结果一致。

表 1 外源 BR 对低温胁迫下苜蓿隶属函数值和综合评价的影响

Table 1 Effects of exogenous BR on membership function value and comprehensive evaluation of alfalfa under cold stress

处理 Treatment	株高 Plant height		叶长 Leaf length		叶宽 Leaf width		叶面积 Leaf area		地上生物量 Aboveground biomass		地下生物量 Underground biomass		根冠比 Root shoot ratio	
	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$
T ₀	0.0396	0.0707	0.0321	0.0691	0.0561	0.0775	0.0820	0.0563	0.0520	0.0656	0.0881	0.0360	0.0375	0.0257
T ₁	0.0543	0.4565	0.0468	0.5493	0.0542	0.5669	0.0627	0.4847	0.0568	0.5259	0.0665	0.4770	0.0474	0.6321
T ₂	0.0607	0.5609	0.0524	0.7044	0.0554	0.7432	0.0599	0.6698	0.0602	0.6741	0.0664	0.6303	0.0534	0.7494
T ₃	0.0497	0.3403	0.0424	0.3941	0.0547	0.3982	0.0683	0.3200	0.0588	0.3144	0.0781	0.2674	0.0456	0.3996
T ₄	0.0424	0.2506	0.0366	0.2375	0.0538	0.2363	0.0723	0.1810	0.0544	0.1881	0.0888	0.1063	0.0449	0.0788

处理 Treatment	根系总长度 Root length		根系总表面积 Root total surface area		根平均直径 Average root diameter		根体积 Root volume		根尖数 Root tip number		根系活力 Root activity		丙二醛含量 Malonaldehyde content	
	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$
T ₀	0.0707	0.0171	0.0605	0.0334	0.0630	0.0339	0.0594	0.0479	0.0528	0.0463	0.0623	0.0343	0.1693	0.0954
T ₁	0.0618	0.4586	0.0598	0.4573	0.0558	0.5614	0.0553	0.5302	0.0633	0.4104	0.0625	0.4242	0.1445	0.6400
T ₂	0.0658	0.5627	0.0638	0.5670	0.0585	0.7059	0.0568	0.6957	0.0610	0.6467	0.0647	0.5577	0.1017	0.8388
T ₃	0.0619	0.3323	0.0613	0.2958	0.0550	0.4146	0.0537	0.4042	0.0586	0.3179	0.0608	0.3117	0.1525	0.5242
T ₄	0.0575	0.2364	0.0580	0.1799	0.0624	0.1637	0.0615	0.1548	0.0565	0.1585	0.0637	0.1410	0.1623	0.3290

处理 Treatment	苯丙氨酸解氨酶 Phenylalanine ammonia-lyase		肉桂酸-4-羟化酶 Cinnamate-4-hydroxylase		4-香豆酸辅酶 A 连接酶含量 4-coumaric acid coenzyme A ligase		总黄酮含量 Total flavonoids content		D 值 D value	排序 Order
	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$	W_j	$F_{\bar{j}}$		
T ₀	0.0157	0.4561	0.0182	0.3036	0.0204	0.2764	0.0205	0.2129	0.0731	5
T ₁	0.0220	0.7996	0.0249	0.7224	0.0315	0.7666	0.0301	0.6630	0.5441	2
T ₂	0.0238	0.9554	0.0272	0.8809	0.0358	0.9193	0.0321	0.9325	0.6994	1
T ₃	0.0201	0.6907	0.0232	0.5713	0.0278	0.6376	0.0276	0.4912	0.3940	3
T ₄	0.0177	0.5798	0.0202	0.4486	0.0234	0.4959	0.0236	0.3517	0.2226	4

低温胁迫下,植物根系是最先感知胁迫的器官。根系作为苜蓿的重要营养器官,主要负责吸收水分和养分,其生长发育状况直接影响茎和叶的生长,进而影响苜蓿的品质和产量^[29]。根系形态的变化是最直观的表现形式之一^[30-31]。根系表面积作为评估植物根系与外界环境交互界面大小的关键指标,不仅揭示了根系发育的状态,还显著影响着植物获取养分及水分的能力,从而对植物的整体生长和发育起到关键作用^[32-33]。本研究中,供试苜蓿在低温胁迫下根系形态显著降低,说明低温胁迫抑制了根系的生长;然而,随 BR 浓度的递增,供试苜蓿根系的总长度、总表面积、平均直径、根体积和根尖数均呈先升高后降低趋势,表明喷施适宜浓度的外源 BR 能够有效促进苜蓿幼苗根系生长,缓解低温胁迫对苜蓿幼苗生长发育的抑制程度,并以 0.50 mg·L⁻¹(T₂)的 BR 处理效果最佳,说明 BR 可能通过诱导苜蓿幼苗产生保护机制,进而积累更多营养物质,促进幼苗的正常生长和形态建成,并提高其耐寒性,这与前人研究结果一致^[34]。此外,本研究发现,低温胁迫下喷施 BR 后,新品系 P4 的株高、叶长、叶宽和叶面积增幅均小于 LD,但其生物量、根冠比和根系形态的增长倍数均高于 LD,说明 P4 通

过根系生长以增强对养分和水分的吸收能力,从而提高整体的抗逆性。同时,BR 对 P4 的根系促进作用更为显著。这可能是由于 P4 具有更强的低温适应性,且 BR 通过促进细胞分裂与伸长、增强渗透调节能力等途径来提高植物的抗逆性,从而缓解低温胁迫对苜蓿幼苗的伤害,表明 BR 在调节植物逆境响应中具有重要作用。

3.2 低温胁迫下苜蓿生理特征对外源 BR 的响应

根系活力是衡量植物根系代谢活动和生理功能的重要指标,能够反映植物根系的吸收能力、物质代谢水平及对逆境胁迫的适应性,根系活力高低直接影响幼苗的生长和发育^[35]。本研究中,供试苜蓿根系活力在低温胁迫下显著下降,经不同浓度的 BR 处理后,根系活力显著提高,并以 0.50 mg·L⁻¹(T₂)的 BR 处理效果最明显,说明 BR 能够有效增强根系吸收和利用水分的能力,从而减轻低温胁迫对苜蓿幼苗的伤害,这与黄斌等^[36]研究结果一致。低温条件下,植物细胞内的活性氧会显著增加,从而导致膜脂过氧化反应加剧,进而损害细胞膜的结构与稳定性,此过程中膜脂过氧化的终产物为 MDA,其含量水平被用作评估细胞膜受损状况的关键指

标^[37]。本研究中,低温胁迫下苜蓿幼苗叶片MDA含量显著升高;经喷施不同浓度BR后,MDA含量显著降低,这与刘良松等^[38]研究结果一致,表明外源BR可有效缓解低温胁迫诱导的膜脂过氧化反应,减轻氧化损伤,从而提高苜蓿幼苗的抗寒性。

关键酶活性变化直接影响植物次生代谢产物的合成,是植物适应逆境胁迫的重要生理基础^[39]。黄酮类化合物作为植物体内重要的次级代谢产物,能够捕获细胞内的ROS,减轻由此引发的氧化应激与伤害,调节细胞内多种关键酶的功能,并在植物生长发育及逆境胁迫中发挥着重要作用^[40]。PAL、C4H和4CL作为关键酶能够激活植株苯丙烷的代谢,生成多种黄酮类次生代谢产物^[41]。周平等^[42]研究发现,4℃低温处理显著提高了桃树(*Prunus persica*)叶片中类黄酮含量和抗氧化能力,说明适当的低温有利于黄酮的合成。梁泰帅等^[43]研究表明,外源EBR处理通过上调类黄酮合成关键酶的活性,促进黄酮合成,减轻逆境胁迫对幼苗的抑制效应,降低叶片氧化损伤,提高植株抗逆性。本研究中,低温胁迫显著提高了苜蓿幼苗叶片中PAL、C4H和4CL关键酶的活性及类黄酮含量,表明低温胁迫通过激活苯丙烷代谢促进黄酮类化合物的积累,从而保护植物组织,这与肖晓燕等^[44]研究结果相同。此外,喷施不同浓度的外源BR能够进一步增加低温胁迫下苜蓿幼苗叶片中PAL、C4H和4CL的活性和类黄酮含量,这与前人研究结果一致^[45],表明BR可能通过增强低温条件下PAL、C4H和4CL酶的活性,促进黄酮类物质的生成,进而强化植物对ROS的清除能力。

综上,当苜蓿幼苗受到低温胁迫时,其生长进程表现出明显的减缓现象,然而,喷施适宜浓度的BR可显著提高低温胁迫下苜蓿幼苗的PAL、C4H和4CL活性,促进类黄酮含量的累积,降低膜脂过氧化水平,减少细胞膜损伤,从而增强紫花苜蓿幼苗对低温胁迫的适应性,并以0.50 mg·L⁻¹(T₂)的BR处理效果最显著。

4 结论

低温胁迫(4℃)显著抑制了苜蓿幼苗的生长。然而,喷施不同浓度(0.00, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 mg·L⁻¹)的BR能够有效缓解低温胁迫对苜蓿幼苗生长的抑制作用,具体表现为喷施BR显著提高了低温胁迫下供试苜蓿株高、叶长、叶宽、叶面积、地

上与地下生物量、根冠比、根系生长与活力,并增加苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸4-羟基化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶A连接酶(4CL)和总黄酮含量,降低丙二醛含量,减轻细胞膜受损,维持根系正常生长。其中以T₂处理(13 d+0.50 mg·L⁻¹ BR)下缓解效果最佳。

参考文献

- [1] SOUALIOU S, DUAN F, LI X, et al. Crop production under cold stress: an understanding of plant responses, acclimation processes, and management strategies [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2022, 190: 47-61
- [2] HASEGAWA T, SAKURAI G, FUJIMORI S, et al. Extreme climate events increase risk of global food insecurity and adaptation needs [J]. *Nature Food*, 2021, 2(8): 587-595
- [3] LE Y, HANNOUFA A, YU P. The use of gene modification and advanced molecular structure analyses towards improving alfalfa forage [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 298
- [4] WANG X, KANG W, WU F, et al. Comparative transcriptome analysis reveals new insight of alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars in response to abrupt freezing stress [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 798-118
- [5] 王晓龙, 杨墨, 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
WANG X L, YANG Z, LAI Y C, et al. Physiological response and cold resistance evaluation of eight alfalfa varieties to low temperature stress [J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2023, 45(8): 60-69
- [6] 李杰, 杨萍, 颜建明, 等. 2,4-表油菜素内酯对低温胁迫下辣椒幼苗根系生长及抗氧化酶系统的影响 [J]. *核农学报*, 2015, 29(5): 1001-1008
LI J, YANG P, XIE J M, et al. Effects of 2,4-epibrassinolide on growth and antioxidant enzymes system in pepper roots under chilling stress [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2015, 29(5): 1001-1008
- [7] EMAMVERDIAN A, GHORBANI A, PEHLIVAN N, et al. Brassinolide ameliorates the detrimental effects of arsenic in tomato: Insights into iron and arsenic absorption, antioxidant capacity, nitrogen, and sulfur assimilation [J]. *Horticultural Plant Journal*, 2025, 11(2): 737-757
- [8] 陈晨, 陈虹, 倪铭, 等. 油菜素内酯调控植物生长发育的研究进展 [J]. *林业科学*, 2022, 58(7): 144-155
CHEN C, CHEN H, NI M, et al. Research progress of brassinolide regulating plant growth and development [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2022, 58(7): 144-155
- [9] 寇江涛, 师尚礼. 2,4-表油菜素内酯对NaCl胁迫下紫花苜蓿幼苗根系生长抑制及氧化损伤的缓解效应 [J]. *中国生态农业学报*, 2015, 23(8): 1010-1019
KOU J T, SHI S L. 2,4-epibrassinolide protection against root

- growth inhibition and oxidative damage of *Medicago sativa* L. seedling under NaCl stress[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2015, 23(8):1010-1019
- [10] ZHANG Q, WANG S K, QIN B, et al. Analysis of the transcriptome and metabolome reveals phenylpropanoid mechanism in common bean (*Phaseolus vulgaris*) responding to salt stress at sprout stage [J]. Food and Energy Security, 2023, 12(5): 481
- [11] GAO S W, WEI D Z, PAN D D, et al. Melatonin promotes accumulation of resveratrol and its derivatives through upregulation of PAL, 4CL, C4H, and STS in Grape Seeds[J]. Horticulturae, 2024, 10(1):65
- [12] JIANG M, PAN Y, YU K C, et al. Metabolic profiling and gene expression analyses shed light on the cold adaptation mechanisms of *saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk[J]. Science Reports, 2025, 15(1):7070
- [13] 申雨肖, 姚晓芹, 张世豪, 等. 油菜素内酯对半夏品质及产量的影响[J]. 北方园艺, 2021(16):116-122
- SHEN Y X, YAO X Q, ZHANG S H, et al. Effect of brassinolide on quality and yield of *Pinellia ternata*[J]. Northern Horticulture, 2021(16):116-122
- [14] AHAMMED G J, HE B B, QIAN X J, et al. 24-Epibrassinolide alleviates organic pollutants-retarded root elongation by promoting redox homeostasis and secondary metabolism in *Cucumis sativus* L[J]. Environmental Pollution, 2017, 229: 922-931
- [15] LI K R, WANG H H, HAN G, et al. Effects of brassinolide on the survival, growth and drought resistance of robinia pseudoacacia seedlings under water-stress[J]. New Forests, 2008, 35(3):255-266
- [16] 王丽君, 李冬, 申洪涛, 等. 油菜素内酯对干旱胁迫下烤烟幼苗生长生理及光合特性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(11):33-41
- WANG L J, LI D, SHEN H T, et al. Effects of brassinolide on growth, physiology and photosynthetic characteristics of flue-cured tobacco seedlings under drought stress [J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2020, 48(11):33-41
- [17] 黄一龙, 庞天德, 史静, 等. 2,4-表油菜素内酯对紫花苜蓿高温胁迫生理特性的影响[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(3):93-95, 99
- HUANG Y L, PANG T D, SHI J, et al. Effects of 2,4-Epibrassinolide on physiological characteristics of alfalfa to high temperature[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(3):93-95, 99
- [18] 马彪, 南丽丽, 汪堃, 等. 30份苜蓿种质材料对低温胁迫的生理响应及其耐寒性评价[J]. 草原与草坪, 2024, 44(6):170-180
- MA B, NAN L L, WANG K, et al. Physiological response and cold tolerance evaluation of 30 alfalfa germplasm to low temperature stress[J]. Grassland and Turf, 2024, 44(6):170-180
- [19] 普布卓玛, 罗艺岚, 高金柱, 等. 2,4-表-油菜素内酯对低温胁迫下西藏野生垂穗披碱草幼苗抗氧化保护和渗透调节的影响[J]. 草地学报, 2019, 27(3):547-552
- PUBUZHUMA, LUO Y L, GAO J Z, et al. Effect of 2,4-epibrassinolide on antioxidant defense and osmotic adjustment of *Elymus nutans* under low temperature stress[J]. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(3):547-552
- [20] 马香香, 南丽丽, 王利群, 等. 紫花苜蓿新品系幼苗对低温胁迫的响应[J]. 中国草地学报, 2025, 47(5): 66-77
- MA X X, NAN L L, WANG L Q, et al. Responses of seedlings from new alfalfa lines to low temperature stress[J]. Chinese Journal of Grassland, 2025, 47(5):66-77
- [21] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 110-174
- ZOU Q. Plant physiology experiment guidance [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003:110-174
- [22] 徐友. 温度和光强对银杏生长和次生代谢产物合成的影响[D]. 南京: 南京林业大学, 2016:68
- XU Y. Effects of temperature and light intensity on growth and secondary metabolites Biosynthesis of ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) Leaves Abstract [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2016:68
- [23] LAMB C J, RUBERY P H. A spectrophotometric assay for trans-cinnamic acid 4-hydroxylase activity[J]. Analytical Biochemistry, 1975, 68(2):554-561
- [24] KNOBLOCH K H, HAHNBROCK K. 4-coumarate: CoA ligase from cell suspension cultures of *Petroselinum hortense* Hoffm [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1977, 184:237-248
- [25] 许英一, 王宇, 杨伟光. 紫花苜蓿叶总黄酮提取及抗氧化性[J]. 草地学报, 2018, 26(3):757-763
- XU Y Y, WANG Y, YANG W G. Extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from alfalfa leaf[J]. Acta Agrestia Sinica, 2018, 26(3):757-763
- [26] 赵海明, 游永亮, 李源, 等. 紫花苜蓿资源抗旱性鉴定评价方法研究[J]. 草地学报, 2017, 25(6):1308-1316
- ZHAO H M, YOU Y L, LI Y, et al. Study on evaluation method of drought resistance of alfalfa resources [J]. Acta Agrestia Sinica, 2017, 25(6):1308-1316
- [27] 方明月, 汪溢馨, 赵奕, 等. 低温干旱复合胁迫对8个紫花苜蓿品种形态和生理特征的影响[J]. 草地学报, 2022, 30(11): 2967-2974
- FANG M Y, WANG Y P, ZHAO Y, et al. Morphological and physiological responses of eight alfalfa cultivars to combined stress of cold and drought [J]. Acta Agrestia Sinica, 2022, 30(11):2967-2974
- [28] 石欣隆, 薛娟, 杨月琴, 等. 2,4-表油菜素内酯对低温胁迫下花生幼苗生长及生理特性的影响[J]. 中国油料作物学报, 2023, 45(2):341-348
- SHI X L, XUE X, YANG Y Q, et al. Effects of 2,4-epibrassinolide on growth and physiological characteristics of peanut seedlings under low temperature stress[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2023, 45(2):341-348
- [29] 沈文远, 陈昕钰, 余徐润, 等. 根际温度胁迫对小麦根系形态及生理影响的研究进展[J]. 作物杂志, 2022(6):23-32
- SHEN W Y, CHEN X Y, YU X R, et al. Advance of effects of rhizosphere temperature stress on morphology and physiology of wheat root[J]. Crops, 2022(6):23-32

- [30] 张烁,李向东,靳海洋,等. 低温胁迫及灌水对不同抗低温小麦品种根系生长和活性的影响[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(10): 1315-1323
ZHANG S, LI X D, JIN H Y, et al. Impacts of low temperature stress and pre-stress irrigation on root traits of wheat varieties with different low temperature resistance[J]. Journal of Triticeae Crops, 2024, 44(10): 1315-1323
- [31] 王文静,麻冬梅,赵丽娟,等. 2,4-表油菜素内酯对盐胁迫下紫花苜蓿生理指标及根系离子积累的影响[J]. 草地学报, 2021, 29(6): 1363-1368
WANG W J, MA D M, ZHAO L J, et al. Effects of 2,4-table brassinolide on enzyme activity and root ion distribution and absorption in alfalfa seedlings[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(6): 1363-1368
- [32] 李明,颜嘉丽,石铭福,等. 外源2,4-表油菜素内酯对碱性盐胁迫下马铃薯根系生长、生理特性及土壤酶活性的影响[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(3): 394-402
LI M, XIE J L, SHI M F, et al. Effects of exogenous 2,4-epibrassinolide on root growth, physiological characteristics and soil enzyme activities of potato under alkaline salt stress[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2024, 40(3): 394-402
- [33] 毋翔,张义凯,张鹏,等. 2,4-表油菜素内酯对生炭基质育秧水稻秧苗根系生长及生理特性的影响[J]. 中国水稻科学, 2024, 38(6): 685-694
WU X, ZHANG Y K, ZHANG P, et al. Effects of 2,4-epibrassinolide on root growth and physiological characteristics of rice seedlings raised in biochar substrate[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2024, 38(6): 685-694
- [34] 周伟江,吴旺斌,唐才宝,等. 外源油菜素内酯对低温胁迫下水稻幼苗生长及生理特性的影响[J]. 西北农业学报, 2020, 29(9): 1410-1416
ZHOU W J, WU W P, TANG C B, et al. Effect of exogenous 2,4-epibrassinolide on germination and physiological characteristics of rice seedlings under chilling stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2020, 29(9): 1410-1416
- [35] 黄奇娜,江苏,汪利民,等. 低温胁迫后水分对水稻幼苗根系活力和水孔蛋白相关基因表达的影响[J]. 中国水稻科学, 2022, 36(4): 367-376
HUANG Q N, JIANG S, WANG L M, et al. Effects of moisture content on root vigor and the expression of aquaporin-related genes in rice seedlings under low temperature stress[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2022, 36(4): 367-376
- [36] 黄斌,李文科,李梦露,等. 24-表油菜素内酯对低温下黄瓜种子萌发和幼苗低温抗性的影响[J]. 中国蔬菜, 2021(12): 59-66
HUANG B, LI W K, LI M L, et al. Effects of 24-epibrassinolide on seed germination under low temperature and cold stress tolerance of cucumber seedling[J]. China Vegetables, 2021(12): 59-66
- [37] 廖高雨,金正强,郭兰萍,等. 油菜素内酯提高三七抗镉胁迫能力的生理生化机制研究[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1483-1490
LIAO G Y, JIN Z Q, GUO L P, et al. Physiological and biochemical mechanisms of brassinosteroid in improving anti-cadmium stress ability of *Panax notoginseng*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(6): 1483-1490
- [38] 刘良松,杨宏艳,赵冬,等. 油菜素内酯预处理对低温胁迫下华山松幼苗生理特性的影响[J]. 西部林业科学, 2020, 49(2): 99-105
LIU L S, YANG H Y, ZHAO D, et al. Effects of brassinolide pretreatment on physiological characteristics of *Pinus armandii* seedlings under low temperature stress[J]. Journal of West China Forestry Science, 2020, 49(2): 99-105
- [39] RABEH K, HNINI M, OUBOHSSAINE M. A comprehensive review of transcription factor-mediated regulation of secondary metabolites in plants under environmental stress[J]. Stress Biology, 2025, 5(1): 15
- [40] 赵莹,杨欣宇,赵晓丹,等. 植物类黄酮化合物生物合成调控研究进展[J]. 食品工业科技, 2021, 42(21): 454-463
ZHAO Y, YANG X Y, ZHAO X D, et al. Research progress on regulation of plant flavonoids biosynthesis[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(21): 454-463
- [41] 李丹丹,梁宗锁,普布卓玛,等. 干旱胁迫对紫花苜蓿黄酮类化合物含量及其合成途径关键酶活性的影响[J]. 西北植物学报, 2020, 40(8): 1380-1388
LI D D, LIANG Z S, PUBUZHUOMA, et al. Flavonoids contents and flavonoids synthetic key enzyme activities in alfalfa under drought stress[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2020, 40(8): 1380-1388
- [42] 周平,林志楷,郭瑞,等. 低温处理对桃树叶片基因表达及类黄酮合成代谢的影响[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7): 1283-1294
ZHOU P, LIN Z K, GUO R, et al. Effects of low temperature treatment on gene expression and flavonoids biosynthesis metabolism in peach (*Prunus persica*) leaves[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(7): 1283-1294
- [43] 梁泰帅,赵肖琼,高建平. EBR对PEG胁迫下蒙古黄芪种子萌发、幼苗生长和类黄酮合成关键酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(17): 139-145
LIANG T S, ZHAO X Q, GAO J P. Effect of ebr on seed germination, seedling growth and key enzyme activities for flavonoid biosynthesis in *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* under peg-induced drought stress[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(17): 139-145
- [44] 肖晓燕,朱成磊,杨克彬,等. 低温促进毛竹叶片类黄酮合成及相关基因的表达模式分析[J]. 热带亚热带植物学报, 2024, 32(1): 101-110
XIAO X Y, ZHU C L, YANG K B, et al. Low temperature promotes flavonoid synthesis and expression pattern analysis of the related genes in leaves of *Phyllostachys edulis*[J]. Journal of Tropical and Subtropical Botany, 2024, 32(1): 101-110
- [45] 陈奕可,代星苗,田义,等. 低温胁迫下外源油菜素内酯对核桃抗寒性的影响[J]. 北方园艺, 2025(6): 72-87
CHEN Y K, DAI X M, TIAN Y, et al. Effects of exogenous brassinolide on cold resistance of walnut under low-temperature stress[J]. Northern Horticulture, 2025(6): 72-81

(责任编辑 刘婷婷)