

尹舒雅,钱丽华. 基于主成分分析法的 20 份三叶青种质耐寒性综合评价[J]. 江苏农业科学,2025,53(7):148-159.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.07.019

基于主成分分析法的 20 份三叶青种质耐寒性综合评价

尹舒雅, 钱丽华

(杭州市农业科学研究院,浙江杭州 310024)

摘要:为应对极端气候对三叶青山区林下仿野生栽培的冻害问题,筛选耐寒性好的种质以适应山区低温,选取 20 份三叶青种质为材料,检测这些种质在自然低温下的存活率及恢复生长率、-4℃人工低温处理 12 h 后的存活率及恢复生长率、不同低温(-3、-4、-5、-6℃)处理 12 h 后的叶片电解质渗透率及半致死率、-2℃人工低温处理不同时间(0、12、24 h)的超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、脯氨酸含量、丙二醛(MDA)含量、可溶性蛋白含量以及可溶性糖含量。根据上述指标相关性及不同种质间的变异系数,选取人工低温恢复生长率、12 h 低温处理半致死温度、-2℃人工低温处理 24 h 的 MDA 含量、-2℃人工低温处理 12 h 的 POD 活性、脯氨酸含量、可溶性蛋白含量、可溶性糖含量共 7 个指标,采用主成分分析和聚类分析进行综合评价,建立三叶青耐寒指数预测公式:耐寒指数(D)= $0.008 \times \text{人工低温恢复率} - 0.213 \times \text{LT}_{50} + 0.001 \times \text{POD 活性} + 0.005 \times \text{MDA 含量} + 0.004 \times \text{脯氨酸含量} + 0.044 \times \text{可溶性糖含量} + 0.008 \times \text{可溶性蛋白含量} - 2.308$ 。结果表明,T01、T02、T03、T04、T17、T24 种质的耐寒性最强,这与自然低温下的耐寒表现基本一致,说明该预测方法可靠,可进一步应用于其他三叶青种质及人工选育品种的耐寒性评价。

关键词:三叶青;耐寒性;主成分分析;耐寒因子

中图分类号:S567.903.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)07-0148-12

三叶青(*Tetradlea hemsleyana* Diels et Gilg)是我国特有的珍稀药用植物,主要以块根入药,用于治疗小儿高热、扁桃体炎、支气管炎、肺炎、咽喉炎、肝炎及病毒性脑膜炎等疾患,因其具有清热解毒、活血祛风、消炎止痛等功效,也被称为安全无毒的“植物青霉素”^[1]。现代医学研究表明,三叶青提取物具有较强抗炎、镇痛、抗高热及抗病毒作用,可用于治疗小儿高热、扁桃体炎、肝炎及病毒性脑膜炎等多种疾病^[2-4]。引起更多研究者关注的是,三叶青提取物对肿瘤细胞具有一定的抑制作用^[5]。经过十多年的发展,三叶青于 2018 年被列入浙江省新“浙八味”中药材培育品种名单,并作为新冠肺炎 1 号方(化湿宣肺合剂)配方的君药,在新冠治疗中发挥了良好的作用^[6]。

由于三叶青的药用效果良好,对其需求量不断

增加,其野生资源被过度采挖,已成为濒危药用植物;2011 年浙江三叶青栽培品种被列入“浙江省首批农作物种质资源保护名录”^[7]。为满足日益增长的市场需求,浙江、江西、福建等地区已有一定规模的人工种植三叶青。为保证药材质量并因地制宜利用浙江“七山一水二分田”的地理条件,仿野生栽培或林下栽培等栽培模式成为浙江省中药材当前的主要栽培方式,也是促进“两山”转化的有效途径。随着全球变暖,极端天气时常出现,林下仿野生栽培对中药材的耐寒性提出了更高的要求。三叶青在我国浙江、江西、广西、福建、台湾、湖北、广东、四川、贵州、云南等省份均有分布,主要生长于山坡灌丛、山谷、溪边林下岩石缝中^[1]。地理环境选择形成的不同三叶青生态型在药效和抗逆性等方面都存在差异,因此,三叶青良种选育显得尤为重要和紧迫。

植物抗寒性评价的方法很多,主要有田间自然鉴定、实验室鉴定、人工模拟逆境鉴定等。田间自然低温鉴定可靠、有效,但受限于周期长、自然温度不可控以及重复性差等缺点;而人工模拟逆境鉴定则因可人工控温、不受环境条件影响、可周年试验等优点而得到了广泛的应用。利用上述 2 种方式综

收稿日期:2024-03-29

基金项目:浙江省基础公益研究计划(编号:LGN21C130002)。

作者简介:尹舒雅(1990—),女,浙江杭州人,博士,副研究员,主要从事中药材植物遗传资源开发利用及栽培育种研究。E-mail:yin_shuya@126.com。

通信作者:钱丽华,硕士,高级农艺师,主要从事中药材植物遗传资源开发利用及栽培育种研究。E-mail:358843884@qq.com。

合分析,则更能准确评价植物的抗寒能力。人工模拟逆境鉴定研究更多地集中在形态指标和生理生化指标的筛选上,如叶片孔隙率、电解质渗透率、游离脯氨酸含量、可溶性总糖含量、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、可溶性蛋白含量、 F_v/F_m 、总含水量、束缚水含量/自由水含量、过氧化物酶(POD)活性、海绵组织厚度和栅海比等,都与植物的抗寒/耐寒性具有良好的相关性,可作为植物抗寒/耐寒性的鉴定指标^[8-18],但不同作物的耐寒性/抗寒性评价指标不尽相同。目前有关三叶青种质资源耐寒性的评价研究尚不多见。

本研究通过对三叶青幼苗进行人工低温胁迫、田间自然低温鉴定以及低温胁迫前后叶片各生理生化指标的测定,利用主成分分析方法建立三叶青苗期耐寒性评价方法,旨在为三叶青种质资源的耐寒性评价提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料的培养

试验地点位于浙江省杭州市农业科学研究所苗圃(120.08°E,30.06°N)。从收集的三叶青种质母苗上剪取枝条,挑选老嫩适中的茎段以供扦插。剪下带 1 个芽的茎段,种植在泥炭中,培植于适宜温度条件下(25~28℃,光照度 3 000~3 500 lx,光—暗周期 12 h—12 h),经过 2 个月左右的生长,选择萌发达到 5~6 个节的扦插苗以供后续试验。

1.2 人工低温耐寒性测定

用于人工低温耐寒性测定的苗于 2022 年 3—4 月扦插,耐寒测定于 2022 年 5—10 月陆续进行。每 30 株扦插苗为 1 个生物学重复,每份三叶青种质作 3 个生物学重复处理,于人工低温培养箱中 -4℃ 冷冻处理 12 h 后,移至(25±2)℃培养室中进行恢复生长,培养 7 d 后统计存活率,培养 30 d 后统计恢复生长率。

存活率 = 存活苗数/处理苗数 × 100% ;

恢复生长率 = 恢复生长苗数/处理苗数 × 100% 。

1.3 自然低温耐寒性测定

用于自然低温耐寒性测定的苗于 2023 年 9 月扦插,耐寒测定于 2023 年 12 月进行,测定期间具体天气条件见图 1。选取萌发达到 5~6 个节的扦插苗 60 株,于冬季放置于杭州市农业科学研究所苗圃区域室外地面,待寒潮过后移至大棚温室内,适宜

温度条件下(25~28℃,光照度 3 000~3 500 lx,光—暗周期 12 h—12 h)培养 7 d 后统计存活率,培养 30 d 后统计恢复生长率。计算方法同“1.2”节。

1.4 电解质渗透率测定

用于电解质渗透率测定的苗于 2023 年 9 月扦插,电解质渗透率测定于 2023 年 10 月进行。选择 6 份耐寒性差异较大的三叶青种质用于电解质渗透率试验中低温处理时间的筛选。将处理温度设置为 -4℃,处理时长为 0、3、6、9、12、15 h,测定电解质渗透率,筛选适宜的处理时间。对参试的 20 份三叶青种质选取萌发达到 5~6 个节的扦插苗,取幼苗第 4~5 节完全展开的功能叶片 2.5 g,清洗后吸干水分,保存于塑料自封袋中,放入低温培养箱中进行低温处理,处理温度设置为 -2、-3、-4、-5、-6℃,处理时间设置为 12 h,分别测定各处理条件下各三叶青种质叶片组织的电解质渗透率。每个处理设 6 个生物学重复。

将处理后样品剪成 0.5 cm² 左右的小碎片,称量后置于 50 mL 离心管中,每 0.1 g 加水 10 mL,于 200 r/min 的摇床中振荡 2 h,充分静置后测定 EC1,之后在沸水中煮 30 min,自然冷却后摇床振荡 2 h,充分静止后测定 EC2,根据 Logistic 回归方程拟合结果得到半致死时间(LTi₅₀)及半致死温度(LT₅₀)。

1.5 酶活性及代谢产物检测

用于酶活性及代谢产物检测的苗于 2023 年 9 月扦插,酶活性及代谢产物含量测定于 2023 年 11 月至 2024 年 1 月进行。选取萌发达到 5~6 个节的扦插苗,取幼苗第 4~5 节完全展开的功能叶片 5 g 左右,清洗吸干后,保存于塑料自封袋中置于低温培养箱中低温处理,将处理温度设置为 -2℃,分别处理 0、12、24 h。

处理后取 2.5 g 左右叶片组织,每 0.1 g 组织加 1 mL PBS(0.01 mol/L, pH 值为 7.2~7.4)研磨(10%匀浆),4 000 r/min 离心 10 min,取上清液检测 SOD 活性、POD 活性、可溶性蛋白含量、脯氨酸含量及 MDA 含量。

取 2 g 左右叶片组织,每 0.1 g 组织加 1 mL 蒸馏水,研磨制成 10% 的组织匀浆,沸水浴 10 min,冷却后 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液用蒸馏水 10 倍稀释制成 1% 提取液,检测可溶性糖含量。

检测所用试剂盒购自南京建成生物工程研究所(<http://www.njjcbio.com/>),分别为总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒(羟胺法)(A001-1)、过

氧化物酶(POD)测试盒(没食子酸法)(A084-3)、总蛋白定量测定试剂盒(BCA法)(A045-3)、脯氨酸测定试剂盒(酸性茚三酮法)(A107-1)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法)(A003-1)、植物可溶性糖含量测试盒(蒽酮比色法)(A145-1)。按照相应的操作说明书进行检测。

1.6 数据分析

用 SPSS 22 软件对所测数据进行统计分析。显著性比较采用 Duncan’s 检验法,相关性分析采用双变量法,按照皮尔逊(Pearson)系数检验相关性。主成分分析采用降维-因子分析法,聚类分析采用系统聚类-余弦法。

2 研究结果

2.1 三叶青种质的人工低温耐寒性鉴定

在前期人工低温试验结果的基础上,将扦插小苗进行-4℃人工低温处理12h,由表1可知,20份三叶青种质的存活率和恢复生长率存在较大差异。T24种质的恢复生长率和存活率最高,达到80%以上;其次为种质T01,其恢复生长率和存活率都超过70%;T30种质的存活率超过70%,恢复生长率达到

64.44%。初步认为这3份种质耐寒性较强。T15、T21种质的恢复生长率和存活率都低于10%,T10种质的恢复生长率和存活率在10%左右,T23的恢复生长率低于10%,均为冷敏感种质。其余种质的存活率和恢复生长率在20%~70%之间。

2.2 三叶青种质的自然低温耐寒性鉴定

为尽可能使筛选结果接近实际生产应用,在2023年冬季寒潮来临期间,统计20份三叶青种质在自然低温下的存活率。三叶青实验苗自12月15日放置于露天田块,12月20—24日经历低温寒潮。寒潮期间,气温最低达-7.9℃,平均日最低温为-6.4℃;土壤温度最低达-6.6℃,平均日最低温为-5.0℃(图1)。

由表2可知,从存活率来看,T04种质的存活率达63.330%,其次为T02、T03、T26种质,存活率分别达到了53.330%、48.330%、51.670%,T01、T24、T17种质的存活率在30%~40%之间,有7份种质的存活率低于5%,包含3个大叶种质。从恢复生长率来看,T02、T26种质达到30%及以上,T01、T03、T17、T24种质在20%~30%之间,T04种质接近20%。从2023年极低温度下的结果综合分析,

表1 24份三叶青种质人工低温下的存活率和恢复生长率

种质	恢复生长数/存活数			平均恢复 生长率(%)	平均存活率 (%)
	R1	R2	R3		
T01	21/22	23/25	20/20	71.111±5.092b	74.444±8.389b
T02	15/15	17/17	12/12	48.889±8.389de	48.889±8.389def
T03	18/23	18/21	16/16	57.778±3.849cd	66.667±12.019bc
T04	15/15	13/13	12/13	44.444±5.092ef	45.556±3.849efg
T08	12/16	8/10	9/11	32.222±6.939gh	41.111±10.715fgh
T10	3/4	2/3	4/4	10.000±3.333i	12.222±1.925j
T12	16/16	17/17	14/14	52.222±5.092de	52.222±5.092def
T15	2/3	0/0	0/0	2.222±3.849i	3.333±5.774j
T16	9/9	8/9	11/11	31.111±5.092gh	32.222±3.849hi
T17	11/15	18/19	18/19	52.222±13.472de	58.889±7.698cd
T19	14/14	13/13	12/12	43.333±3.333ef	43.333±3.333efghi
T20	7/9	7/8	8/8	24.444±1.925h	27.778±1.925j
T21	1/1	0/0	0/0	1.111±1.925i	1.111±1.925l
T22	7/11	8/12	7/9	24.444±1.925h	35.556±5.092hij
T23	1/2	3/5	1/2	5.556±3.849i	10.000±5.774kl
T24	26/27	25/25	23/27	82.222±5.092a	87.778±3.849a
T25	11/12	11/12	11/12	36.667±0.000fg	40.000±0.000ghi
T26	15/18	11/15	18/19	48.889±11.706de	57.778±6.939cd
T29	15/15	17/19	15/15	52.222±3.849de	54.444±7.698de
T30	18/21	22/22	18/22	64.444±7.698bc	72.222±1.925b

注:R1、R2、R3 分别表示 3 个生物学重复。同列数据后不同小写字母表示处理间差异显著(P<0.05)。表3至表5同。

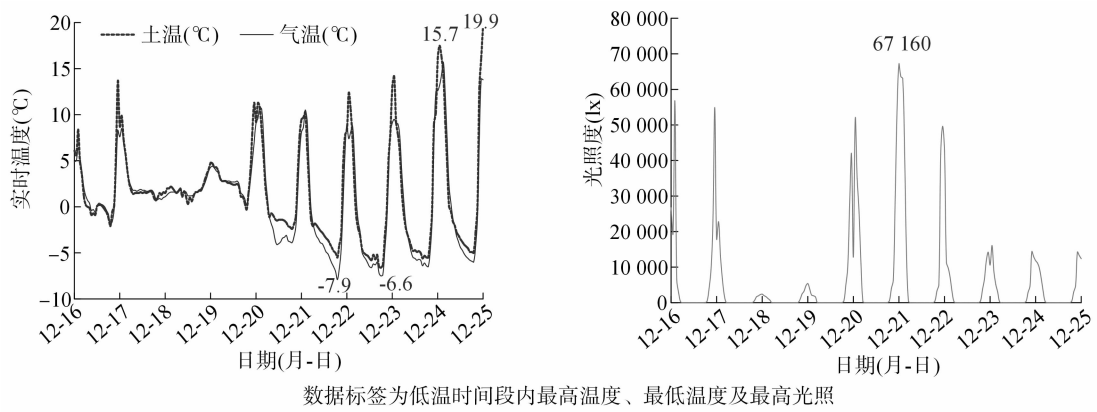


图1 自然低温期光温条件记录

表 2 20 个三叶青种质在自然低温条件下的存活和恢复生长情况

种质	恢复生长率(%)	存活率(%)	种质	恢复生长率(%)	存活率(%)
T01	23.330	36.670	T19	0.000	16.670
T02	38.333	53.330	T20	3.333	3.333
T03	21.667	48.330	T21	1.667	1.667
T04	18.333	63.330	T22	0.000	0.000
T08	0.000	0.000	T23	1.667	1.667
T10	3.333	6.670	T24	23.330	35.000
T12	1.667	18.330	T25	3.333	18.333
T15	0.000	0.000	T26	30.000	51.670
T16	0.000	3.330	T29	1.667	6.670
T17	26.667	38.330	T30	8.333	28.330

T01、T02、T03、T17、T24、T26 属于耐寒性较强的种质,T04 属于耐寒性中等的种质,T15、T21、T23 种质无论是在人工低温还是自然低温下存活率都极低,属于冷敏感种质。自然低温与人工低温下结果基本趋势一致。

2.3 三叶青种质的电解质渗透率检测

通常认为胁迫条件下叶片膜结构受损程度与

植物组织的渗透率正相关,因此,根据植物组织浸出液电导率计算出的固定冷冻时间下的半致死温度与耐寒性负相关。固定冷冻温度下的半致死时间与耐寒性正相关。

由于-4℃人工低温能较好地区分不同三叶青种质的耐寒性,首先检测-4℃不同处理时间下T02、T03、T20、T22、T23、T24 共 6 份三叶青种质离体叶片的电解质渗透率。

由表 3 可知,-4℃条件下,T03、T24 种质的半致死时间超过 15 h,T23 种质的半致死时间只有 8.216 h,其余则在 11~14 h 之间,所有种质的平均半致死时间为 13.59 h。结合试验操作分析,检测这 6 份三叶青种质在不同低温下处理 12 h 时的电解质渗透率。冷冻处理 12 h 条件下,T24 种质的半致死温度接近-5℃,T23 种质的半致死温度为-2.737℃,T02 种质为-4.186℃,T03 种质为-4.396℃,T20 种质为-3.767℃,不同种质之间存在明显差异(表 4)。因此,进一步检测另外 14 份三叶青种质的电解质渗透率。

表 3 6 份三叶青种质-4℃不同处理时间下的电解质渗透率及半致死时间预测

种质	渗透率(%)					拟合方程	r^2	LT_{i50} (h)
	3 h	6 h	9 h	12 h	15 h			
T02	10.368±0.686b	10.504±0.613e	26.212±1.045d	50.528±1.421e	78.342±1.925b	$y=-0.302x+3.520$	0.939	11.671
T03	8.018±0.729c	14.881±1.059d	22.657±0.909e	23.086±1.156f	34.113±0.558f	$y=-0.137x+2.686$	0.934	19.634
T20	10.650±0.480b	15.907±0.985d	36.658±0.868b	68.869±0.692b	73.903±0.793c	$y=-0.293x+3.139$	0.960	10.708
T22	7.294±0.674cd	19.516±1.667b	29.897±1.091c	36.189±1.269d	54.191±0.874d	$y=-0.209x+2.923$	0.955	13.986
T23	15.611±0.772a	31.490±0.991a	61.242±1.221a	80.319±0.955a	85.787±1.552a	$y=-0.305x+2.507$	0.976	8.216
T24	6.861±0.358d	18.205±0.479c	20.978±1.599f	28.420±0.617e	39.010±2.078e	$y=-0.163x+2.832$	0.923	17.333

由表 4 可知,20 份三叶青种质中,随着处理温度的下降,电解质渗透率均呈上升趋势,且不同种质变化幅度存在一定的差异,T15、T20 种质在-4℃时电解质渗透率大幅上升,而 T03、T24 种质

-3℃至-4℃的变化极小。T24 种质的半致死温度为-4.974℃,T01 种质为-4.558℃,T25 种质为-4.520℃,T16 种质为-4.662℃,初步认为这 4 份种质耐寒性较强;T23 种质的半致死温度为-2.737℃,

表 4 20 份三叶青种质在不同低温下处理 12 h 时叶片的电解质渗透率及半致死温度

种质	渗透率(%)				拟合方程	r^2	LT ₅₀ (℃)
	-3℃	-4℃	-5℃	-6℃			
T01	8.382±0.709ij	29.528±1.512p	74.553±1.158j	86.354±2.009i	$y=1.465x+6.680$	0.976	-4.558
T02	10.676±0.491h	47.004±1.448k	83.392±1.202h	93.379±1.484de	$y=1.605x+6.717$	0.981	-4.186
T03	18.808±0.746d	19.775±1.018r	78.022±0.927i	89.663±0.976gh	$y=1.354x+5.950$	0.890	-4.396
T04	10.769±0.509h	81.292±1.043c	95.222±1.427c	98.455±0.430ab	$y=2.033x+7.524$	0.928	-3.701
T08	12.650±0.474fg	75.659±1.260d	75.806±1.038j	88.133±0.898hi	$y=1.182x+4.732$	0.779	-4.003
T10	12.593±0.432fg	52.062±1.737j	64.541±1.641lm	94.385±1.307cd	$y=1.479x+6.266$	0.954	-4.235
T12	12.599±0.549fg	32.119±1.612o	78.220±1.005i	92.770±0.407def	$y=1.549x+6.686$	0.989	-4.315
T15	24.472±0.703c	94.019±2.947b	97.193±0.787b	97.968±0.828ab	$y=1.580x+4.847$	0.781	-3.068
T16	12.681±0.788fg	35.407±1.731m	65.473±0.829l	76.889±0.597j	$y=1.064x+4.958$	0.972	-4.662
T17	7.540±0.466jk	34.463±1.753mn	44.610±0.716n	96.877±0.476ab	$y=1.825x+8.195$	0.898	-4.491
T19	18.647±0.775d	26.865±0.660q	91.100±1.579d	97.286±4.110ab	$y=1.848x+7.460$	0.926	-4.036
T20	18.178±0.934d	68.869±0.692e	85.066±1.265g	99.149±0.819a	$y=1.973x+7.432$	0.965	-3.767
T21	65.560±0.864a	97.776±3.097a	98.683±0.723a	98.938±0.907a	$y=1.220x+2.172$	0.756	-1.780
T22	14.160±0.242e	58.353±0.987i	90.496±1.023de	90.661±5.167fg	$y=1.414x+5.598$	0.888	-3.959
T23	62.732±2.090b	64.490±0.917f	95.935±1.431bc	96.093±1.387bc	$y=1.061x+2.904$	0.818	-2.737
T24	7.367±0.320k	8.462±0.416s	43.905±1.414n	89.186±1.209gh	$y=1.606x+7.989$	0.904	-4.974
T25	8.680±0.428i	33.214±0.372no	63.300±1.770m	91.538±0.588efg	$y=1.545x+6.983$	0.995	-4.520
T26	13.362±0.951ef	60.272±2.354h	87.784±0.566f	93.171±2.516de	$y=1.500x+5.968$	0.943	-3.978
T29	12.592±0.455fg	42.498±1.259l	73.067±1.149k	89.268±1.711gh	$y=1.347x+5.841$	0.993	-4.337
T30	11.820±0.312g	62.364±1.061g	89.673±0.844e	90.000±0.490gh	$y=1.428x+5.711$	0.867	-4.000

T21 种质为 -1.78℃,T15 种质为 -3.07℃,为冷敏感型种质;其余 13 份品种的半致死温度在 -4.5~-3.7℃之间。

2.4 三叶青种质的酶活性及代谢产物检测

为筛选出能有效区分三叶青种质耐寒性的生理指标,检测不同低温处理时间(CK 为 25℃,-2℃处理 12、24 h)下的三叶青叶片中 SOD、POD 活性和 MDA、脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白的含量,检测结果见表 5,可以看出,同一处理条件下,上述指标在大部分三叶青种质间具有显著差异。

SOD、POD 是植物体内重要的抗氧化酶,在植物遭遇低温逆境后,通过清理积累的活性氧化物缓解逆境的伤害,因此抗逆性种质通常具有较高的 SOD、POD 活性。从表 5 可以看出,冷胁迫处理后,T12、T16、T19、T20、T22、T23、T24 种质的 SOD 活性呈不断下降的趋势,T01、T15、T21 种质的 SOD 活性不断升高,T02、T17、T25、T26、T29 种质的 SOD 活性先降后升,其余种质的 SOD 活性先升后降,少数种质变化较小。而多数种质的 POD 活性总体呈上升趋势,说明三叶青遭受低温胁迫时,主要通过 POD 活性升高来清除活性氧化物。部分三叶青种质的 POD 活性随着处理时间进一步延长而下降,表明胁迫

受损可能已经超过其应对能力。T15、T21、T22、T23 种质在各低温处理时间点的 POD 活性均处于较低水平,显著低于其他种质,说明这 4 个种质种质对低温逆境的反应协调和抵御能力较差。

丙二醛含量是反映细胞膜伤害程度的重要指标之一,其积累与膜透性的增加呈显著正相关,从表 5 可以看出,随着低温处理时间的延长,大部分种质中 MDA 积累量相对于常温状态明显增加,部分呈先降再升的变化趋势,特别是冷冻处理 24 h 时,MDA 积累速度加快,说明三叶青通过提高 MDA 水平来应对低温胁迫。冷冻处理 12 h 时,大部分种质已经开始积累 MDA 来启动生理防御,而某些种质如 T01、T02、T03、T08、T17、T22、T24 则增加较慢,说明此时低温尚未对机体组织造成威胁;而当处理时间达到 24 h 时,MDA 开始明显增加,说明此时开始启动生理反应来应对低温胁迫,由此推测其耐寒性较好。而 T23 种质则随着处理时间延长,MDA 含量逐渐下降,当处理时间达到 24 h 时明显下降,说明此时膜系统已经丧失活力,由此可见其耐寒性较差。

脯氨酸、可溶性蛋白质、可溶性糖都可以作为细胞保护物质,增强细胞的持水力,减少细胞内结冰对膜结构的破坏,通常与耐寒性正相关。从表 5

表 5 20 份三叶青种质人工低温处理下相关酶活性及代谢成分含量变化

生理指标	种质	CK(25 ℃)	12 h(−2 ℃)	24 h(−2 ℃)	种质	CK(25 ℃)	12 h(−2 ℃)	24 h(−2 ℃)
SOD 活性 (U/g)	T01	684.440 ± 42.862hi	685.706 ± 16.356hi	688.626 ± 19.577d	T19	736.296 ± 18.782fg	730.476 ± 9.695fg	684.550 ± 11.003de
	T02	825.015 ± 14.263c	812.164 ± 21.636bcd	845.361 ± 17.173a	T20	877.431 ± 8.560b	843.834 ± 4.279b	679.508 ± 15.177de
	T03	811.970 ± 25.288cde	834.263 ± 9.894bc	800.482 ± 11.108b	T21	691.534 ± 73.146hi	791.746 ± 21.176d	799.259 ± 14.766b
	T04	692.034 ± 9.795hi	729.222 ± 17.076fg	675.776 ± 13.211def	T22	816.085 ± 11.640cd	801.270 ± 15.596cd	776.296 ± 3.393b
	T08	585.443 ± 20.148k	600.147 ± 16.621j	583.530 ± 9.603ij	T23	956.971 ± 6.950a	940.213 ± 70.673a	526.455 ± 3.993k
	T10	649.040 ± 10.911ij	679.882 ± 11.332hi	628.718 ± 10.753gh	T24	796.367 ± 21.814cde	780.010 ± 6.589de	468.664 ± 11.592l
	T12	768.941 ± 14.263ef	689.989 ± 26.128hi	652.996 ± 14.077efg	T25	631.746 ± 12.534j	560.952 ± 28.463k	563.386 ± 14.193j
	T15	777.037 ± 19.292def	799.153 ± 9.989cd	834.458 ± 3.754a	T26	622.328 ± 22.994jk	575.238 ± 28.509jk	608.254 ± 58.516hi
	T16	809.439 ± 12.021cde	749.860 ± 11.571ef	643.211 ± 43.122fg	T29	715.344 ± 56.995gh	656.296 ± 12.004i	673.651 ± 22.889def
	T17	747.831 ± 37.522fg	687.090 ± 3.872hi	743.175 ± 25.437c	T30	609.710 ± 11.251jk	708.812 ± 59.781gh	703.791 ± 16.967d
POD 活性 (U/g)	T01	246.672 ± 10.396ef	297.791 ± 3.920e	402.199 ± 25.044bc	T19	107.639 ± 3.324j	129.340 ± 4.527k	141.445 ± 2.360i
	T02	197.450 ± 9.107h	205.938 ± 15.144i	326.550 ± 8.956f	T20	112.799 ± 6.967j	71.277 ± 2.742l	144.049 ± 6.115i
	T03	320.650 ± 9.364b	237.751 ± 15.886g	389.419 ± 5.751c	T21	1.013 ± 0.482l	0.772 ± 0.788o	63.802 ± 5.680k
	T04	177.292 ± 11.442i	183.996 ± 3.074j	305.668 ± 14.963g	T22	56.391 ± 3.955k	55.523 ± 4.616m	84.651 ± 7.240j
	T08	235.774 ± 7.483fg	313.320 ± 12.560d	395.255 ± 8.218c	T23	48.032 ± 1.152k	25.222 ± 2.919n	50.540 ± 1.575k
	T10	302.083 ± 4.514c	337.577 ± 4.534c	417.921 ± 11.846b	T24	265.818 ± 9.359d	226.273 ± 9.930h	397.811 ± 4.967c
	T12	325.135 ± 8.975b	348.428 ± 8.891c	293.740 ± 4.635g	T25	447.820 ± 12.461a	392.554 ± 8.869b	514.998 ± 30.282a
	T15	59.285 ± 2.680k	32.954 ± 2.822n	46.457 ± 4.226k	T26	250.386 ± 6.554e	385.127 ± 7.532b	369.261 ± 16.774d
	T16	275.608 ± 2.545d	486.304 ± 9.359a	527.826 ± 9.687a	T29	226.755 ± 7.014g	286.362 ± 6.762f	254.533 ± 21.805h
	T17	243.891 ± 10.401ef	245.483 ± 5.319g	350.711 ± 2.507e	T30	203.173 ± 20.275h	346.017 ± 7.016c	309.076 ± 6.379fg
MDA 含量 (nmol/g)	T01	22.053 ± 1.293b	23.456 ± 0.707c	67.718 ± 2.115a	T19	10.054 ± 0.640hi	16.183 ± 0.780f	31.786 ± 1.573gh
	T02	13.896 ± 0.901e	16.744 ± 0.754f	52.007 ± 1.548c	T20	3.607 ± 0.943l	10.728 ± 1.281g	9.042 ± 0.519l
	T03	16.766 ± 0.585d	15.492 ± 1.044f	42.296 ± 2.477e	T21	12.622 ± 0.513ef	8.781 ± 0.859h	23.067 ± 0.307j
	T04	19.053 ± 1.633c	33.167 ± 2.134a	55.266 ± 1.143b	T22	11.133 ± 0.369gh	11.198 ± 0.470g	18.341 ± 0.369k
	T08	23.995 ± 0.764a	24.038 ± 1.398c	32.757 ± 0.893fgh	T23	2.541 ± 0.509l	2.437 ± 0.531i	1.268 ± 0.598n
	T10	25.269 ± 2.231a	9.752 ± 0.495gh	34.160 ± 0.811fg	T24	3.469 ± 0.949l	2.850 ± 1.501i	6.669 ± 0.660m
	T12	12.752 ± 0.667ef	26.952 ± 1.651b	28.635 ± 0.228i	T25	17.802 ± 1.571cd	20.952 ± 1.010d	31.376 ± 3.378h
	T15	6.795 ± 0.470k	11.371 ± 0.295g	26.542 ± 2.315i	T26	12.968 ± 0.650ef	32.779 ± 2.524a	44.993 ± 2.989d
	T16	11.651 ± 0.681fg	16.226 ± 0.706f	32.908 ± 0.352fgh	T29	7.551 ± 0.799jk	18.557 ± 1.522e	26.650 ± 0.838i
	T17	9.471 ± 0.790i	10.292 ± 0.254gh	22.873 ± 0.258j	T30	8.867 ± 0.620ij	19.140 ± 1.474e	35.088 ± 1.373f
脯氨酸含量 (μg/g)	T01	34.300 ± 0.844c	36.439 ± 0.729f	42.882 ± 1.701c	T19	18.709 ± 0.212j	27.980 ± 0.934j	22.939 ± 0.850i
	T02	35.099 ± 1.178bc	33.815 ± 0.563g	34.041 ± 1.515f	T20	19.102 ± 0.451j	47.388 ± 1.941c	32.721 ± 2.357fg
	T03	36.387 ± 1.987b	30.011 ± 2.260hi	25.981 ± 2.585h	T21	6.763 ± 0.673l	5.289 ± 0.385m	17.199 ± 1.788j
	T04	40.670 ± 0.131a	53.339 ± 0.495a	44.749 ± 1.020c	T22	28.054 ± 0.527f	29.268 ± 0.435ij	26.440 ± 0.274h
	T08	30.218 ± 0.311e	39.119 ± 0.760e	36.734 ± 0.733e	T23	12.583 ± 0.469k	16.948 ± 0.263l	15.511 ± 0.447j
	T10	30.611 ± 0.723e	35.234 ± 0.254fg	48.562 ± 1.655b	T24	27.666 ± 0.940f	51.200 ± 1.031b	31.229 ± 2.052g
	T12	24.365 ± 0.903g	31.349 ± 1.786h	27.021 ± 1.137h	T25	32.898 ± 1.243d	29.677 ± 0.498i	39.980 ± 1.176d
	T15	28.349 ± 0.280f	29.112 ± 0.645ij	27.932 ± 0.386h	T26	22.865 ± 0.203h	33.882 ± 0.614g	33.267 ± 0.691fg
	T16	22.004 ± 2.026hi	42.488 ± 0.259d	51.857 ± 1.555a	T29	19.299 ± 0.933j	26.406 ± 1.453k	28.054 ± 1.141h
	T17	36.297 ± 1.199b	39.143 ± 1.401e	43.412 ± 2.143c	T30	21.291 ± 0.535i	35.209 ± 0.934fg	34.152 ± 0.891f
可溶性蛋白 含量 (mg/g)	T01	27.686 ± 1.267de	26.128 ± 0.905c	29.593 ± 1.635b	T19	20.547 ± 0.918h	22.058 ± 1.788de	23.918 ± 0.752f
	T02	27.421 ± 0.867e	26.335 ± 2.597c	25.646 ± 0.848de	T20	25.965 ± 1.681f	23.909 ± 0.227d	18.249 ± 1.080i
	T03	35.693 ± 1.424b	37.336 ± 3.072a	24.995 ± 0.805ef	T21	19.877 ± 0.334hi	23.918 ± 1.056d	27.988 ± 1.126c
	T04	15.335 ± 0.369jk	23.795 ± 1.452d	15.420 ± 0.582k	T22	34.154 ± 0.766c	34.144 ± 0.801b	29.423 ± 0.448b
	T08	14.693 ± 0.756k	14.221 ± 0.219i	15.269 ± 0.296k	T23	37.275 ± 0.684a	34.847 ± 1.498b	34.046 ± 0.734a

表 5(续)

生理指标	种质	CK(25 ℃)	12 h(−2 ℃)	24 h(−2 ℃)	种质	CK(25 ℃)	12 h(−2 ℃)	24 h(−2 ℃)
可溶性糖含量 (mg/g)	T10	16.336 ± 1.301j	18.054 ± 0.591h	17.998 ± 0.309ij	T24	23.110 ± 0.686g	19.840 ± 0.300fgh	22.685 ± 0.741g
	T12	22.511 ± 0.899g	21.387 ± 0.991ef	16.855 ± 0.576j	T25	20.358 ± 0.505hi	18.951 ± 0.777gh	21.501 ± 1.000gh
	T15	28.904 ± 0.899d	33.842 ± 0.510b	26.638 ± 1.255d	T26	19.896 ± 0.418hi	19.990 ± 0.874fgh	20.660 ± 1.350h
	T16	32.888 ± 1.294c	24.060 ± 0.553d	18.574 ± 0.427i	T29	18.951 ± 0.534i	20.122 ± 0.732efg	21.038 ± 0.271h
	T17	22.558 ± 0.776g	20.698 ± 1.218efg	28.101 ± 0.976c	T30	16.515 ± 0.748j	23.446 ± 0.401d	20.424 ± 0.602h
	T01	9.764 ± 0.205f	13.249 ± 0.179e	14.192 ± 0.440b	T19	6.670 ± 0.238i	5.188 ± 0.154m	6.189 ± 0.609m
	T02	10.456 ± 0.207e	13.581 ± 0.366e	11.392 ± 0.102e	T20	3.686 ± 0.311k	3.405 ± 0.111n	2.881 ± 0.146o
	T03	12.673 ± 0.580d	15.531 ± 0.265d	12.014 ± 0.108d	T21	5.892 ± 0.103j	8.340 ± 0.109k	5.523 ± 0.057n
	T04	12.438 ± 0.353d	17.502 ± 0.352c	7.265 ± 0.135j	T22	14.270 ± 0.053ab	18.861 ± 0.199a	13.794 ± 0.117c
	T08	6.630 ± 0.180i	7.557 ± 0.188l	8.783 ± 0.329i	T23	12.652 ± 0.823d	11.182 ± 0.159g	12.099 ± 0.125d
	T10	7.421 ± 0.294h	7.880 ± 0.216l	7.466 ± 0.191j	T24	14.011 ± 0.740b	15.813 ± 0.535d	14.150 ± 0.206b
	T12	12.348 ± 0.223d	11.254 ± 0.230g	9.631 ± 0.280h	T25	12.302 ± 0.324d	11.826 ± 0.226f	10.394 ± 0.132f
	T15	5.973 ± 0.124j	10.670 ± 0.033h	6.889 ± 0.051k	T26	9.844 ± 0.271f	9.540 ± 0.173i	9.508 ± 0.338h
	T16	14.602 ± 0.255a	8.572 ± 0.239k	6.529 ± 0.097l	T29	8.803 ± 0.194g	9.533 ± 0.202i	10.015 ± 0.133g
	T17	13.453 ± 0.060c	17.949 ± 0.618b	16.219 ± 0.242a	T30	7.907 ± 0.236h	9.121 ± 0.148j	9.611 ± 0.090h

可以看出,大部分三叶青种质的可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸含量表现不尽相同,可能代表不同三叶青种质对低温的抗逆性差异。T01、T02、T17 种质的可溶性蛋白、可溶性糖、脯氨酸含量在 CK、低温 12 h、低温 24 h 均处于较高水平。

进一步对上述所有指标进行统计分析(表 6),可以看出,POD 活性、MDA 含量在不同种质间变异系数较大,SOD 活性变异系数较小,脯氨酸、可溶性

糖、可溶性蛋白含量的变异系数处于中等水平。综合考虑变异系数和指标值,20 份三叶青种质的 SOD 活性、POD 活性、脯氨酸含量、可溶性糖含量和可溶性蛋白含量在 −2 ℃ 低温处理 12 h 后体现了三叶青对冷胁迫的响应,同时表现出较强的调节能力,MDA 含量则在低温处理 24 h 时表现出最大差异。因此,选用上述指标作进一步分析。

表 6 20 份三叶青种质检测指标描述性分析

生理指标	低温处理	最小值	最大值	平均值	标准误	标准差	变异系数
SOD 活性(U/g)	CK	585.443	956.971	740.250	21.612	96.651	0.131
	12 h	560.952	940.213	732.816	21.421	95.798	0.131
	24 h	468.665	845.361	679.007	22.648	101.283	0.149
POD 活性(U/g)	CK	1.013	447.820	205.183	25.130	112.386	0.548
	12 h	0.772	486.304	230.400	31.290	139.931	0.607
	24 h	46.457	527.826	289.296	33.844	151.355	0.523
MDA 含量(nmol/g)	CK	2.541	25.269	12.616	1.474	6.591	0.522
	12 h	2.438	33.167	16.555	1.923	8.599	0.519
	24 h	1.268	67.718	31.172	3.637	16.266	0.522
脯氨酸含量(μg/g)	CK	6.763	40.670	26.376	1.935	8.656	0.328
	12 h	5.289	53.339	33.665	2.448	10.948	0.325
	24 h	15.511	51.858	33.233	2.203	9.852	0.296
可溶性糖含量(mg/g)	CK	3.686	14.602	10.090	0.737	3.296	0.327
	12 h	3.405	18.861	11.328	0.946	4.232	0.374
	24 h	2.881	16.219	9.727	0.761	3.401	0.350
可溶性蛋白含量(mg/g)	CK	14.693	37.275	24.034	1.551	6.937	0.289
	12 h	14.221	37.336	24.354	1.386	6.196	0.254
	24 h	15.269	34.046	22.951	1.173	5.247	0.229

2.5 主成分分析

为确认前期检测的生理指标能否用于进一步分析,对所有生理指标数据进行相关性分析。

由表 7 可知,人工低温恢复率与存活率相关性为 0.989,自然低温恢复率与存活率相关性达到 0.884,但 20 份三叶青种质在人工低温与自然低温条件下的相关性相对较低,自然低温恢复率与人工低温恢复率及存活率相关性约为 0.59,自然低温存活率与人工低温恢复率及存活率相关性为 0.65 左右,可能由于自然低温期间最低温度已经接近 $-8\text{ }^{\circ}\text{C}$,平均日最低温度低于 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ (图 1),较多种质的存活率及恢复率过低,难以较好地区分这部分种质的耐寒性。

人工低温下恢复率、存活率与半致死温度的相关性都在 -0.73 左右,与 POD 活性的相关性约为 0.48,与脯氨酸含量相关性接近 0.5,相关性都达到显著或极显著($P<0.01$)水平,与其他指标的相关性相对较低。自然低温恢复率、存活率则与 MDA 含量、可溶性糖含量的相关性较高,与 MDA 含量的相关性超过 0.48,与可溶性糖含量的相关性都在 0.5 左右,尤其是 MDA 含量与自然低温存活率相关性为 0.612,达到极显著水平,一定程度上可以反映三叶青自然低温下的抗寒性。考虑到恢复生长率表型较为明显,且与历年观察的三叶青种质耐寒性较为一致,选用人工低温恢复生长率代表人工低温耐寒性进行作进一步分析。

表 7 所有生理指标相关性分析

指标	相关系数										
	自然低温恢复率	自然低温存活率	人工低温恢复率	人工低温存活率	LT ₅₀	SOD 活性	POD 活性	MDA 含量	脯氨酸含量	可溶性糖含量	可溶性蛋白含量
自然低温恢复率	1.000										
自然低温存活率	0.884 **	1.000									
人工低温恢复率	0.592 **	0.646 **	1.000								
人工低温存活率	0.594 **	0.661 **	0.989 **	1.000							
LT ₅₀	-0.337	-0.355	-0.733 **	-0.735 **	1.000						
SOD 活性	-0.049	-0.149	-0.309	-0.305	0.417	1.000					
POD 活性	0.175	0.257	0.482 *	0.489 *	-0.708 **	-0.708 **	1.000				
MDA 含量	0.480 *	0.612 **	0.329	0.364	-0.259	-0.416	0.427	1.000			
脯氨酸含量	0.337	0.412	0.495 *	0.498 *	-0.657 **	-0.179	0.379	0.189	1.000		
可溶性糖含量	0.499 *	0.513 *	0.385	0.351	-0.249	0.107	-0.057	0.159	0.190	1.000	
可溶性蛋白含量	0.008	-0.014	-0.210	-0.241	0.322	0.755 **	-0.547 *	-0.087	-0.315	0.351	1.000

注: *、** 分别表示相关性达显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)水平。

用 SPSS 软件对人工低温恢复率、半致死温度、SOD 活性、POD 活性、MDA 含量、脯氨酸含量、可溶性糖含量、可溶性蛋白质含量这 8 个单项指标的抗冻系数进行主成分分析。

首先,依据 20 份三叶青种质的所有检测结果数据对三叶青种质进行聚类,然后根据该结果对 8 个生理指标进行聚类及相关性分析,结果可将 20 份三叶青种质分为 3 类(图 2-A)。因此,将聚类数设置为 3,对变量进行聚类(图 2-B),并根据图 2-A 中聚类结果对所有指标进行单因素方差分析。根据变量聚类结果发现,SOD 活性和可溶性蛋白含量相关性高且聚为一类,由于 SOD 活性在不同种质间变异系数较小,在之后的主成分分析中删除了该指标。LT₅₀单独为一类,其他 5 个指标聚为一类。此后以 7 个耐寒相关指标为因子,进行主成分分析。

主成分分析输出结果中,KMO(Kaiser - Meyer -

Olkin) 检验值 >0.5 ,且 Bartlett 球形度检验显著性 <0.5 ,表明分析所用指标具备作为因子分析的条件(表 8)。

通过分析提取出 4 个主成分(F1 ~ F4)(表 9),其中第 1 主成分特征值为 3.210,贡献率为 45.853%;第 2 主成分特征值为 1.489,贡献率为 21.270%;第 3 主成分特征值为 0.910,贡献率为 13.006%;第 4 主成分特征值为 0.513,贡献率为 7.325%;4 个主成分累加,可以解释 87.454%的总变异,因此选取这 4 个主成分进行后续分析。以 4 个主成分的方差贡献率为权重,20 份三叶青种质主成分分析的因子得分为自变量,进行耐寒综合分析,三叶青耐寒综合评价得分(D)计算公式为

$$D = 0.459FAC_1 + 0.213FAC_2 + 0.130FAC_3 + 0.073FAC_4。$$

式中: $FAC_1 \sim FAC_4$ 为 20 份种质在主成分 F1 ~ F4 中

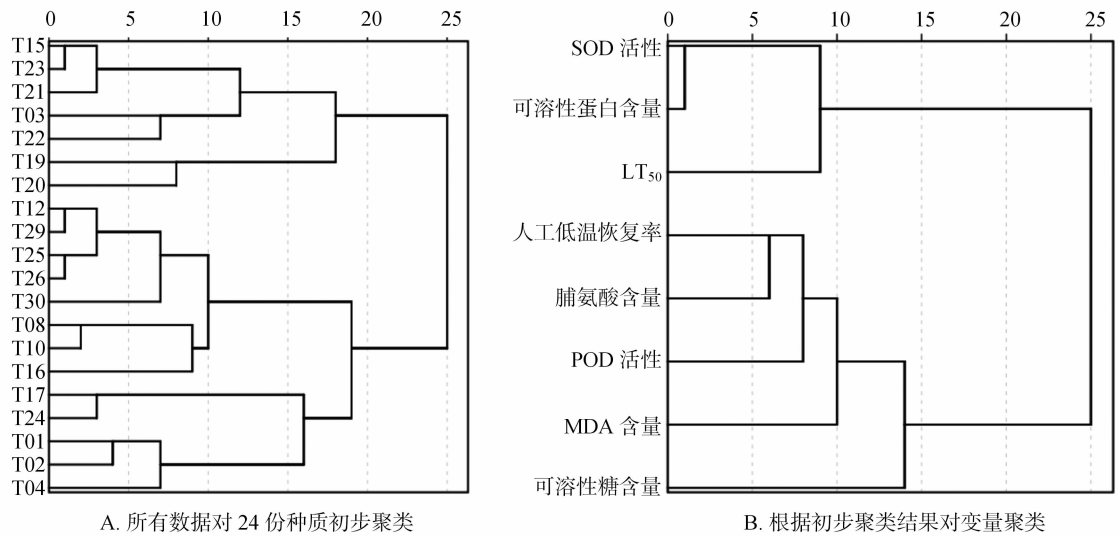


图2 生理指标聚类

表 8 KMO 与 Bartlett 球形度检验

检验类型		检验结果
KMO 检验		0.611
Bartlett 球形度检验	近似卡方	51.985
	自由度	21
	显著性(P 值)	0.000

的得分(表 10), D 亦即耐寒指数。

主成分矩阵及其得分矩阵见表 11,主成分因子得分根据因子得分系数矩阵及其所对应的主成分计算得出,公式如下:

$$F_1 = 0.383X_1 - 0.382X_2 + 0.361X_3 - 0.123X_4 - 0.092X_5 + 0.172X_6 - 0.151X_7;$$

表 9 主成分分析结果总方差解释

主成分	起始特征值			提取载荷平方和			旋转载荷平方和		
	总计	方差贡献率 (%)	累计贡献率 (%)	总计	方差贡献率 (%)	累计贡献率 (%)	总计	方差贡献率 (%)	累计贡献率 (%)
F1	3.210	45.853	45.853	3.210	45.853	45.853	2.887	41.245	41.245
F2	1.489	21.270	67.123	1.489	21.270	67.123	1.490	21.281	62.525
F3	0.910	13.006	80.129	0.910	13.006	80.129	0.980	14.007	76.532
F4	0.513	7.325	87.454	0.513	7.325	87.454	0.765	10.922	87.454
F5	0.405	5.793	93.247						
F6	0.362	5.177	98.424						
F7	0.110	1.576	100.000						

表 10 20 份三叶青种质主成分因子得分

种质	FAC_1	FAC_2	FAC_3	FAC_4	种质	FAC_1	FAC_2	FAC_3	FAC_4
T01	0.741	0.637	2.020	-0.109	T19	-0.317	-0.841	-0.004	-0.156
T02	0.087	0.612	1.193	0.068	T20	-1.032	-1.137	-1.103	2.209
T03	0.344	1.817	0.605	-0.714	T21	-2.192	-0.563	0.157	-1.626
T04	-0.264	0.832	1.574	2.255	T22	-0.511	1.969	-0.817	-0.034
T08	0.141	-1.527	0.103	0.516	T23	-1.640	0.745	-1.342	-0.867
T10	-0.106	-1.370	0.284	0.229	T24	1.555	0.687	-2.168	1.049
T12	0.801	-0.256	-0.347	-0.820	T25	0.837	-0.537	-0.198	-0.984
T15	-1.793	0.536	0.255	0.614	T26	0.483	-0.734	0.865	-0.436
T16	0.684	-0.819	0.163	0.194	T29	0.670	-0.487	-0.530	-1.112
T17	0.895	0.770	-0.913	0.133	T30	0.617	-0.335	0.202	-0.408

表 11 主成分矩阵、旋转后的主成分矩阵及得分矩阵

指标(标准化值)	主成分矩阵				主成分得分系数矩阵			
	1	2	3	4	1	2	3	4
人工低温恢复率(X_1)	0.815	0.269	-0.046	-0.207	0.254	0.180	-0.050	-0.404
LT ₅₀ (X_2)	-0.902	-0.088	0.203	0.145	-0.281	-0.059	0.223	0.283
POD 活性(X_3)	0.809	-0.322	0.213	-0.244	0.252	-0.216	0.234	-0.476
MDA 含量(X_4)	0.494	0.150	0.806	0.276	0.154	0.100	0.885	0.538
脯氨酸含量(X_5)	0.724	0.075	-0.399	0.547	0.226	0.051	-0.438	1.066
可溶性糖含量(X_6)	0.228	0.871	-0.066	-0.119	0.071	0.585	-0.072	-0.233
可溶性蛋白含量(X_7)	-0.507	0.720	0.091	0.016	-0.158	0.484	0.100	0.031

指标(标准化值)	旋转后的主成分矩阵				旋转后得分系数矩阵			
	1	2	3	4	1	2	3	4
人工低温恢复率(X_1)	0.847	0.226	0.093	0.067	0.383	0.199	-0.123	-0.247
LT ₅₀ (X_2)	-0.918	-0.041	0.020	-0.197	-0.382	-0.073	0.236	0.070
POD 活性(X_3)	0.804	-0.367	0.254	-0.127	0.361	-0.200	0.066	-0.466
MDA 含量(X_4)	0.293	0.050	0.951	0.019	-0.123	0.000	1.037	0.121
脯氨酸含量(X_5)	0.544	-0.013	0.025	0.832	-0.092	-0.046	0.070	1.169
可溶性糖含量(X_6)	0.292	0.861	0.029	0.052	0.172	0.599	-0.083	-0.104
可溶性蛋白含量(X_7)	-0.464	0.747	0.037	-0.096	-0.151	0.485	0.109	-0.019

注:提取方法为主成分分析法;旋转方法为 Kaiser 正态化的四次方最大值转轴法,在 5 次迭代后已收敛。

$F_2 = 0.199X_1 - 0.073X_2 - 0.200X_3 + 0.000X_4 - 0.046X_5 + 0.599X_6 + 0.485X_7$;
 $F_3 = -0.123X_1 + 0.236X_2 + 0.066X_3 + 1.037X_4 + 0.070X_5 - 0.083X_6 + 0.109X_7$;
 $F_4 = -0.247X_1 + 0.070X_2 - 0.466X_3 + 0.121X_4 + 1.169X_5 - 0.104X_6 - 0.0199X_7$ 。
式中: $X_1 \sim X_7$ 分别表示 7 个参与分析指标的标准化结果; $F_1 \sim F_4$ 表示各主成分得分。

将三叶青耐寒指数计算公式以各生理指标标准化结果表示:
 $D = 0.184X_1 - 0.155X_2 + 0.097X_3 + 0.087X_4 + 0.043X_5 + 0.188X_6 + 0.047X_7$ 。

根据计算结果将 20 份三叶青种质进行排序,其顺序与田间观察结果大致一致(表 12)。该公式可用于后续三叶青种质资源耐寒性评价。

表 12 20 份三叶青种质耐寒综合评价得分和聚类分析结果

种质	耐寒指数(D)	耐寒排序	聚类结果	种质	耐寒指数(D)	耐寒排序	聚类结果
T01	0.730	1	1	T19	-0.336	16	3
T02	0.330	6	1	T20	-0.697	18	3
T03	0.571	3	2	T21	-1.224	20	3
T04	0.426	5	1	T22	0.076	12	3
T08	-0.209	14	3	T23	-0.832	19	3
T10	-0.286	15	3	T24	0.654	2	1
T12	0.208	7	3	T25	0.172	10	2
T15	-0.630	17	2	T26	0.146	11	2
T16	0.175	9	3	T29	0.053	13	2
T17	0.465	4	1	T30	0.208	8	2

将计算结果与聚类分析对照,结果基本一致(图 3、表 12)。20 份三叶青种质可分为 3 类,第 1 类的 T01、T02、T03、T04、T17、T24 为耐寒种质,第 2 类的 T08、T10、T12、T16、T25、T26、T29、T30 中等耐

寒性种质,第 3 类的 T15、T19、T20、T21、T22、T23 为敏感型种质。
为便于应用,需要将上述公式计算耐寒综合评价的结果进行标准化,通过多元回归分析,将方程

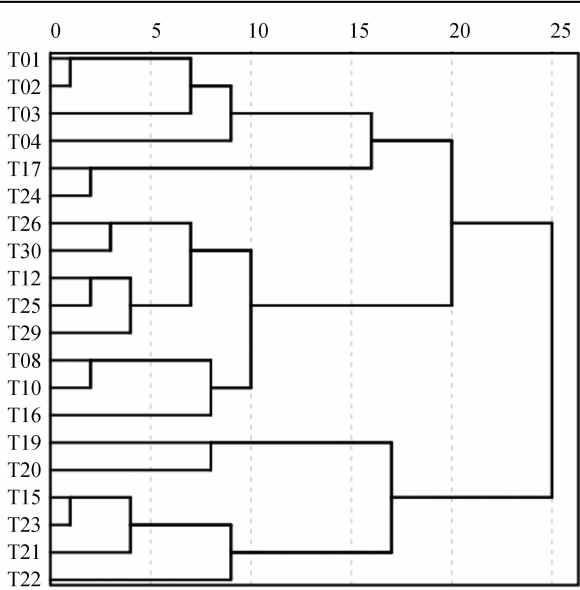


图3 根据筛选后的生理指标对 20 份三叶青种质聚类结果

中的自变量重新更换为上述 7 个生理指标检测结果。由共线性检验结果(表 13)可知,所有生理指标 $VIF < 10$,符合多元线性分析的假设。

根据表 13,分析所得耐寒指数计算公式为

$$D = 0.008 \times \text{人工低温恢复率} - 0.213 \times LT_{50} + 0.001 \times \text{POD 活性} + 0.005 \times \text{MDA 含量} + 0.004 \times \text{脯氨酸含量} + 0.044 \times \text{可溶性糖含量} + 0.008 \times \text{可溶性蛋白含量} - 2.308。$$

表 13 多元回归模型系数及共线性检验

指标	非标准化系数	显著性	共线性检验结果	
			允差	VIF
常数	-2.308	0.001		
人工低温恢复率	0.008	0.000	0.385	2.600
LT_{50}	-0.213	0.000	0.193	5.193
POD 活性	0.001	0.000	0.275	3.639
MDA 含量	0.005	0.000	0.675	1.482
脯氨酸含量	0.004	0.000	0.503	1.988
可溶性糖含量	0.044	0.000	0.643	1.555
可溶性蛋白含量	0.008	0.000	0.519	1.926

相关性分析结果(表 14)表明,7 个自变量可以解释耐寒因子变化的 99.999 8%,且达到极显著水平,表明模型可靠,可用于后续三叶青种质资源耐寒性评价。

表 14 模型相关性及显著性检验

模型拟合指标	数值	方差分析	平方和	df	平均值平方	F 值	显著性
r	1.000	回归	5.279	7	0.754	1 382 935.897	0.000
r^2	1.000	残差	0.000	12	0.000		
调整 r^2	0.999 98	总计	5.279	19			

3 讨论与结论

冬季低温冻害是农林业生产中的主要自然灾害之一,不但影响作物的品质与产量,严重时还可造成植株死亡^[19]。作为喜温植物,冬季的霜冻严重限制了三叶青的人工栽培,尤其是山区林下仿野生栽培。不同地理来源的三叶青具有巨大的遗传变异性,呈现不同的形态特征和环境适应性,从中筛选具有良好耐寒性的种质,对三叶青的栽培具有重要意义。

低温使植物组织的细胞膜受损而发生电解质外渗,电导率也随之增大^[20]。因此,早期常以相对电导率作为评价植物抗寒性的指标。然而越来越多的研究发现这种方法不够全面和准确,如本研究 T04、T16、T25、T29 等种质的半致死温度与自然低温存活率和恢复增长率存在较明显的不一致;近几年应用更多的是通过多项指标来进行综合分析^[21]。

植物全株或枝条在人工低温处理后的存活率

及芽萌发率是评价植物受害程度和存活率的最直观方法。由于三叶青分生组织分化能力强,生长速度快,易于扦插繁殖,本研究采用三叶青藤蔓中部茎段单节扦插扩繁的小苗为材料,人工冷冻处理后统计其存活率及芽萌发率。SOD、POD、CAT(过氧化氢酶)是最主要的过氧化物清理酶,MDA 是细胞膜脂过氧化的副产物,脯氨酸、可溶性糖、可溶性蛋白是与植物抗逆性密切相关的渗透调节物质,可以在逆境胁迫下避免其原生质受到脱水伤害^[19],这些指标通常能够反映植物的抗逆性,广泛应用于各种植物的抗逆性研究及品种选育中^[22-25]。本研究检测了 20 份三叶青种质低温处理 0、12、24 h 后上述 6 项生理指标的差异,发现所有指标在人工低温模拟冻害前后及冻害持续不同时间后存在明显变化,综合考虑变异系数和指标值,20 份三叶青种质的 SOD 活性、POD 活性、脯氨酸含量、可溶性糖含量和可溶性蛋白含量在 -2 ℃ 低温处理 12 h 后体现了三叶青

对冷胁迫的响应,同时表现出较强的调节能力,MDA 含量则在 24 h 时表现出最大差异。用上述指标作进一步分析,POD 活性、脯氨酸含量与人工低温下三叶青幼苗的存活率、恢复生长率显著正相关,MDA 含量、可溶性糖含量与自然低温下三叶青幼苗的存活率、恢复生长率显著正相关。

种质资源的综合评价方法主要有 4 类,包括专家打分评价法、运筹学及相关数学方法(如层次分析法、模糊综合评判法)、统计学和经济学相关的方法(如主成分分析法、TOPSIS 法和基于正态云模型的模糊综合评价的方法)、人工神经网络评价方法和灰色综合评价方法等新型评价方法。第 2 类分析方法结合了传统的分级评价,且使用的权重向量依赖主观经验;第 3 类方法则需要实测数据或生产实践确定一个理想的最优种质的各个指标值,再计算样本值与理想值间的关联度来评价种质的优劣^[26]。三叶青不同种质间差异巨大,研究开展较晚,且不同年度间表现变异较大,目前研究积累的数据不足以进行较为可靠的传统分级及确定最优种质;因此,本研究采用应用较为广泛的主成分分析法,该方法可以克服多个指标间的信息重叠,将各原始指标转换成少数彼此独立的综合评价指标,提高评价指标的可靠性^[27]。

从分析结果来看,前 4 个主成分累计贡献率为 87.454%,足以包含绝大部分参与分析的指标所包含的信息,根据综合评价结果 *D* 值,对 20 份三叶青种质的耐寒性进行评定和排序,结果基本与历年观察结果及当年冬季自然低温处理下耐寒表现一致,较为准确地筛选出在耐寒方面适合浙江地区山区林下栽培的三叶青生态型。由综合排序与聚类结果可知,T01、T02、T03、T04、T17、T24 种质耐寒性较强,适宜在容易遭受寒潮的地区栽培。该方法也可进一步应用于其他三叶青生态型及人工选育品种的耐寒性评价,以便生产应用中根据各地方栽培条件对种质资源进行选择,减少因气候变化带来的损失,更好地满足市场对三叶青的需求。

参考文献:

- [1] 李朝奎. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [2] 黄真, 毛庆秋, 魏佳平. 三叶青提取物抗炎、镇痛及解热作用的实验研究[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(7): 861–864.
- [3] 刘江亭. 三叶青抗病毒药效物质发现及作用机制研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2019: 93–96.
- [4] 刘培刚, 魏克民. 三叶青生物学、药理学及临床应用相关研究进展[J]. 中国中医药科技, 2018, 25(6): 927–933.
- [5] 林婧, 纪明珠, 黄泽豪, 等. 三叶青的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(8): 658–663.
- [6] 蔡婷婷, 徐云玲, 黄飞华, 等. 基于网络药理学与分子对接探究化湿宣肺合剂抗新型冠状病毒的潜在药效物质基础[J]. 浙江中医杂志, 2023, 58(5): 387–389.
- [7] 李者, 周昌和, 杜向标, 等. 三叶青研究和生产现状及发展对策[J]. 浙江林业科技, 2020, 40(6): 87–92.
- [8] 赖瑞联, 陈瑾, 冯新, 等. 中国橄榄种质资源评价与抗寒性研究进展[J]. 热带作物学报, 2017, 38(11): 2188–2194.
- [9] 寇彬, 王岩, 任晓燕. 枣树抗寒性检测方法的筛选[J]. 新疆农垦科技, 2016, 39(2): 43–45.
- [10] 齐延巧, 耿文娟, 周伟权, 等. 两种枸杞的抗寒性研究[J]. 新疆农业科学, 2016, 53(12): 2203–2209.
- [11] 马艳芝, 客绍英. 柴胡幼苗越冬抗寒性及其相关生理指标筛选[J]. 西北植物学报, 2014, 34(4): 786–791.
- [12] 姚雪. 甜瓜种质资源耐冷性的鉴定评价及其关联分析研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016.
- [13] 朱政. 茶树抗寒性生理指标的筛选及抗寒性鉴定方法的建立[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2011.
- [14] 李翠红, 张永茂, 冯毓琴, 等. 苹果矮化砧木抗寒性的评价与比较[J]. 西南农业学报, 2017, 30(5): 1183–1188.
- [15] 回彦哲, 袁小亚, 牛芳芳, 等. 连翘和美国金钟连翘的抗寒性分析[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36(2): 36–39.
- [16] 周桂英, 王四清, 陈卿然, 等. 8 种大花蕙兰抗寒性指标的筛选及评价[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2017, 46(1): 37–42.
- [17] 李玉梅, 陈艳秋, 李莉. 梨品种枝条膜透性和水分状态与抗寒性的关系[J]. 北方果树, 2005(1): 3–5.
- [18] 何海旺, 赵明, 武鹏, 等. 基于香蕉叶片解剖结构的抗寒性评价[J]. 西南农业学报, 2017, 30(1): 193–198.
- [19] 程琳琳, 安锋, 谢贵水, 等. 植物抗寒调节物质研究进展[J]. 热带农业科学, 2020, 40(5): 65–75.
- [20] 赵永强, 樊继德, 杨艳, 等. 电导率法结合 Logistic 方程鉴定大蒜品种资源的耐寒性[J]. 广西农学报, 2019, 34(3): 18–20, 32.
- [21] 牟开萍, 李维芳, 杨文新, 等. 20 个月季品种的抗寒性综合评价[J]. 草原与草坪, 2021, 41(6): 58–66.
- [22] 张赞培, 谷月营, 尚旭岚, 等. 自然低温下 23 个青钱柳家系耐寒性初步评价[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2024, 48(4): 86–92.
- [23] 王敏, 李莉, 贾蓉, 等. 10 种紫花苜蓿在低温胁迫下的生理特性及耐寒性评价[J]. 草业学报, 2024, 33(6): 76–88.
- [24] 迟明宏, 程哲, 杨志娟, 等. 50 份热带睡莲材料的耐寒性评价[J]. 植物资源与环境学报, 2023, 32(1): 39–49.
- [25] 郭琦, 毛可欣, 安森, 等. 4 种猕猴桃在山东越冬期生理响应及耐寒性评价[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(12): 141–148.
- [26] 焦劼. 黄精种质资源研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [27] 聂秀美, 赵桂琴, 柴继宽, 等. 黄土高原半干旱区引进燕麦种质的适应性评价[J]. 草原与草坪, 2019, 39(2): 25–31, 38.