

DOI: 10.11686/cyxb2025030

http://cyxb.magtech.com.cn

韩宜霖, 康文娟, 师尚礼, 等. 中华根瘤菌株 QL2 与不同紫花苜蓿品种共生效应的差异. 草业学报, 2025, 34(10): 132-150.

HAN Yi-lin, KANG Wen-juan, SHI Shang-li, *et al.* Studies of the difference in symbiotic interaction between *Sinorhizobium meliloti* strain QL2 and different alfalfa varieties. Acta Prataculturae Sinica, 2025, 34(10): 132-150.

中华根瘤菌株 QL2 与不同紫花苜蓿品种共生效应的差异

韩宜霖, 康文娟*, 师尚礼*, 杜媛媛, 何富强, 汪艳, 侯文璐, 谢西琳

(甘肃农业大学草业学院, 草业生态系统教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730070)

摘要:为明确中华根瘤菌株 QL2 共生不同紫花苜蓿品种的固氮效应差异特征, 提高紫花苜蓿的结瘤固氮能力和天然氮素利用效率。以中华根瘤菌 QL2 和 8 个紫花苜蓿 [3 个国外引进品种 (WL168HQ、WL298HQ 和 WL319HQ)、我国 3 个育成品种 (甘农 3 号、甘农 5 号和甘农 9 号) 及 2 个地方品种 (清水苜蓿和陇中苜蓿)] 为材料, 通过结瘤、固氮、饲草生物量和营养品质等指标, 研究接种 QL2 后在共生、固氮和促生效应等方面的差异特征。结果表明: 接种根瘤菌 QL2 后, 我国育成型紫花苜蓿品种的有效根瘤单颗重、根瘤直径以及根瘤组织被侵染细胞数目均显著优于地方品种和国外引进品种 70% 以上。固氮效应方面, 国外引进品种固氮率 (52.62%~63.49%) 和我国育成品种的固氮率 (53.30%~62.41%), 均显著高于地方品种 (43.05%~46.72%)。层次分割分析表明结瘤因子 (根瘤组织被侵染细胞数目、单株有效根瘤数、单颗有效根瘤重和根瘤直径) 和固氮因子 (固氮酶活性、固氮率和固氮量) 对地上干重具有 63% 的解释率, 其中固氮因子的贡献率达 89.56%, 结瘤因子的贡献率仅占 13.55%。相关性分析表明接种根瘤菌 QL2 后, 不同类型品种固氮率均与地上干重显著正相关, 即国外引进品种整体的地上干重增长率最大, 最高达 48.08%, 其次为我国育成型和地方型品种。固氮率也与饲草营养品质的产量显著正相关, 接种根瘤菌可普遍提高紫花苜蓿粗蛋白产量, 最高增长率达 51.08% ($P < 0.05$), 降低中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维产量, 最高分别降低 40.55% 和 53.96%, 可使饲草等级跃升 1~2 个等级。因此, 固氮率对地上干重和饲草营养品质均会产生显著的积极影响, 说明其在紫花苜蓿的产量提升和营养品质改善方面发挥着更为关键的作用, 本研究结果为精准调控豆科植物-根瘤菌组合的固氮效应以及优化紫花苜蓿饲草品质提供了重要依据。

关键词:紫花苜蓿; 根瘤菌; 固氮率; 苜蓿品种效应; 饲草品质

Studies of the difference in symbiotic interaction between *Sinorhizobium meliloti* strain QL2 and different alfalfa varieties

HAN Yi-lin, KANG Wen-juan*, SHI Shang-li*, DU Yuan-yuan, HE Fu-qiang, WANG Yan, HOU Wen-lu, XIE Xi-lin

Pratacultural College, Gansu Agricultural University, Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Lanzhou 730070, China

Abstract: Inoculum of *Sinorhizobium meliloti* strain QL2 was applied to plants of eight alfalfa varieties (three imported varieties: WL168HQ, WL298HQ, and WL319HQ; three domestically bred varieties: Gannong No. 3, Gannong No. 5, and Gannong No. 9; and two local varieties: Qingshui and Longzhong) to clarify the differences in

收稿日期: 2025-02-01; 改回日期: 2025-02-20

基金项目: 中国农业大学对口支援科研联合基金 (项目编号: GSAU-DKZY-2024-002) 资助。

作者简介: 韩宜霖 (2000—), 女, 甘肃张掖人, 在读硕士。E-mail: hanyi@st.gsau.edu.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: kangwj@gsau.edu.cn; shishangli@gsau.edu.cn

nitrogen fixation effects, with a view to improving the nodule formation and nitrogen fixation capacity of alfalfa and the efficiency of natural nitrogen utilization. Indicators such as nodule formation, nitrogen fixation, forage biomass, and nutritional quality were evaluated to study the differences in symbiosis, nitrogen fixation, and growth-promoting effects after inoculation with *S. meliloti* QL2. Results demonstrated that in domestically bred varieties, inoculating with *S. meliloti* QL2 significantly increased the weight of individual root nodules, as well as the root nodule diameter and the number of infected cells in the root nodules of by over 70% compared to both local and imported varieties. Regarding nitrogen fixation efficiency, the imported varieties (52.62% to 63.49%) and domestically bred varieties (53.30% to 62.41%) exhibited significantly higher fixation rates compared to local varieties (43.05% to 46.72%). Hierarchical segmentation analysis showed that nodulation factors (the number of infected cells in the root nodules, the number of effective root nodules per plant, the single effective root nodule weight and root nodule diameter) and nitrogen fixation factors (nitrogenase activity, nitrogen fixation percentage and nitrogen fixation amount) explained 63% of the variation in the above-ground dry weight. Of the explained variation, 89.56% was contributed by nitrogen fixation factors, and only 13.55% by nodulation factors. A correlation analysis revealed that after inoculation with *S. meliloti* QL2, the nitrogen fixation percentage of different categories of variety was significantly positively correlated with above-ground dry weight. That is, the growth rate (as reflected by above-ground dry weight) of imported varieties was the largest compared with CK, of which WL319HQ-QL2 had the highest growth rate of 48.08%, followed by domestic bred varieties and local varieties. The nitrogen fixation percentage was also significantly positively correlated with the forage nutritional quality. Inoculation with rhizobia generally increased the crude protein yield of alfalfa with the highest increase being 51.08% ($P < 0.05$), while reducing the yields of neutral detergent fiber and acid detergent fiber by 40.55% and 53.96%, respectively. These changes in nutritional composition resulted in an elevation of the forage quality score by 1 to 2 grades. In summary, a high nitrogen fixation rate has a significant positive impact on both above-ground dry weight and forage nutritional quality, meaning that it plays the critical role in improving the yield and nutritional quality of alfalfa. This study lays a foundation for development of materials to optimize nitrogen fixation efficiency in legume-rhizobia symbioses and improve alfalfa forage quality.

Key words: alfalfa; rhizobia; nitrogen fixation percentage; alfalfa variety effect; forage quality

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 是多年生草本植物, 因其具有高产、优质、高抗、利用方式多样等优点, 素有“牧草之王”的美称。它的多年生生长习性和根系生长根瘤的特点等, 使其在生态环境比较脆弱的今天, 在改良土壤、保持水土、保护环境等方面发挥着极大的作用^[1]。而紫花苜蓿品种按照产生方式可以分为地方型品种、国外引进品种和我国育成型品种三类。不同地方型紫花苜蓿品种的具体特点可能因地域、环境和管理条件等因素而有所不同^[2]。地方型紫花苜蓿具有适应性强、抗逆性突出、遗传稳定性好及具有地域特色等特点; 国外引进的紫花苜蓿品种是经过选育和推广的紫花苜蓿品种, 这些品种通常具有高产、优质、抗病、抗逆等特点, 并且在适应我国气候和土壤条件的基础上, 能够展现出优异的生产性能^[3]; 我国育成型紫花苜蓿品种通常是指从世界各地广泛收集不同的紫花苜蓿野生种、地方品种或已有的优良品系等作为基础材料, 通过人工选育和杂交等手段, 培育出的具有优良性状和特定用途的紫花苜蓿品种。这样的品种通常具有更高的产量、更强的抗逆性和抗害性, 以及更好的适应性, 能够满足不同的农业和畜牧业需求^[4-5]。

根瘤菌 (rhizobia) 可与紫花苜蓿共生形成根瘤, 将大气中的无机氮固定转化为有机氮, 这个过程也被称为生物固氮^[6]。孟捷^[7]研究发现接种苜蓿根瘤菌后, 株高与对照相比提高了 38.7%, 地上生物量提高了 44.2%, 地下生物量提高了 99.7%, 根瘤数量、重量和活性相比对照分别提高了 76.05%、224% 和 34.57%。紫花苜蓿与根瘤菌共生固氮的作用在提高紫花苜蓿产量和品质的同时, 能降低农业生产成本、提升土壤肥力和改善生态环境^[8]。

而紫花苜蓿与根瘤菌共生系统的一个重要特性是宿主专一性很强^[9]。提高苜蓿产量最有效的方法之一是给苜蓿接种与之相匹配的根瘤菌,充分发挥其共生固氮作用,达到增产目的。有研究指出,不同品种的苜蓿接种同一根瘤菌株,并不能使所有苜蓿品种获得相同的接种效果,彼此间差异较大^[10]。在相同的土壤条件下,高效根瘤菌株与紫花苜蓿品种组合的产量可比非优良组合的产量提高63.1%^[11]。苜蓿品种、根瘤菌菌株以及两者之间的亲和性决定了根瘤菌与苜蓿品种不同组合的共生差异,它们对共生效率的贡献率分别达到30%、26%和36%^[9]。陈利云等^[12]研究表明,金皇后接种最佳匹配的根瘤菌后,其地上干重和粗蛋白提升到106.3%和13.5%。潘佳等^[13]研究发现甘农3号接种17581菌株后幼苗长势较好,但陇东苜蓿接种17581菌株后并没有表现出相同的优势。因此,只有筛选出与优良根瘤菌株共生匹配的苜蓿品种,并且推广应用到实际生产中,才能提高苜蓿产业的经济效益和生态效益。中华根瘤菌株QL2是从清水紫花苜蓿的根瘤中分离而来的,其接种至甘农3号紫花苜蓿后共生匹配和适应能力强,能显著促进紫花苜蓿地上生物量^[14]。

因此,本研究根据团队前期的研究成果,选取3个类型,共8个紫花苜蓿品种,基于与根瘤菌株QL2共生的结瘤固氮以及促生效应等方面的差异特征,探究同类型紫花苜蓿品种与根瘤菌组合结瘤、固氮以及生长上的规律,对精准固氮技术的应用有重要的实践指导意义。

1 材料与方法

1.1 研究材料

1.1.1 供试苜蓿材料 选用8个西北地区广泛种植的国内外紫花苜蓿品种为供试苜蓿材料,基本情况如表1所示。

表1 供试紫花苜蓿品种

Table 1 Test alfalfa varieties

编号 Number	品种名 Variety name	学名 Scientific name	类型 Type	产地 Habitat	来源 Source
WL168	WL168HQ	<i>M. sativa</i> 'WL168HQ'	国外引进品种	美国	北京正道生态科技有限公司
WL298	WL298HQ	<i>M. sativa</i> 'WL298HQ'	Foreign introduced varieties	America	Beijing Rytway Ecotechnology Co., Ltd.
WL319	WL319HQ	<i>M. sativa</i> 'WL319HQ'			
QS	清水苜蓿 Qingshui	<i>M. sativa</i> 'Qingshui'		地方品种	中国
LZ	陇中苜蓿 Longzhong	<i>M. sativa</i> 'Longzhong'	The local varieties	China	Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Gansu Agricultural University
G9	甘农9号 Gannong No. 9	<i>M. sativa</i> 'Gannong No. 9'	我国育成品种	中国	甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室
G3	甘农3号 Gannong No. 3	<i>M. sativa</i> 'Gannong No. 3'	Varieties bred in China	China	Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education, Gansu Agricultural University
G5	甘农5号 Gannong No. 5	<i>M. sativa</i> 'Gannong No. 5'			

1.1.2 供试菌株 试验选用的根瘤菌株为中华根瘤菌株QL2(*Sinorhizobium meliloti* QL2),现保存于甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室。

1.2 田间试验

1.2.1 试验地概况 试验设在暖温半干旱气候区的甘肃农业大学兰州市安宁区牧草试验站,位于兰州市西北部,105°41' E,34°05' N,海拔1595 m。年均气温9.7℃,平均年降水量451.6 mm,年蒸发量1664 mm,日照时数2446 h,全年无霜期210 d,属温带半干旱大陆性气候,区内地势平坦,肥力均匀,土壤类型为黄绵土。

1.2.2 种子处理 分别选取各个品种健康饱满、大小一致的紫花苜蓿种子400粒,在无菌操作台内将各个品种的种子置于已灭菌的50 mL三角瓶中,先用碘伏浸泡5 min后用无菌水冲洗干净,再用ST液(氯化钠-吐温溶液:0.9%无菌氯化钠溶液,0.5%吐温80)浸泡1 min(ST液可提高消毒液的表面活性,增强消毒效果)后用无菌水冲洗干净^[15],最后用无菌滤纸吸干水分放置备用。

1.2.3 幼苗培育 本试验采用单因素随机区组设计,以8种不同品种紫花苜蓿和根瘤菌株QL2为材料。于2023年5月在牧草试验站进行,将营养土(购自甘肃绿能农业科技公司)高温灭菌后装入花盆内(直径18 cm、高13 cm、容积3.3 L),每盆中施1.4 g磷酸二氢铵作为基肥(单位面积N素含量<5%),严格控制生长条件和试验条件,区组内差异视为试验误差。每个小区放置8个苜蓿品种,用根瘤菌液处理不同小区,以浇无菌水为对照处理,每个处理4次重复,植株生长至初花期时进行采样。

1.2.4 根瘤菌液的制备及接菌 将保存于-80℃的根瘤菌株划线接种于TY固体培养基(酪蛋白胰酶琼脂, Tryptone yeast: 5.0 g·L⁻¹ 胰蛋白胨, 3.0 g·L⁻¹ 酵母粉, 1.3 g·L⁻¹ CaCl₂·6H₂O, 琼脂 16.0 g·L⁻¹, 蒸馏水 1000 mL, 调节pH=7.0~7.2)进行活化,在生化培养箱内28℃培养24 h。用无菌接种针挑取单菌落转入含有400 mL YMA液体培养基(酵母麦芽琼脂培养基, yeast malt agar: 0.5 g·L⁻¹ K₂HPO₄·3H₂O, 0.2 g·L⁻¹ MaSO₄·7H₂O, 0.1 g·L⁻¹ NaCl, 10 g·L⁻¹ 甘露醇, 1 g·L⁻¹ 酵母粉, 1000 mL 超纯水, 调节pH=7.0~7.2)的三角瓶中, 28℃、180 r·min⁻¹ 振荡培养18 h, 菌量至1×10⁹ cfu·mL⁻¹, 在25℃、10000 r·min⁻¹, 离心10 min, 弃上清液, 后用等量无菌水冲洗下菌体, 并用涡旋振荡器(MS 3 basic, 德国)将其打散摇匀^[14]。

在幼苗生长的第15天(第1片真叶出现)傍晚进行第1次根瘤菌接种, 每个花盆中浇根瘤菌液40 mL, 浇灌等体积的无菌水为对照。每隔4 d浇灌1次, 共计3次, 接种时保证每盆的接菌量达到1.0×10⁹ cfu·mL⁻¹以上^[16]。

1.3 室内砂培试验

1.3.1 种子处理 同1.2.2。

1.3.2 幼苗培育 试验采用砂培法^[14], 于2023年5月在培养室内进行(光照28℃/14 h, 黑暗20℃/10 h, 光照强度260~350 mol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度60%~70%)。选用饱满均一的紫花苜蓿种子, 经消毒后播种至直径9 cm、高12 cm、装有灭菌砂的培养杯中, 每杯播种20粒种子, 保苗15株, 每6杯为一组放入一个水培盒。共8个处理, 每个处理重复6次。接菌前每水培盒内加无氮营养液[无氮营养液(1 L): 3.73 g Na₂EDTA, 2.78 g FeSO₄·7H₂O, 24.4 g MgSO₄·7H₂O, 13.6 g KH₂PO₄, 1.69 g MnSO₄·H₂O, 920 mg ZnSO₄·7H₂O, 620 mg H₃BO₃, 50 mg Na₂MoO₄·2H₂O, 3.2 mg CuSO₄, 5 mg CoCl₂·6H₂O。用量为浇灌200 mL]一次, 加蒸馏水以补充水分。长至第1片真叶出现时, 每个水培盒均准确加入200 mg氮。培养35 d后将地上部分和根系分开取样进行相关指标的测定。

1.3.3 ¹⁵N同位素的添加和处理 氮以尿素CO(¹⁵NH₂)₂(由源叶公司提供的丰度为10%的¹⁵N尿素)溶液形式加入, 遮光1 d。

1.3.4 根瘤菌液的制备及接菌 同1.2.4。

1.4 指标测定及方法

1.4.1 结瘤指标 单株有效根瘤数: 将植株洗干净后, 每个接菌处理随机选取10株统计所有粉色根瘤数量, 计算单株粉色根瘤总数, 每个处理重复3次。体视显微镜(Smzb Series, 中国)下目测计数。将切开的根瘤放置于体视显微镜下进行观察, 呈淡粉色的为有效根瘤^[17]。

单颗有效根瘤重: 将植株洗干净后, 每个处理随机选取10株统计所有粉色根瘤数量后用分析天平(SQP, 中国)进行称重, 计算单颗粉色根瘤总鲜重, 每个处理重复3次。

根瘤直径: 将植株洗干净后, 每个处理随机选取30个有效根瘤, 用游标卡尺(IP54, 中国)(精度0.01 mm)进行测量。

根瘤形态结构的显微镜观察: 选取接菌组成熟有效根瘤置于50%FAA固定液(甲醛-乙酸-乙醇固定液, formaldehyde-acetic acid-ethanol fixative)中固定一段时间后用石蜡包埋制备为切片, 然后采用甲苯胺蓝染色再置于徕卡生物显微镜下进行扫描拍照观察, 通过Image J(National Institutes of Health, 美国)软件计算不同共生组合根瘤内部被侵染的根瘤细胞数目。

1.4.2 固氮指标 分别测定各处理的地上部干重、地下部干重、地上部氮含量和地下部氮含量。地上部和地下部干重测定: 将植株冲洗干净后, 用滤纸吸去多余水分, 每个处理随机选取10株, 取地上部分分离之后将鲜样进行105℃杀青15 min, 在75℃烘干测其干重, 每个处理重复3次。氮含量测定采用凯氏定氮法^[18]。固氮酶活

性:采用乙炔还原法测定^[19]。

地上部氮积累量=地上部氮含量×地上部干重

地下部氮积累量=地下部氮含量×地下部干重

$$C_2H_4 \text{水平} (\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}) = \frac{C \times hx \times V}{hs \times 1000 \times 22.4 \times t \times m} \times 10^6$$

式中: C 代表标准 C_2H_4 浓度($\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$), hx 代表样品峰面积, V :反应气体体积(mL), hs :标准 C_2H_4 峰面积, $22.4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$:乙烯的物质的量, t :反应时间(h), m :瘤重(g)。

稳定性 ^{15}N 同位素稀释法:分离地上、地下部分,在 70°C 恒温下烘干,用电子天平称量植株干重,利用凯氏定氮法和 ^{15}N 同位素测定仪(DELTA V Advantage,德国)测定每个样品的植物全氮量和 ^{15}N 含量,计算供试菌株固氮率和固氮量等^[20]。样品含氮量($\%N$):采用凯氏定氮法测定。

$$\text{固氮率} (\%N) = \left(1 - \frac{\%^{15}N_{\text{dff}} - \%^{15}N_{\text{dNF}}}{\%^{15}N_{\text{dNF}}}\right) \times 100$$

式中: $^{15}N_{\text{dff}}$ 代表样品中 ^{15}N 原子百分超, $^{15}N_{\text{dNF}}$ 代表自然界中 ^{15}N 原子百分超。

$$N_{\text{fixed}} = N_t \times \%N$$

式中: N_{fixed} 代表固氮量, N_t 代表全氮量。

1.4.3 生长指标 地上、地下干重:将植株冲洗干净后,用滤纸吸去多余水分,每个处理随机选取10株,取地上部分分离之后将鲜样进行 105°C 杀青15 min,在 75°C 烘干测其干重,每个处理重复3次。

1.4.4 营养指标 初花期刈割的鲜草烘干后,用微型植物粉碎机(FW177,中国)进行粉碎后过1 mm筛,保存于密封袋中备用。粗蛋白(crude protein, CP)采用凯氏定氮法测定;中性洗涤纤维(neutral detergent fiber, NDF)和酸性洗涤纤维(acid detergent fiber, ADF)采用范氏(Van Soest)洗涤纤维法测定,每个处理重复3次^[21]。

营养品质产量($\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$)=营养品质含量($\%$)×地上干重($\text{mg}\cdot\text{株}^{-1}$)×1000

1.4.5 苜蓿饲用品质评价 GI(饲草分级指数, grading index)是卢德勋根据我国饲料现状提出的新评定指标(表2),其能将能量、CP、NDF和ADF结合起来,更客观、全面地反映粗饲料的营养价值。GI利用以下公式进行计算^[22-23]。

$$VDMI = 1.2 \times BW/NDF$$

$$N_{\text{EL}} = [1.085 - (0.124 \times ADF)] \times 9.29$$

$$GI = N_{\text{EL}} \times VDMI \times CP/NDF$$

式中: $VDMI$ 为干物质随意采食量; N_{EL} 为产乳净能值; BW 为奶牛体重,以600 kg计算。

1.5 数据处理

采用Microsoft Office 2019软件进行数据整理。采用SPSS 26.0(IBM Corporation,美国)软件进行方差分析($P < 0.05$)和相关性分析;使用R语言进行层次分割(hierarchical partitioning)分析和Mantel分析;运用Origin 2024b(OriginLab,美国)软件作图。

2 结果与分析

2.1 不同品种紫花苜蓿与根瘤菌共生能力差异

2.1.1 不同共生组合结瘤能力差异 如图1所示,接种菌株QL2后,不同品种的单株有效根瘤数和单颗有效根瘤重均存在显著差异,其中WL319HQ品种的单株有效根瘤数最多,达到9.47个,但其单颗有效根瘤重最少,仅为0.20 mg,且显著低于其余品种($P < 0.05$);而甘农5号单株有效根瘤数最少(5.92个),其单颗有效根瘤重位居第二,达到1.50 mg。另外甘农3号的单颗有效根瘤重最重,达到1.64 mg。整体来看,我国育成品种的单颗有

表2 粗饲料质量等级标准

Table 2 Grade standard of roughage quality

分级 Grade	GI值 GI value ($\text{MJ}\cdot\text{d}^{-1}$)
特级 Extra grade	>53.68
1级 First grade	33.50~53.68
2级 Second grade	19.20~29.29
3级 Third grade	11.10~16.44
4级 Fourth grade	6.28~10.67
5级 Fifth grade	<6.28

注:指标级别未达到上一级别的仍划归到该级别。

Note: The index level that does not reach the upper level is classified as this level.

效根瘤重为1.33~1.64 mg,高出地方型品种(0.79~0.92 mg)74.45%和国外引进品种(0.20~0.50 mg)258.32%。

2.1.2 不同共生组合根瘤表型及其显微结构差异

从图2a可以看出,根瘤形状呈现出y字形、珊瑚状和短杆状。如图2b所示,整体根瘤直径范围在0.78~1.23 mm,不同品种根瘤直径存在显著差异。甘农9号根瘤直径最大,达到1.23 mm,其次为陇中苜蓿、甘农3号和清水苜蓿,WL298HQ的根瘤直径最小,仅0.78 mm。结合图2c,其中甘农3号根瘤内部甲苯胺蓝染色区域最多,根瘤内部被侵染的根瘤细胞数目为2520个,清水苜蓿根瘤内被侵染的根瘤细胞数目最少,仅有623个,但其甲苯胺蓝染色较深,观察其根瘤颜色跟其他品种根瘤相比更为粉嫩,且固氮酶活性也较高,达到 $0.53 \mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,位居第二。

2.2 不同品种紫花苜蓿与根瘤菌共生组合固氮能力差异

2.2.1 不同共生组合 ^{15}N 含量、固氮率以及固氮量差异 如图3所示,接种根瘤菌株QL2后,各紫花苜蓿品种 $\%^{15}\text{N}_{\text{diff}}$ 、固氮率和固氮量存在显著差异($P<0.05$),由图3c可知,国外引进品种和我国育成品种的固氮率均在50%以上,最高为WL298HQ,达到

63.49%,且结合图3a、b、d可知,其植株全氮(2.91%)和固氮量($14.31 \text{ mg}\cdot\text{pot}^{-1}$)均高于其他处理,但其 $\%^{15}\text{N}_{\text{diff}}$ 最低,仅有13.37%,但地方型品种的固氮率均低于50%,其中清水苜蓿最低,仅为43.05%,其固氮量也最低($5.94 \text{ mg}\cdot\text{pot}^{-1}$),且显著低于其他品种($P<0.05$),但其 $\%^{15}\text{N}_{\text{diff}}$ 最高,达到20.86%。

2.2.2 不同共生组合地上、地下氮积累量差异 由图4a、c可知,接种根瘤菌QL2后,各品种间地上、地下部氮积累量差异显著,甘农3号、WL298HQ和WL319HQ接菌组的地上氮积累量显著高于其他处理($P<0.05$),分别达到 $146.35, 145.35$ 和 $122.39 \text{ mg}\cdot\text{株}^{-1}$,较CK分别提高了39.85%,26.87%和51.05%($P<0.05$),而甘农9号的地上氮积累量较CK为显著降低,降幅达到28.38%。地上氮积累量最低的为清水苜蓿对照组,仅有 $56.82 \text{ mg}\cdot\text{株}^{-1}$ 。

由图4b、c可知,不同处理地下氮积累量也存在显著差异,甘农3号、WL168HQ、WL319HQ和清水苜蓿接菌组地下氮积累量显著高于CK($P<0.05$),其中甘农3号地下氮积累量增幅最显著,达到78.28%。相反,甘农5号与甘农9号接菌后地下氮积累量显著低于CK($P<0.05$),分别降低44.66%和41.28%,其中甘农5号地下氮积累量最低,仅有 $13.38 \text{ mg}\cdot\text{株}^{-1}$ 。

2.3 不同品种紫花苜蓿与根瘤菌共生固氮组合地上、地下生物量差异

如图5a、c所示,接种QL2后,不同品种不同处理间生物量差异显著($P<0.05$),从地上干重来看,甘农3号、WL298HQ和WL319HQ接菌组的地上干重均较高,且显著高于CK,其中WL298HQ最高,达到 $5.37 \text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$,而甘农3号的增幅最显著,达到24.99%;其他品种接菌组地上干重对比CK均有所降低,其甘农9号地上干重较CK显著降低,降幅为27.22%($P<0.05$)。

如图5b、c所示,地下干重方面也存在显著差异,甘农3号、WL168HQ和WL319HQ接菌组地下干重显著高于CK,分别提高54.12%、55.97%和45.91%。甘农5号、甘农9号和陇中苜蓿的地下干重较CK显著降低($P<$

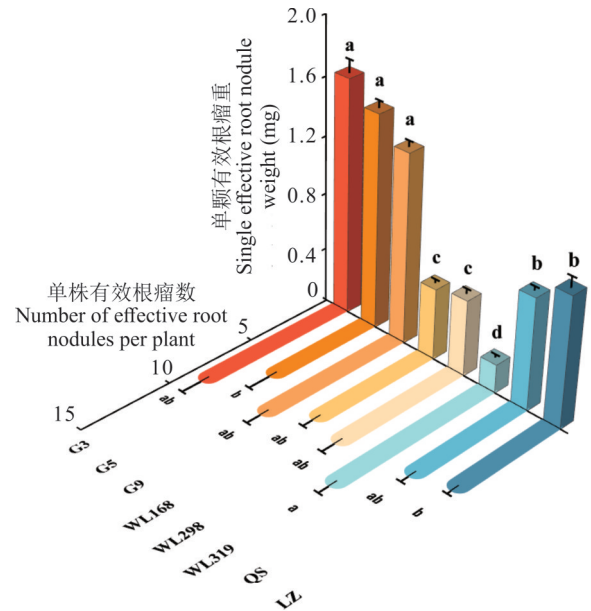


图1 不同共生组合结瘤能力差异

Fig. 1 The nodulation ability of different symbiotic combinations was different

G3: 甘农3号; G5: 甘农5号; G9: 甘农9号; WL168: WL168HQ; WL298: WL298HQ; WL319: WL319HQ; QS: 清水苜蓿; LZ: 陇中苜蓿; 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),下同。G3: Gannong No.3; G5: Gannong No.5; G9: Gannong No.9; WL168: WL168HQ; WL298: WL298HQ; WL319: WL319HQ; QS: *M. sativa* Qingshui; LZ: *M. sativa* Longzhong. The different letters indicate the significant difference ($P<0.05$), the same below.

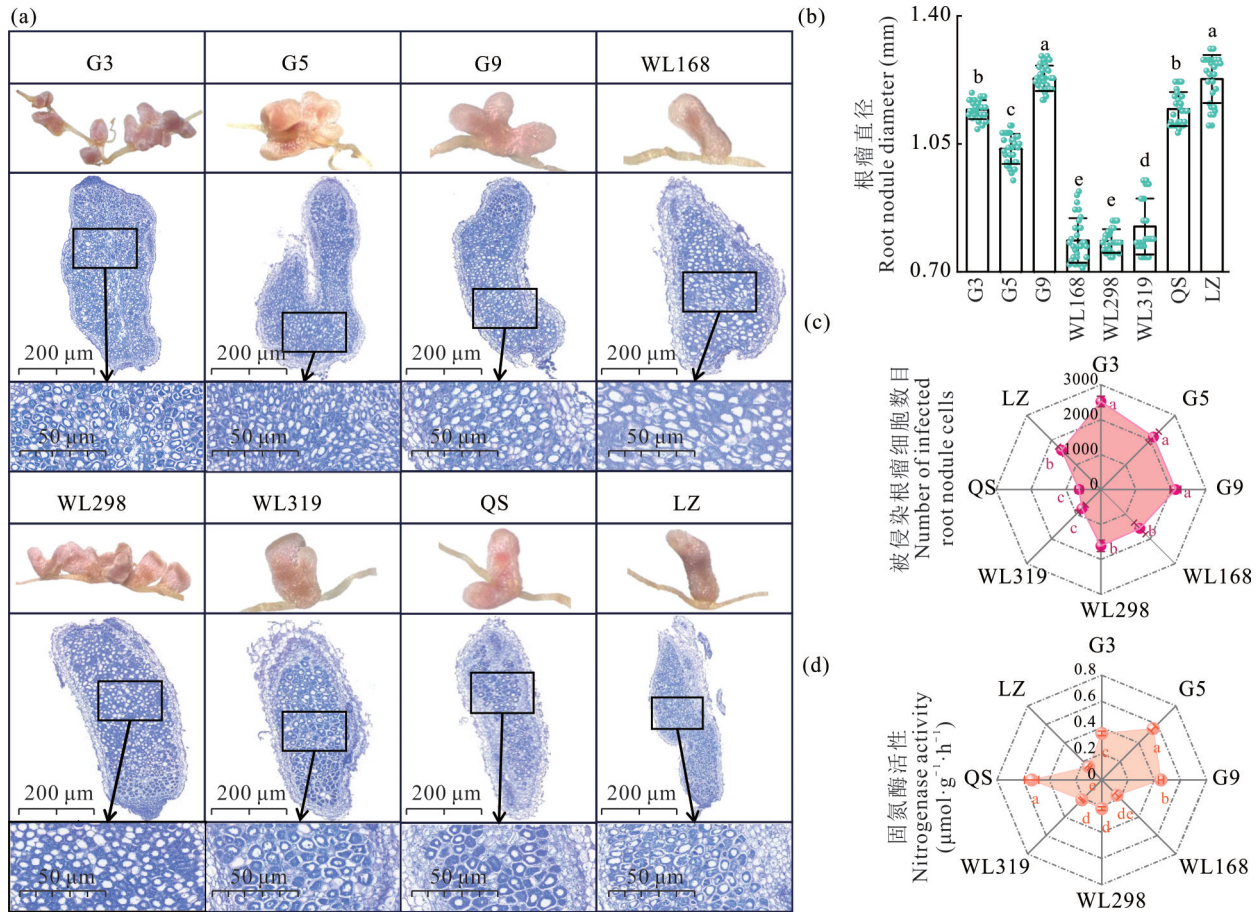


图2 不同共生组合根瘤切片和根瘤内部被侵染的根瘤细胞数目差异

Fig. 2 Differences in the number of infected nodule cells in nodule sections and nodules of different symbiotic combinations

(a)为不同共生组合的根瘤照片以及根瘤甲苯胺蓝染色切片;(b)为不同共生组合根瘤直径;(c)为不同共生组合根瘤中被侵染细胞数目;(d)为不同共生组合的固氮酶活性。(a) shows photos of root nodules of different symbiotic combinations and toluidine blue staining sections of root nodules; (b) is the root nodule diameter of different symbiotic combinations; (c) shows the number of infected cells in nodules of different symbiotic combinations; (d) shows the nitrogenase activity of different symbiotic combinations.

0.05),其中甘农5号地下干重最低($0.75\text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$)且降幅最大,降低46.11%。WL298HQ虽与其CK无显著差异,但在接菌处理下其地下干重较其他品种高,达到 $1.88\text{ g}\cdot\text{株}^{-1}$ 。

依据不同品种紫花苜蓿接种根瘤菌QL2对植株生物量影响产生的显著差异,将共生固氮组合的促生效应分类,分为6种类型(表3):WL298HQ—地上积累型;甘农3号、WL319HQ—地上、地下积累型;WL168HQ—地下积累型;清水苜蓿—零增长型;甘农9号—地上、地下消耗型;甘农5号、陇中苜蓿—地下消耗型。

2.4 不同品种紫花苜蓿与根瘤菌共生固氮组合的营养品质

2.4.1 不同共生组合粗蛋白含量差异 如图6a所示,所有供试苜蓿品种粗蛋白含量为14.69%~18.44%。由图6b可知,除甘农9号外,其余品种接菌组的粗蛋白含量较CK均有提升,其中甘农3号、甘农5号、WL168HQ、WL298HQ、清水苜蓿和陇中苜蓿接菌组粗蛋白含量显著高于CK($P<0.05$),提升最显著的为甘农5号(16.34%),其次为甘农3号(12.01%)。

如图6c、d所示,所有品种处理的粗蛋白产量为 $416.46\sim 914.71\text{ mg}\cdot\text{株}^{-1}$,差异显著($P<0.05$)。其中甘农3号、WL298HQ和WL319HQ较其对照均显著提高,其中甘农3号产量最高,达到 $914.71\text{ mg}\cdot\text{株}^{-1}$,WL319HQ提升最为显著,达到51.08%,而甘农9号较CK显著降低了28.39%,为 $508.16\text{ mg}\cdot\text{株}^{-1}$ ($P<0.05$)。

2.4.2 不同共生组合纤维含量差异 如图7a~d所示,接种根瘤菌QL2后,8种紫花苜蓿的NDF和ADF含量较CK均降低。图7a可知,甘农5号CK的NDF含量最高(56.11%),且显著高于其他处理($P<0.05$),图7b可

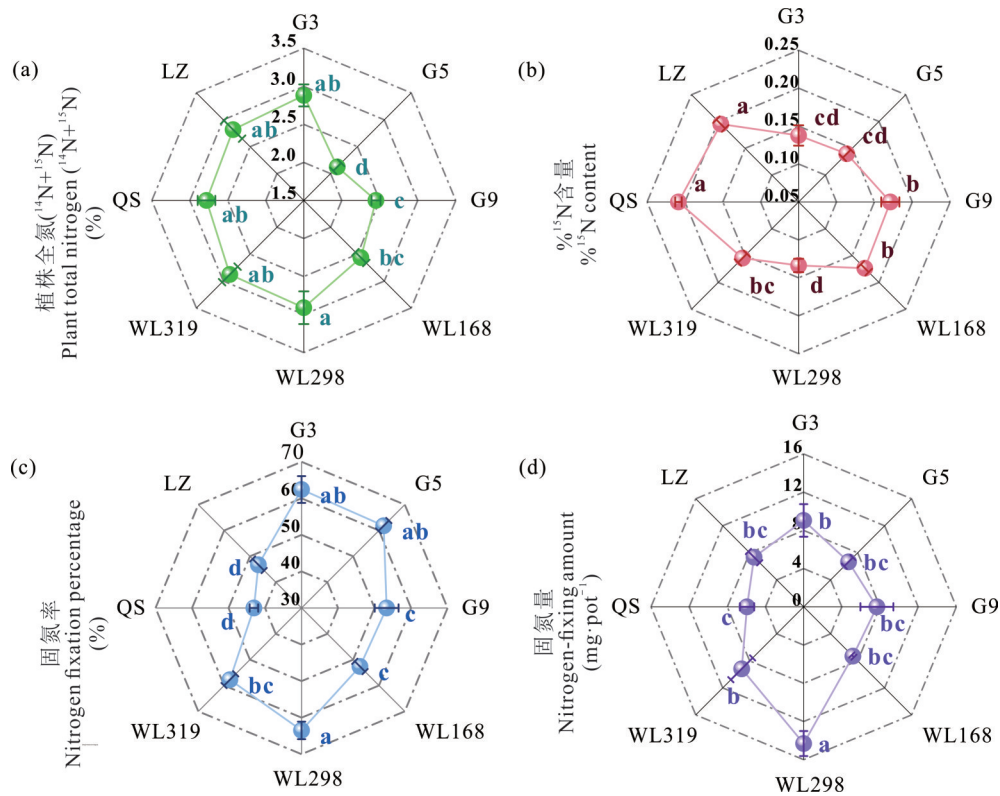


图 3 不同共生组合固氮能力差异

Fig. 3 The difference of nitrogenase activity and nitrogen fixation in different symbiotic combinations

(a) 为不同共生组合 ^{15}N 处理后(室内砂培)的全株含氮量;(b) 为不同共生 ^{15}N 的原子百分超;(c) 表示不同共生组合的固氮率;(d) 为不同共生组合的固氮量。(a) is the whole plant nitrogen content of different symbiotic combinations after ^{15}N treatment (indoor sand culture); (b) shows the atomic percentage excess of different symbiotic ^{15}N ; (c) shows the nitrogen fixation percentage of different symbiotic combinations; (d) is the amount of nitrogen fixation in different symbiotic combinations.

知,甘农 5 号、甘农 9 号和 WL168HQ 的 NDF 和 ADF 含量降幅均排名前三,甘农 5 号的降幅最为显著($P < 0.05$),分别达到了 26.01% 和 39.75%。由图 7a~d 可知, WL298HQ 和 WL319HQ 的接菌组 NDF 含量较 CK 无显著降低,但其 ADF 分别显著降低 18.34% 和 31.23%,而清水苜蓿接菌组的 NDF 含量显著降低,但 ADF 含量降低不显著。

由图 7e 可知,甘农 5 号未接菌组的 NDF 产量最高($2192.38 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$),而 WL168HQ 接菌组的产量最低($1176.37 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$)。甘农 5 号、甘农 9 号和陇中苜蓿接菌组的产量均较 CK 分别显著降低 22.08%、40.55% 和 21.56%,而图 7f 表明 WL319HQ 的 NDF 产量较 CK 显著增高 42.11%,达到 $1860.59 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$ ($P < 0.05$)。图 7g 得出,所有品种处理的 ADF 产量为 $495.45 \sim 1840.22 \text{ mg} \cdot \text{株}^{-1}$,各品种接菌组的产量无显著增加。此外甘农 5 号、甘农 9 号、WL168HQ 和陇中苜蓿,均显著降低($P < 0.05$),其中甘农 9 号降幅最大,达到 53.96%(图 7h)。

2.5 不同共生组合地上、地下部共生效应的差异

如图 8a 所示,不同品种与 QL2 产生的地上部共生效应有显著差异,甘农 3 号、甘农 5 号、WL168HQ、WL298HQ、WL319HQ 和清水苜蓿为正效应,其中 WL319HQ 地上效应最高(834.23);而甘农 9 号和陇中苜蓿地上部共生效应为负效应,且甘农 9 号(-11.09)显著低于其他品种($P < 0.05$)。

如图 8b 所示,不同品种与 QL2 产生的地下部共生效应也存在显著差异,甘农 3 号、WL168HQ、WL298HQ、WL319HQ 和清水苜蓿均为正效应,其中 WL168HQ 和 WL319HQ 显著高于其他品种,为 190.31 和 201.60;而甘农 5 号、甘农 9 号和陇中苜蓿地下部共生效应为负效应,且均显著低于其他品种($P < 0.05$)。

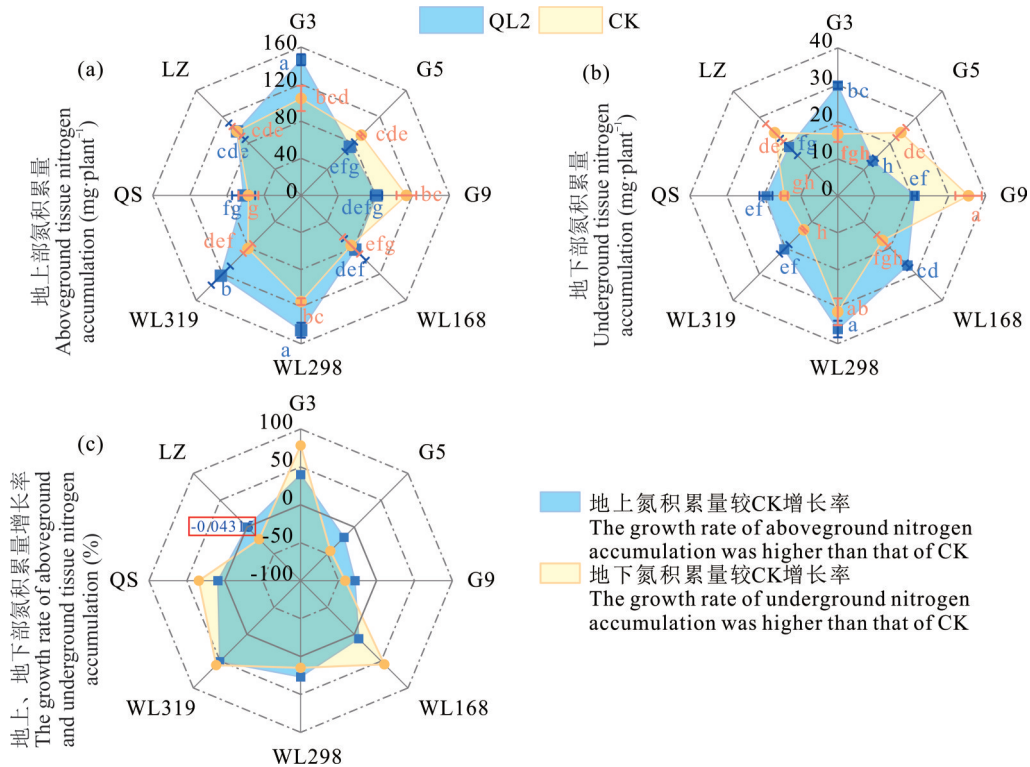


图4 不同共生组合与对照地上、地下氮积累量差异

Fig. 4 The difference of aboveground and underground nitrogen accumulation between different symbiotic combinations and CK

(a)表示不同品种紫花苜蓿接菌处理和对照组地上氮积累量;(b)表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组地下氮积累量;(c)表示接菌处理较对照组的地上、地下氮积累量的增长率。(a) shows the above-ground nitrogen accumulation of different varieties of alfalfa and CK; (b) shows the underground nitrogen accumulation of different varieties of alfalfa and CK; (c) shows the growth rate of above-ground and under-ground nitrogen accumulation in the inoculated treatment compared with CK.

2.6 驱动地上干重的关键结瘤固氮因子

在探究不同紫花苜蓿接种根瘤菌的共生固氮效应中,为明确驱动地上干重变化的结瘤固氮因子及其具体影响程度,本试验采用了多元回归,通过对模型的调整 R^2 ($_{adj}R^2$)进行层次分割,详细解析了结瘤指标和固氮指标对地上干重的具体影响,同时也明确了关键指标的具体贡献(图9)。结果显示,结瘤固氮指标解释了地上干重变化的63%($_{adj}R^2=0.63$; $P<0.001$),其中结瘤指标解释了13.55%(单株有效根瘤数解释率为0%),固氮指标解释了89.56%,其中固氮率极显著解释了42.50%($P<0.001$),根瘤直径显著解释了2.73%($P<0.01$),固氮量解释了44.25%($P<0.05$)。

2.7 不同共生组合营养品质的评价

如图10a所示,除WL298HQ和WL319HQ外,其余品种接菌后干物质随意采食量均较CK显著提高,其中甘农5号提高最大,达到35.31%($P<0.05$)。图10b可得,产乳净能值中,除甘农3号和清水苜蓿外其余品种接菌组均显著高于CK,其中甘农5号仍提高最大,达到25.36%($P<0.05$)。如图10c可知,在接种根瘤菌后,其中甘农5号从2级提升为特级,指数从20.68增长至55.47,所有品种的饲草等级均提升1~2级。表4所示接菌组的饲草等级划分,其中除清水苜蓿-QL2为1级饲草外,其余组合均为特级饲草。

2.8 根瘤菌对不同紫花苜蓿品种共生固氮效应影响的相关性评价

紫花苜蓿—根瘤菌共生系统的固氮效应不能仅凭单一指标衡量。本研究通过相关性分析发现,如图11a所示,固氮率与被侵染细胞数、固氮量、地上及地下干重、氮积累量及营养物质(CP、NDF、ADF)产量存在显著正相关关系,仅与根瘤直径显著负相关,说明固氮率与生物量有着密切的正向关系,但与结瘤效应无显著影响。除此之外,单株有效根瘤重与根瘤直径、被侵染细胞数量和固氮酶活性呈显著正相关,而与地上和地下共生效应呈极

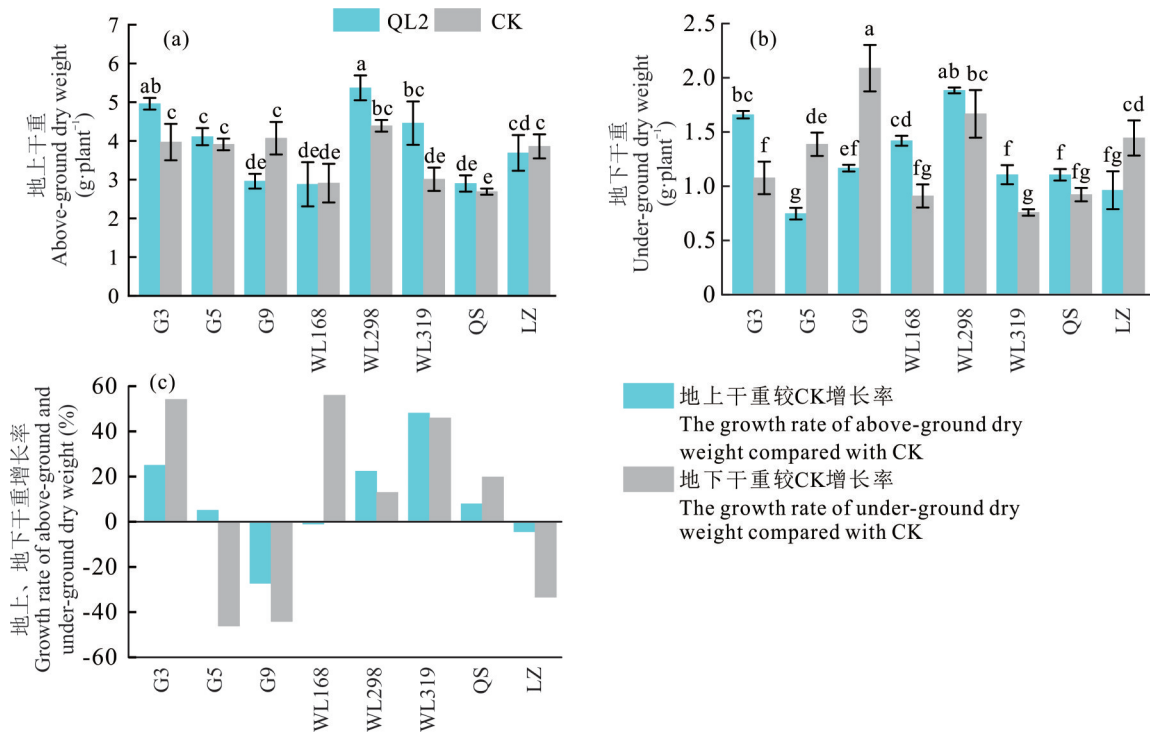


图 5 不同共生固氮组合地上、地下干重和较 CK 增长率的差异

Fig. 5 The aboveground and underground dry weight of different symbiotic nitrogen fixation combinations and growth rate difference compared with CK

(a)代表不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组地上干重;(b)表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组地下干重;(c)表示接菌处理较对照组的地上、地下干重的增长率。(a) represents the above-ground dry weight of different varieties of alfalfa inoculated with CK; (b) shows the under-ground dry weight of different varieties of alfalfa and CK; (c) shows the growth rate of the above-ground and under-ground dry weight of the inoculated treatment compared with CK.

表 3 不同共生组合地上、地下生物量变化类型

Table 3 The change types of aboveground and underground biomass in different symbiotic combinations

类型 Type	特点 Feature	品种(接菌后) Varieties (after inoculation)
地上积累型 Above-ground accumulation type	地上干重增加,地下干重无显著差异。Above-ground dry weight increased significantly, while under-ground dry weight showed no significant difference.	WL298
地上、地下积累型 Above-ground and under-ground accumulation type	地上、地下干重增加。The dry weight of both above-ground and under-ground exhibited an increase.	G3、WL319
地下积累型 Under-ground accumulation type	地上干重无显著差异,地下干重显著增加。There was no significant difference in above-ground dry weight, while under-ground dry weight increased significantly.	WL168
零增长型 Zero-growth type	地上、地下干重均无显著差异。The above-ground and under-ground dry weights did not exhibit any statistically significant difference.	QS
地上、地下消耗型 Above-ground and under-ground depletion type	地上、地下干重减少。The above-ground and under-ground biomass demonstrated a substantial reduction.	G9
地下消耗型 Under-ground depletion type	地上干重无显著差异,地下干重减少。The above-ground biomass did not exhibit any significant difference, whereas a notable decrease was observed in the under-ground biomass.	G5、LZ

显著负相关;而固氮酶活性并不与固氮率和固氮量存在显著相关性,说明固氮酶活性只能表示固氮潜力,固氮能力的强弱还存在其他因素的影响;地上干重和固氮量、地上共生效应、地下干重、地上氮积累量、地下氮积累量以及营养品质产量均存在显著正相关性。

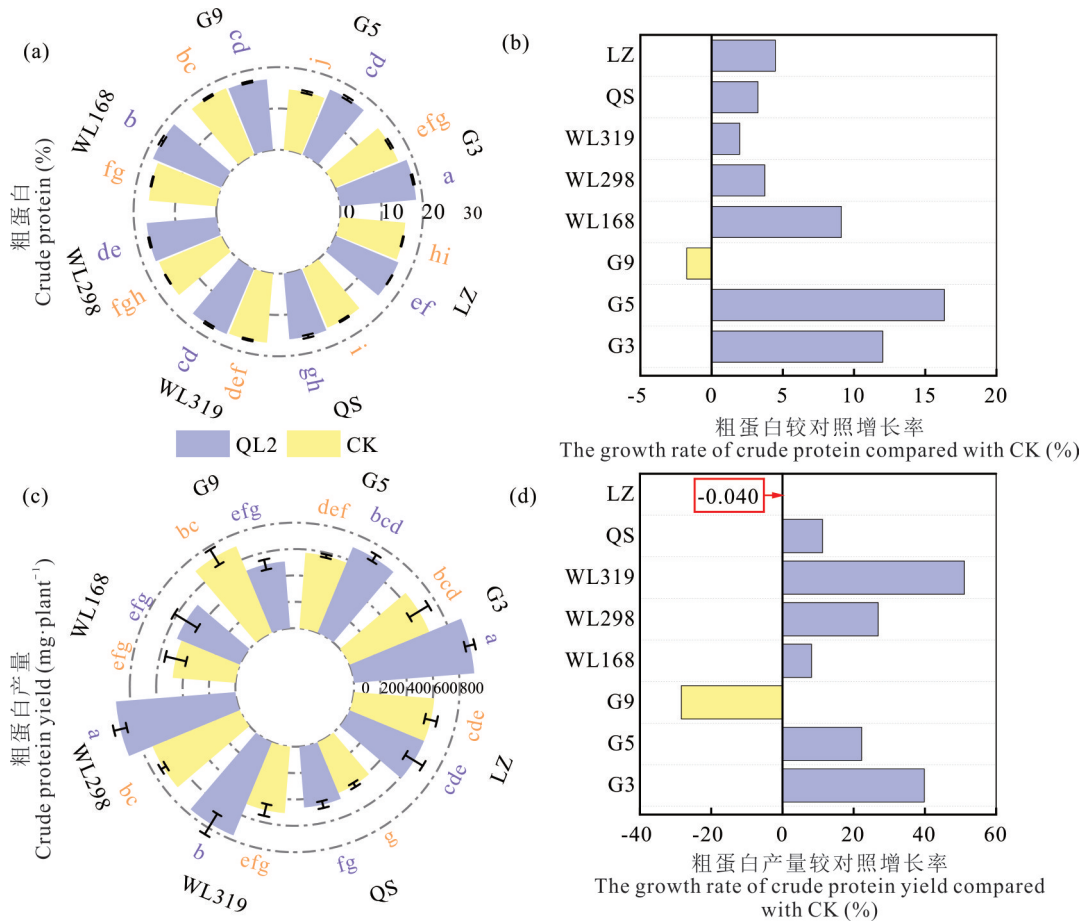


图6 不同共生组合粗蛋白含量和较CK增长率的差异

Fig. 6 The crude protein content in different symbiotic combinations and growth rate difference compared with CK

(a)代表不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组粗蛋白含量;(b)表示接菌处理较对照组的粗蛋白含量的增长率;(c)表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组粗蛋白产量;(d)表示接菌处理较对照组的粗蛋白产量的增长率。(a) represents the crude protein content of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (b) shows the growth rate of crude protein content in the inoculated treatment compared with CK; (c) shows the crude protein yield of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (d) shows the growth rate of crude protein production in the inoculated treatment compared with CK.

又将不同类型紫花苜蓿品种的固氮率与其共生固氮效应指标进行相关性分析,得出3个类型的品种固氮率与地上干重均有显著正相关性。如图11b所示,我国育成品种的固氮率与地上共生效应、地上干重以及营养物质(CP、NDF、ADF)产量指标存在显著正相关;图11c所示,国外引进品种的固氮率与固氮酶活性、固氮量、地上干重、地上氮积累量、营养物质(CP、NDF、ADF)产量指标存在显著正相关,但与地下共生效应显著负相关;图11d所示,地方品种固氮率与地上干重和粗蛋白产量呈显著正相关。

3 讨论

3.1 接种根瘤菌对不同品种紫花苜蓿共生固氮的影响

生物固氮是豆科植物在整个生长发育过程中最主要的吸收氮素的途径,根瘤菌科的土壤细菌位于一个共生器官——根瘤中,其是进行生物固氮的重要结构。从紫花苜蓿类型来看,我国育成品种的有效根瘤重以及根瘤内部被侵染细胞数目均显著高于其他苜蓿类型,而国外引进品种的根瘤数目高,但其根瘤重量、根瘤直径、根瘤内部被侵染细胞数目以及固氮酶活性均较低。地方型品种虽根瘤直径较高,但根瘤内部被侵染细胞数较低。综上所述,同种类型的紫花苜蓿品种,其结瘤能力具有相似性,我国育成型品种为杂交选育而来,适应性较强,与外源根瘤菌能达成较好适配性,而地方品种和国外引进品种可能存在地域性较强,与外源根瘤菌共生效应相较国内育成型品种较弱的情况。

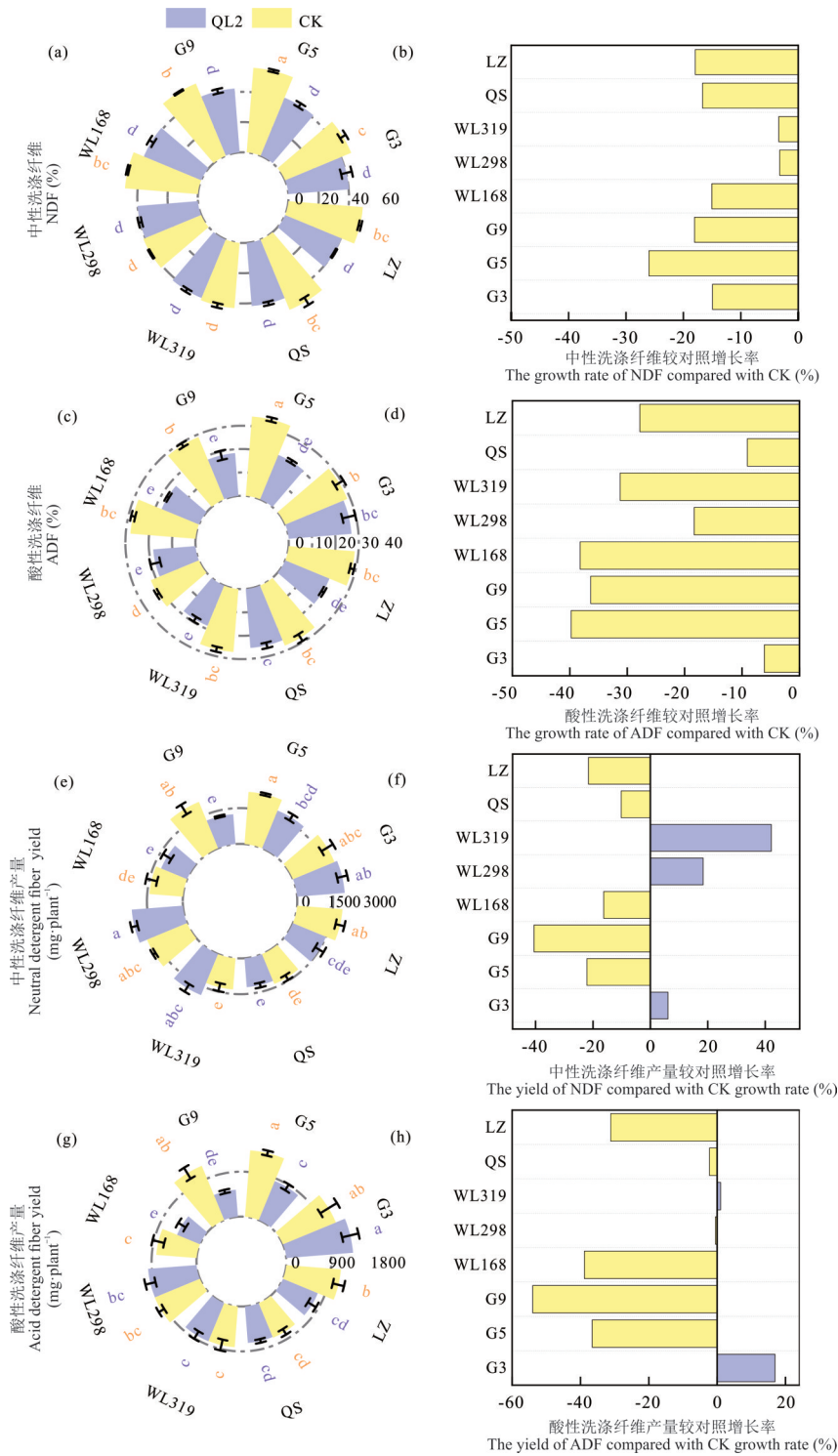


图 7 不同共生组合 NDF、ADF 含量差异

Fig. 7 Difference of NDF and ADF content in different symbiotic combinations

(a)代表不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组中性洗涤纤维含量;(b)表示接菌处理较对照组的中性洗涤纤维含量的增长率;(c)表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组酸性洗涤纤维含量;(d)表示接菌处理较对照组的酸性洗涤纤维含量的增长率;(e)代表不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组中性洗涤纤维产量;(f)表示接菌处理较对照组的中性洗涤纤维产量的增长率;(g)表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组酸性洗涤纤维产量;(h)表示接菌处理较对照组的酸性洗涤纤维产量的增长率。(a) represents the NDF content of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (b) shows the growth rate of NDF content in the inoculated treatment compared with CK; (c) shows the ADF content of in different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (d) shows the growth rate of ADF content in the inoculated treatment compared with CK; (e) represents the NDF yield of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (f) shows the growth rate of NDF yield in the inoculated treatment compared with CK; (g) shows the ADF yield of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (h) shows the growth rate of ADF yield in the inoculated treatment compared with CK. NDF: Neutral detergent fiber; ADF: Acid detergent fiber.

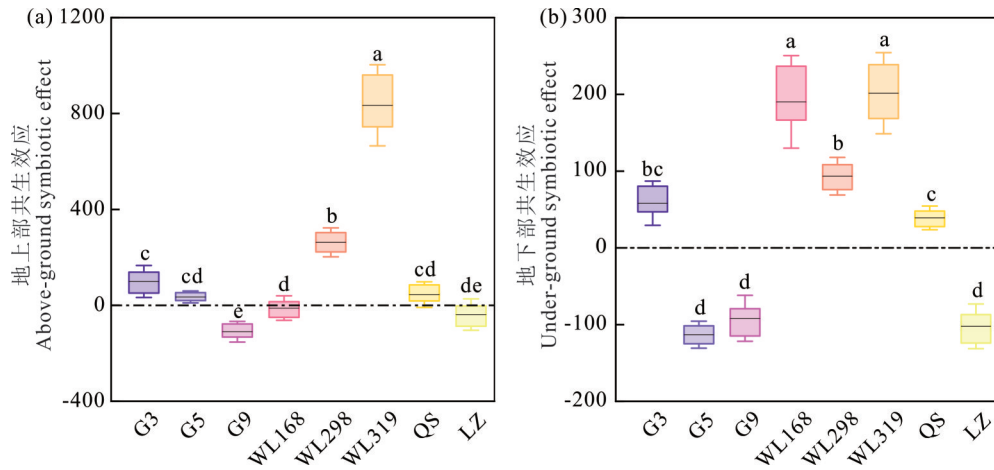


图8 不同共生组合地上、地下部共生效应的差异

Fig. 8 Differences in symbiotic effects between aboveground and underground parts of different symbiotic combinations

(a)代表不同共生组合的地上共生效应;(b)代表不同共生组合的地下共生效应。(a) represents the above-ground symbiotic effect of different symbiotic combinations; (b) shows the under-ground symbiotic effect representing different symbiotic combinations.

有研究发现部分根瘤菌可以侵染根系形成根瘤,但并不起到固氮作用^[24],所以本研究同时采用¹⁵N同位素稀释法,对8个共生组合的固氮能力进行检测发现,不同品种的固氮能力差异较大。本研究中WL298HQ-QL2组合的固氮率和固氮量均最高,前人研究发现,WL298HQ为广谱型品种,与多菌株均有较强的适配性^[25],这说明该品种接种不同根瘤菌均能对植株产生正向效应,而甘农3号-QL2的固氮率仅次于WL298HQ-QL2,但这两个组合的固氮酶活性均较低。陈钢^[26]与康俊梅等^[27]研究发现固氮酶活性只能作为豆科根瘤菌共生系统固氮效应测定的间接指标,并不代表最终固氮能力。所以导致固氮酶活性与固氮率不相符的原因可能为采样时WL298HQ-QL2和甘农3号-QL2根瘤衰老,活力下降。

固氮率可以由¹⁵N含量直观进行计算,植株的固氮量与植株自身全氮含量和干重有关,这导致固氮量和固氮率的变化并不一致,甘农5号-QL2组合的固氮率较高但其固氮量却较低,该情况是其室内试验采样时期自身氮含量较低导致,但较高的固氮率就说明根瘤能为植株有效固氮。综上所述,结瘤能力与固氮能力并不挂钩,且固氮酶活性并不完全代表固氮能力,实际固氮能力还受其他因素影响。

3.2 接种根瘤菌对不同品种紫花苜蓿促生效应的影响

Gibson等^[28]研究表明,在土壤条件相同的情况下,同一根瘤菌与不同苜蓿品种并不能获得同样的接种效果,对某个品种产生优异表现的菌株,对另一品种也许只能起诱导次级反应的作用。这两种生物之间的交互作用说明根瘤菌与寄主之间需要很好的搭配。而地上生物量是衡量紫花苜蓿生产性能的最重要指标,也是评价其品种优劣的关键特征^[29],本研究采用层次分割,表明固氮因子对地上干重存在显著影响,且贡献率占比大于结瘤因子,

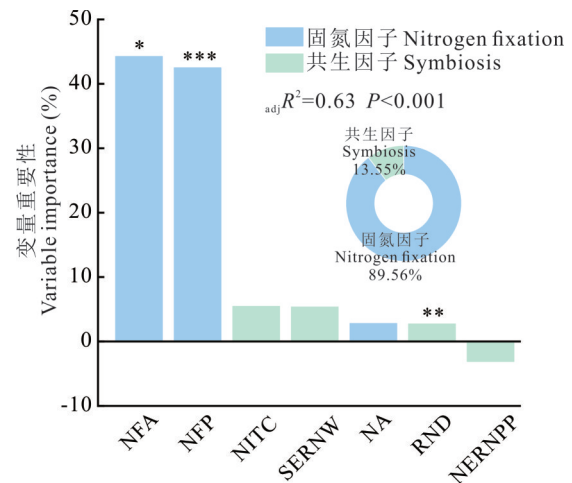


图9 共生固氮因子对地上干重的相对贡献

Fig. 9 Relative contribution of symbiotic nitrogen fixation factors to aboveground dry weight

NFA: 固氮量; NFP: 固氮率; NITC: 被侵染根瘤细胞数量; SERNW: 单颗有效根瘤重; NA: 固氮酶活性; RND: 根瘤直径; NERNPP: 单株有效根瘤数量。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$. NFA: Nitrogen fixation amount; NFP: Nitrogen fixation percentage; NITC: The number of infected nodule cells; SERNW: Single effective root nodule weight; NA: Nitrogenase activity; RND: Root nodule diameter; NERNPP: Number of effective root nodules per plant. *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$.

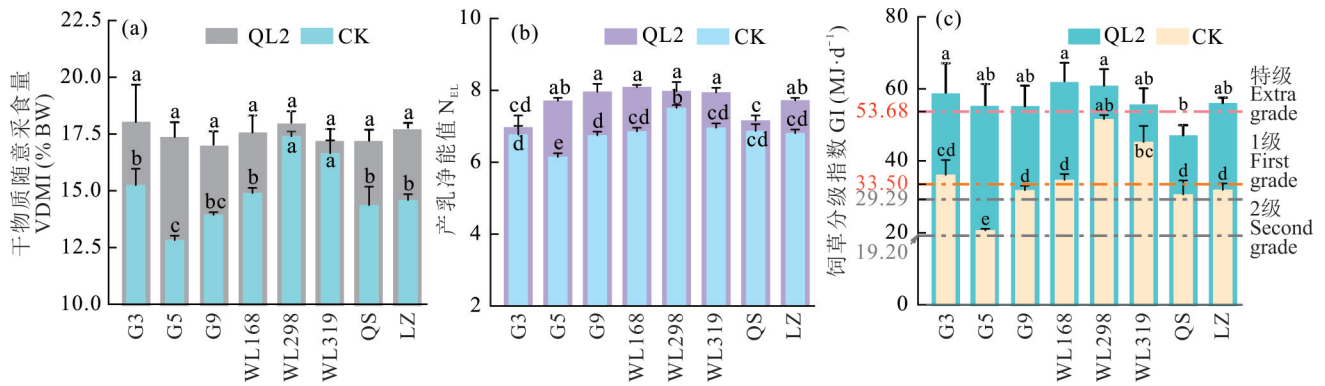


图 10 不同共生组合较 CK 饲草品质的差异及评价

Fig. 10 The difference and evaluation of forage quality of different symbiotic combinations compared with CK

(a) 代表不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组的干物质随意采食量; (b) 表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组的产乳净能值; (c) 表示不同品种紫花苜蓿接菌处理与对照组的饲草分级指数。(a) represents dry matter intake of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (b) shows the net energy for lactation of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK; (c) shows the forage grading index of different varieties of alfalfa inoculated with bacteria and CK. VDMI: 干物质随意采食量 Voluntary dry matter intake; N_{EL} : 产乳净能值 Net energy for lactation; GI: 饲草分级指数 Grading index.

结合相关性分析(图 11)表明,从整体和品种类型分析中,地上干重均与固氮率显著正相关,刘雨涵等^[30]和马霞等^[31]研究表明,在不施加外源氮的情况下,不同品种紫花苜蓿的固氮率与地上干重存在正向关系,本研究结果与其一致。

而前人也使用每 g 根瘤的植物生物量增益来估计共生过程的效率^[32]。本研究计算了 8 个紫花苜蓿品种与根瘤菌 QL2 产生的共生效应(图 8),结合固氮因子将共生效应与生物量分类综合考虑可得,甘农 3 号、WL298HQ 和 WL319HQ 地上部均产生正效应,且三者固氮率均达到 57% 以上,说明共生对其植株地上生物量有促进作用,可能由于根瘤菌通过侵染苜蓿根部形成根瘤进行共生固氮,为苜蓿植株提供充足氮素^[33],大量转化的氮被运输至地上部促进了物质的积累。WL168HQ 地下部生物量效应为正值,但地上部无显著效应,这原因可能为共生固氮过程中,根瘤能为植物提供氮源,但对于氮的实际利用部位,是由植物自主进行调控的^[34],这就导致了同一植株不同部位的共生效应出现不同效果的情况。甘农 9 号、甘农 5 号和陇中苜蓿生物量表现为负积累,原因可能为共生固氮过程是一个需要消耗大量能量的过程^[35],若品种与根瘤菌共生固氮效应弱,会导致根瘤消耗过大,对植株生物量以及体内物质的积累产生了负效应,共生变为“寄生”。

综上所述,可得出紫花苜蓿品种接种根瘤菌后产生的共生固氮效应越强,其体内物质积累就会越多,而这种物质的积累部位由植物自行调控。国外引进品种的紫花苜蓿虽促生部位不同,但接种根瘤菌 QL2 均对生物量产生了正效应,说明 QL2 与国外引进品种适配性较好,固氮能力相对较高,对其的生物量均能产生正向积累;我国育成型紫花苜蓿品种在接种同种根瘤菌后产生出不同的促生效应,甘农 3 号表现出与 QL2 的高适配性,固氮能力强且生物量有显著提高,但甘农 5 号和甘农 9 号的生物量均出现负效应,原因可能与我国育成品种的产生方式有关,在杂交选育过程中增强了品种特异性,导致了与根瘤菌的专一性更强;而地方型紫花苜蓿体现出无效应与负效应,这说明地方型紫花苜蓿与外源接入的 QL2 适配性较低,产生的根瘤无法为植株提供有效固氮,反而消耗了植物能量。

表 4 8 个共生组合的 GI 级别

Table 4 GI grades of 8 symbiotic combinations

共生组合 Symbiotic combinations	GI 值 GI value ($MJ \cdot d^{-1}$)	GI 级别 GI grade
G3-QL2	58.97	特级 Extra grade
G5-QL2	55.47	特级 Extra grade
G9-QL2	55.22	特级 Extra grade
WL168-QL2	62.12	特级 Extra grade
WL298-QL2	60.90	特级 Extra grade
WL319-QL2	56.19	特级 Extra grade
QS-QL2	47.10	1级 First grade
LZ-QL2	56.09	特级 Extra grade

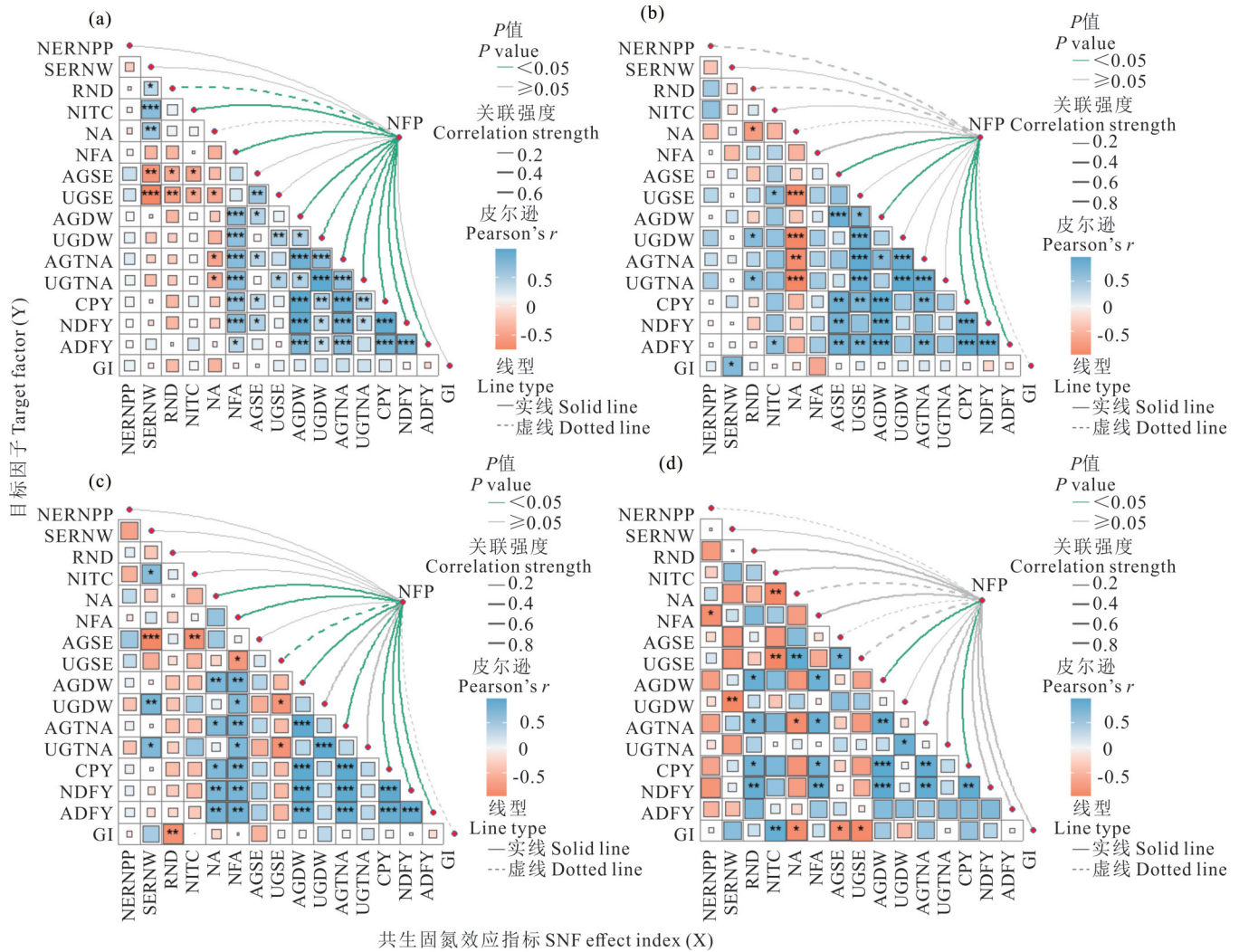


图 11 供试紫花苜蓿接种根瘤菌 QL2 共生固氮效应指标的相关性

Fig. 11 Correlation of symbiotic nitrogen fixation (SNF) effect indexes of alfalfa inoculated with rhizobia QL2

(a)为所有供试紫花苜蓿接种根瘤菌 QL2 共生固氮效应指标的相关性分析;(b)表示我国育成紫花苜蓿品种接种根瘤菌 QL2 共生固氮效应指标的相关性分析;(c)表示国外引进紫花苜蓿品种接种根瘤菌 QL2 共生固氮效应指标的相关性分析;(d)表示地方型紫花苜蓿品种接种根瘤菌 QL2 共生固氮效应指标的相关性分析。NFP:固氮率; SNF:共生固氮; NERNPP:单株有效根瘤数; SERNW:单颗有效根瘤重; RND:根瘤直径; NITC:被感染根瘤细胞数量; NA:固氮酶活性; NFA:固氮量; AGSE:地上共生效应; UGSE:地下共生效应; AGDW:地上干重; UGDW:地下干重; AGTNA:地上氮积累量; UGTNA:地下氮积累量; CPY:粗蛋白产量; NDFY:中性洗涤纤维产量; ADFY:酸性洗涤纤维产量; GI:饲草分级指数。图中*, **和***分别表示在 0.05, 0.01 和 0.001 水平下差异显著。(a) shows the correlation analysis of symbiotic nitrogen fixation effect indexes of all tested alfalfa inoculated with rhizobia QL2; (b) shows the correlation analysis of symbiotic nitrogen fixation effect indexes of alfalfa varieties inoculated with rhizobia QL2 in China; (c) shows the correlation analysis of symbiotic nitrogen fixation effect index of alfalfa varieties introduced from abroad and inoculated with rhizobia QL2; (d) shows the correlation analysis of symbiotic nitrogen fixation effect indexes of local alfalfa varieties introduced from abroad and inoculated with rhizobia QL2. NFP: Nitrogen fixation percentage; SNF: Symbiotic nitrogen fixation; NERNPP: Number of effective root nodules per plant; SERNW: Single effective root nodule weight; RND: Root nodule diameter; NITC: The number of infected nodule cells; NA: Nitrogenase activity; NFA: Nitrogen fixation amount; AGSE: Aboveground symbiotic effect; UGSE: Underground symbiotic effect; AGDW: Aboveground dry weight; UGDW: Underground dry weight; AGTNA: Aboveground nitrogen accumulation; UGTNA: Underground nitrogen accumulation; CPY: Crude protein yield; NDFY: Neutral detergent fiber yield; ADFY: Acid detergent fiber yield; GI: Forage grading index. In the figure, *, ** and *** represent significant differences at 0.05, 0.01 and 0.001 levels, respectively.

3.3 接种根瘤菌对不同品种紫花苜蓿营养品质的影响

氮素是构成植物叶绿素、蛋白质、核酸以及激素等成分的重要元素之一,在豆科植物生长发育过程中发挥重要作用^[36]。即接种根瘤菌对植株产生有效固氮,可能会促进紫花苜蓿营养物质的积累。产量的提高,是同化物积

累的结果,品质的改善,是同化物在不同物质间转化的结果^[37]。而营养成分是反映紫花苜蓿品质的关键指标,其中CP含量高,NDF含量、ADF含量低的苜蓿营养价值高;反之,则营养价值低^[38],本研究表明接种根瘤菌QL2后,8个紫花苜蓿品种的NDF与ADF含量均有所降低,NDF最大降低了26.01%,ADF最大降低了39.76%。韩华雯等^[39]的研究结果显示,接种根瘤菌可以降低苜蓿NDF和ADF的含量。CP含量除甘农9号和WL319HQ,其余品种均有显著提高,共生固氮效应较强的组合可以将大量转化的氮提供给苜蓿植株^[33],促进其营养物质的积累,粗蛋白含量也会随之升高,而粗蛋白含量的高低直接关系到苜蓿品种的商品等级和经济价值,相对而言粗蛋白含量越高则该品种品质越好^[40]。曹克璠等^[41]研究表明,紫花苜蓿接种高效根瘤菌后CP含量会有显著提高。GI分级能更直接清晰地评定苜蓿营养价值。GI数值越高,则表明苜蓿的营养品质越好。

有研究表明,GI与CP含量呈显著正相关,与NDF和ADF含量呈显著负相关^[42-44]。本研究中,8个不同品种紫花苜蓿在接种根瘤菌QL2后,GI等级均有提升,说明接种根瘤菌可以相对提高CP含量,降低NDF和ADF含量,提高饲草等级。从整体相关性来看,营养物质的产量与固氮率、地上干重均显著正相关。而从品种类型分析看,我国育成型与国外引进型的固氮率和地上干重与CP、NDF和ADF的产量均显著正相关,但地方型品种的固氮率与地上干重仅与CP产量存在显著正相关,与NDF和ADF产量无显著相关性,其原因可能为植株从根瘤获得氮后,对氮素的分配会因品种类型出现差异,而这种差异会导致营养物质的产量出现不同。

以上研究均从共生固氮和促生效应两个方面对8个紫花苜蓿品种进行了评价,本研究仅对8个共生固氮组合最终呈现效果进行了研究与分析,但紫花苜蓿与根瘤菌形成的共生体系中还有很多“微妙”的调节渠道以及方式会影响最终结果,这有待进一步探索研究。

4 结论

接种根瘤菌QL2后,我国育成的紫花苜蓿品种在结瘤能力上显著优于国外引进和地方品种,国外引进和我国育成品种的固氮能力大于地方品种。而固氮因子对地上干重的贡献率远大于结瘤因子,且不同紫花苜蓿品种接种根瘤菌后,饲草等级均有1~2级提升。因此接种匹配性高,能产生强固氮效应的根瘤菌对紫花苜蓿的产量提升和饲草营养品质改善方面可发挥更为关键的作用。

参考文献 References:

- [1] Liu W W. Evaluation of germplasm resources and identification of new germplasms in alfalfa. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2013.
刘伟伟. 紫花苜蓿种质资源评价及新种质的鉴定. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- [2] Jia X T. Study on genetic diversity and DUS test characteristics of alfalfa germplasms. Lanzhou: Lanzhou University, 2023.
贾喜涛. 苜蓿种质资源遗传多样性及DUS测试性状研究. 兰州: 兰州大学, 2023.
- [3] Sun W B. Comprehensive evaluation of 20 alfalfa varieties in different ecological environment and comparison of nutrition characteristics among different growth stages. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2016.
孙万斌. 不同生境下20个紫花苜蓿品种的综合评价及不同生育期营养特性的比较. 兰州: 甘肃农业大学, 2016.
- [4] Tormozin M A, Cherniavskih V I, Sajfutdinova L D, *et al.* Ecological study of alfalfa varieties of different geographical origin in the south of the central Russian upland. *Russian Agricultural Sciences*, 2023, 49(2): 140–145.
- [5] Shi S L, Nan L L, Smith K F. The current status, problems, and prospects of alfalfa (*Medicago sativa* L.) breeding in China. *Agronomy*, 2017, 7(1): 1.
- [6] Ladha J K, Peoples M B, Reddy P M. Biological nitrogen fixation and prospects for ecological intensification in cereal-based cropping systems. *Field Crops Research*, 2022, 283: 108541.
- [7] Meng J. Effects of inoculating different rhizobia on growth and seed yield of alfalfa. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2021.
孟捷. 接种不同根瘤菌对苜蓿生长和种子产量的影响. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2021.
- [8] Gu C M, Huang W, Li Y, *et al.* Green manure amendment can reduce nitrogen fertilizer application rates for oilseed rape in maize-oilseed rape rotation. *Plants*, 2021, 10: 2640.
- [9] Kassaw T K. Molecular genetics of nodule number regulation: Cloning, characterization and functional studies of the root

- determined nodulator1 (*RDN1*) gene in *Medicago truncatula*. Clemson: South Carolina Clemson University, 2012.
- [10] Shi M L, Deng B, Liu Z K, *et al.* Inoculation effects of five rhizobial stains to alfalfa. *Pratacultural Science*, 2015, 32(1): 101–106.
石茂玲, 邓波, 刘忠宽, 等. 5株根瘤菌接种紫花苜蓿的效果. *草业科学*, 2015, 32(1): 101–106.
- [11] Nutman P S. Varietal differences in the nodulation of subterranean clover. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1967, 18(3): 381–425.
- [12] Chen L Y, Zhang L J, Zhou Z Y. Research of salt tolerable rhizobia inoculation effects on *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2008, 17(5): 43–47.
陈利云, 张丽静, 周志宇. 耐盐根瘤菌对紫花苜蓿接种效果的研究. *草业学报*, 2008, 17(5): 43–47.
- [13] Pan J, Fan Y, Li R, *et al.* Screening of high efficient symbiotic rhizobium for *Medicago sativa* cv. Gannong No. 3 and *M. sativa* cv. Longdong. *Pratacultural Science*, 2016, 33(8): 1536–1549.
潘佳, 范燕, 李荣, 等. 甘农3号和陇东苜蓿高效共生根瘤菌菌株的筛选. *草业科学*, 2016, 33(8): 1536–1549.
- [14] Kang W J. Biotype classification of *Medicago sativa* rhizobia and its transcriptome analysis. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2019.
康文娟. 紫花苜蓿根瘤菌生物型划分及其转录组学分析. 兰州: 甘肃农业大学, 2019.
- [15] Zhang S Q, Li J F, Shi S L. The relationship between developmental processes of reproductive organs and infection quantity of endogenous rhizobia. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2009, 25(5): 997–1001.
张淑卿, 李剑峰, 师尚礼. 苜蓿繁殖器官发育过程与内生根瘤菌感染数量的关系. *江苏农业学报*, 2009, 25(5): 997–1001.
- [16] Zeng Z H, Sui X H, Hu Y G, *et al.* Screening of highly-effective *Sinorhizobium meliloti* strains for *Medicago sativa* cultivars and their field inoculation. *Acta Prataculturae Sinica*, 2004, 13(5): 95–100.
曾昭海, 隋新华, 胡跃高, 等. 紫花苜蓿—根瘤菌高效共生体筛选及田间作用效果. *草业学报*, 2004, 13(5): 95–100.
- [17] Wang L L. Molecular mechanism of leghemoglobin in controlling efficient nodule symbiotic nitrogen fixation. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
王龙龙. 豆血红蛋白调控根瘤菌高效固氮的分子机制研究. 武汉: 华中农业大学, 2019.
- [18] Zhou N, Li W, Wu Z, *et al.* Sequential extractions: A new way for protein quantification-data from peanut allergens. *Analytical Biochemistry*, 2015, 484: 31–36.
- [19] Ma C, Liu C Y, Yu Y Y, *et al.* GmTNRP1, associated with rhizobial type-III effector NoPT, regulates nitrogenase activity in the nodules of soybean (*Glycine max*). *Food Energy Security*, 2023, 12(4): e466.
- [20] Shi S L. The analysis for factors that affect the ability of growth promotion of alfalfa rhizobia in cold and drought regions and screening of high efficient strains. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2005.
师尚礼. 甘肃寒旱区苜蓿根瘤菌促生能力影响因子分析及高效促生菌株筛选研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2005.
- [21] Zhang L Y. Feed analyses and quality test (second edition). Beijing: China Agricultural University Press, 2006; 1615–1622.
张丽英. 饲料分析及饲料质量检测技术(第2版). 北京: 中国农业大学出版社, 2006; 1615–1622.
- [22] Zhang J K, Lu D X, Liu J X, *et al.* The present research situation and progress of crude fodder quality evaluation index. *Pratacultural Science*, 2004, 21(9): 55–61.
张吉鹏, 卢德勋, 刘建新, 等. 粗饲料品质评定指数的研究现状及其进展. *草业科学*, 2004, 21(9): 55–61.
- [23] Li J, Cui J J, Yu L L, *et al.* Research the quality on whole-plant corn silage in Jidong area. *China Feed*, 2021(7): 131–134.
李娟, 崔婧婧, 于玲玲, 等. 冀东地区全株玉米青贮饲料品质研究. *中国饲料*, 2021(7): 131–134.
- [24] Li Y G, Zhou J C. Root colonization and nodulation of *Sinorhizobium fredii* HN01DL in *Glycine max* rhizosphere. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2003, 14(8): 1283–1286.
李友国, 周俊初. 费氏中华根瘤菌HN01DL在大豆根圈的定殖动态与结瘤研究. *应用生态学报*, 2003, 14(8): 1283–1286.
- [25] He L. The study of symbiotic nitrogen fixation effect of alfalfa varieties and rhizobium strains. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2023.
何龙. 紫花苜蓿品种—根瘤菌株共生固氮效应研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2023.
- [26] Chen G. Study on *lrp* gene of *Sinorhizobim fredii* HNO1. Nanning: Guangxi University, 2007.
陈钢. 费氏中华根瘤菌HNO1 *lrp*基因的研究. 南宁: 广西大学, 2007.
- [27] Kang J M, Zhang L J, Guo W S, *et al.* Screening of high efficient symbiotic rhizobium for Zhongmu No. 1 alfalfa. *Acta Agrestia Sinica*, 2008, 16(5): 497–500.
康俊梅, 张丽娟, 郭文山, 等. 中苜1号紫花苜蓿高效共生根瘤菌的筛选. *草地学报*, 2008, 16(5): 497–500.

- [28] Gibson A H, Curnow B C, Bergersen F J, *et al.* Studies of field populations of rhizobium: Effectiveness of strains of rhizobium trifolii associated with *Trifolium subterraneum* L. pastures in South-Eastern Australia. *Soil Biology and Biochemistry*, 1975, 7: 95–102.
- [29] Zhan J S, Liu M M, Zhao G Q. Effects of flavonoids and their application in ruminants. *China Feed*, 2014(23): 13–15.
古今舜, 刘明美, 赵国琦. 黄酮的作用及其在反刍动物上的应用. *中国饲料*, 2014(23): 13–15.
- [30] Liu Y H, Chen Y, Li H G, *et al.* Regulation of nitrogen application rate on nodulation, nitrogen fixation, yield, and crude protein content of different alfalfa varieties. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2024(6): 186–198.
刘雨涵, 陈杨, 李海港, 等. 施氮量对不同品种苜蓿结瘤固氮和产量及粗蛋白含量的调控. *中国土壤与肥料*, 2024(6): 186–198.
- [31] Ma X, Wang L L, Li W J, *et al.* Effects of different nitrogen levels on nitrogen fixation and seed production of alfalfa inoculated with rhizobia. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(1): 95–102.
马霞, 王丽丽, 李卫军, 等. 不同施氮水平下接种根瘤菌对苜蓿固氮效能及种子生产的影响. *草业学报*, 2013, 22(1): 95–102.
- [32] Lamouche F, Bonadé -Bottino N, Mergaert P, *et al.* Symbiotic efficiency of spherical and elongated bacteroids in the *Aeschynomene-Bradyrhizobium* symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 377.
- [33] Guo P, Wang J Y, Shi X L, *et al.* Effects of nitrogen application rate on nodule characteristics and nitrogen utilization in different peanut genotypes. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2022, 53(4): 385–393.
郭佩, 王佳艺, 史晓龙, 等. 施氮量对不同基因型花生结瘤特性及氮素利用的影响. *沈阳农业大学学报*, 2022, 53(4): 385–393.
- [34] Awodele S O, Bennett J A. Soil biota legacies of alfalfa production vary with field conditions and among varieties and species. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2022, 335: 107994.
- [35] Zhang F, Li Y M, Dong S K, *et al.* Research progress on asymbiotic nitrogen-fixing microorganisms in grassland soil. (2024-07:24)[2025-02-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1069.S.20240723.1724.004.html>.
张凤, 李耀明, 董世魁, 等. 草地土壤非共生固氮微生物研究进展. (2024-07:24)[2025-02-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/62.1069.S.20240723.1724.004.html>.
- [36] Ma X F, Gao M, Cheng Z J. Molecular regulation for uptake and utilization of nitrogen in plant. *The Crop Journal*, 2013(4): 32–38.
马雪峰, 高旻, 程治军. 植物氮素吸收与利用的分子机制研究进展. *作物杂志*, 2013(4): 32–38.
- [37] Kou J T, Shi S L, Cai Z S. Effects of ridge and furrow rainfall harvesting on growth characteristics and quality of *Medicago sativa* in dryland. *Agricultural Sciences in China*, 2010, 43(24): 5028–5036.
寇江涛, 师尚礼, 蔡卓山. 垄沟集雨种植对旱作紫花苜蓿生长特性及品质的影响. *中国农业科学*, 2010, 43(24): 5028–5036.
- [38] Ma Y J, Quan J P, Gan H L, *et al.* Assessment of the impact of rhizobial inoculation on production performance and nutritional value of different varieties of purple alfalfa. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2024, 43(1): 27–33.
马垭杰, 权金鹏, 甘辉林, 等. 接种根瘤菌对不同品种紫花苜蓿生产性能及营养价值的影响评价. *畜牧兽医杂志*, 2024, 43(1): 27–33.
- [39] Han H W, Sun L N, Yao T, *et al.* Effects of bio-fertilizers with different PGPR strain combinations on yield and quality of alfalfa. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 22(5): 104–112.
韩华雯, 孙丽娜, 姚拓, 等. 不同促生菌株组合对紫花苜蓿产量和品质的影响. *草业学报*, 2013, 22(5): 104–112.
- [40] Luo J J, Xiao Y Z, Hou M L, *et al.* Effects of different additives on quality and vitamin content of mixed silage of alfalfa and *Leymus chinensis*. (2024-11-28) [2025-02-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3362.S.20241128.0906.002.html>.
罗俊杰, 肖燕子, 侯美玲, 等. 不同添加剂对苜蓿与羊草混合青贮品质及维生素含量的影响. (2024-11-28) [2025-02-01]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3362.S.20241128.0906.002.html>.
- [41] Cao K F, Liu J W, Suo R Z, *et al.* Effect of rhizobia inoculation on nodule nitrogen fixation and growth of ‘Mengnong Clover No. 1’. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(12): 3876–3886.
曹克璠, 刘嘉伟, 索荣臻, 等. 接种根瘤菌对‘蒙农三叶草1号’结瘤固氮及生长的影响. *草地学报*, 2023, 31(12): 3876–3886.
- [42] Wang L R, Wang W, Pu X J, *et al.* Comprehensive evaluation of production performance and feed quality of 19 alfalfa varieties in Qaidam Basin. *Acta Agrestia Sinica*, 2023, 31(10): 3136–3144.

- 王龙然, 王伟, 蒲小剑, 等. 柴达木盆地 19 个紫花苜蓿品种生产性能和饲用品质综合评价. 草地学报, 2023, 31(10): 3136-3144.
- [43] Wang X L, Li H, Mi F G, *et al.* Comparison of production performance and winter survival rate of different fall dormancy alfalfa varieties. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(6): 82-92.
- 王晓龙, 李红, 米福贵, 等. 不同休眠级苜蓿生产性能及越冬率评价. 草业学报, 2019, 28(6): 82-92.
- [44] Peng Y, Ma S J, De J, *et al.* Comparative analysis of identification and quality of 3 (*Medicago Sativa*) species in Nyingchi. Journal of Plateau Agriculture, 2019, 3(1): 76-83.
- 彭艳, 马素洁, 德吉, 等. 林芝不同紫花苜蓿(*Medicago Sativa*)栽培品种鉴定及品质研究. 高原农业, 2019, 3(1): 76-83.