

腐熟牛粪对紫花苜蓿根瘤的促生效应

朱瑞芬^{1,2},刘畅²,冉启凡²,马慧珍²,范彦²,师尚礼^{1*}

(1. 甘肃农业大学草业学院,草业生态系统教育部重点实验室,甘肃省草业工程实验室,中-美草地畜牧业可持续发展研究中心,甘肃 兰州 730070;2. 重庆市畜牧科学院草业研究所,重庆 荣昌 402460)

摘要:【目的】揭示提高紫花苜蓿共生结瘤率和固氮效率的机制。【方法】通过腐熟牛粪不同量添加处理对紫花苜蓿促生能力进行研究,以甘农9号为试验材料,以添加腐熟牛粪(不同添加量)为处理,进行生产性能和结瘤指标的测定,129 g牛粪/盆表现出最佳促生效果。进一步将腐熟牛粪浸提处理,将获得的粪渣、浸提液与全牛粪添加进行紫花苜蓿室内盆栽控制试验,通过生产性能和结瘤指标比较各处理促生效果。【结果】粪渣对紫花苜蓿根瘤的促生效应最强(根瘤数($P<0.05$)、有效根瘤数($P<0.05$)、根瘤重($P<0.05$)、最大根瘤重($P<0.05$)、侵染数($P<0.05$)、侵染区长度($P<0.05$))。典范对应分析(CCA)表明,全牛粪、粪渣所含养分对结瘤指标具正向的解释作用;特别在粪渣处理中,C/N与最大根瘤重呈极显著正相关($P<0.01$),与总根瘤数、总根瘤重呈显著正相关($P<0.05$);速效P含量与包括根系侵染数的结瘤指标均呈显著正相关($P<0.05$);不同处理的养分对紫花苜蓿结瘤指标的总解释量达到95.6%。【结论】C/N和速效P含量是调控紫花苜蓿根瘤发育及促生能力的关键因素。

关键词:紫花苜蓿;腐熟牛粪;碳氮比;根瘤菌;结瘤

中图分类号:S541.9 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2025)01-0015-10

DOI:10.13817/j.cnki.cyycp.2025.01.003



畜禽饲养企业废弃物排放是我国农业污染的主要来源之一,随着畜牧业的高速发展,畜禽粪便处理技术亟待解决。养殖业发展初期,人们对养殖废弃物无害化处理及后续环保问题的重视程度不高,随意排放造成环境污染;同时未被合理利用的畜禽粪便也造成较大的资源浪费^[1]。2017年农业部公布当年我国畜禽养殖业的污染物排泄量达到38亿吨,这些排泄物的综合利用效率低于60%^[2]。

将畜禽粪便堆肥发酵腐熟是目前常用的一种畜禽粪便无害化处理方式,该方式成本低、可操作性较

强、发展前景较好^[3]。堆肥过程中微生物剧烈的代谢活动大幅度提升堆肥温度可灭杀畜禽粪便中的病原菌、分解有机物,将其转化为绿色、安全、环保的有机肥产品^[4]。畜禽粪便有机肥养分充足、富含腐殖质,可提高作物产量;还可改良土壤,改善土壤微生态,从而促进植物生长发育、增加产量,提高植物经济效益^[5-6]。孙世超^[7]对大豆(*Glycine max*)施用生物有机肥后,其茎粗、根数、根长和根瘤数均显著提高,并且缩短了生育期。紫花苜蓿(*Medicago sativa*)为多年生豆科植物,因其特殊的营养价值在我国畜牧业发展、尤其是奶牛养殖中具有难以替代的地位。在大规模的人工草地生产过程中,为满足作物正常生长对养分的需求,通常需要施肥补充土壤养分,但长期的化肥使用会导致一系列土壤环境恶化问题。王娜^[8]对紫花苜蓿施用污泥有机肥,紫花苜蓿株高、茎粗、叶面积显著增加。杨何宝等^[9]发现铁尾矿砂基质中施用有机肥能明显促进苜蓿生长。李凤霞等^[10]比较不同改良剂对盐碱地中苜蓿产量的影响,结果表明有机肥的促生

收稿日期:2022-06-14; **修回日期:**2022-09-15

基金资助:重庆市科研院所绩效激励引导专项(22525J);
重庆市畜牧科技研究与推广项目(21521)

作者简介:朱瑞芬(1982-),女,甘肃礼县人,博士,研究方向为豆科植物根瘤菌。

E-mail: zhurui fen1983@aliyun.com

*通信作者,研究方向为草类育种与栽培学。

E-mail: Shishl@gsau.edu.cn

作用最为显著。牛粪含有多种矿物质元素,如碳、氮、钙、磷等,将其腐熟后还田,可以有效培肥地力、提高作物品质、改善化肥使用过量的问题,而且其富含有机质可改良土壤,所以腐熟牛粪的使用可以实现经济及生态效益双丰收^[11-14]。但目前关于腐熟牛粪对提高紫花苜蓿根瘤菌感染率、促进根瘤后期生长发育方面的研究还未见报道。

在前期的科研工作中发现牛粪的施用会明显促进苜蓿根瘤的生长,提高有效根瘤的比例。取样发现在牛粪还田后,当年种植的苜蓿根瘤直径最大可达到1.1 cm(鲜重0.280 0 g,干重0.103 0 g);8月中旬大田调查根瘤均为粉红色有效根瘤(未发表)。本试验通过将腐熟干牛粪浸提和组分分解处理,旨在探讨牛粪不同组分营养成分对紫花苜蓿结瘤的促生效应。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试苜蓿品种为甘农5号紫花苜蓿(*Medicago sativa* cv. Gannong No. 5)。供试牛粪从河南广人农业开发有限公司小刘固农场购入,腐熟牛粪原料为纯黑白花奶牛牛粪。盆栽河沙从当地花鸟市场购入,清水洗净自然晾干。回接所用根瘤菌菌株为试验室从甘农5号紫花苜蓿种子中分离纯化获得的种携根瘤菌。

1.2 不同剂量全牛粪添加

按量称取牛粪后敲碎,与洗净晾干的河沙混匀装入花盆,每盆浇入无菌水700 mL。花盆上底内径0.2 m、下底内径0.13 m、高0.13 m,花盆容积0.002 8 m³,花盆上底面积0.031 4 m²。沙子用量3.5 kg/盆。根据农业生产中常规的牛粪施肥范围^[15-16]按花盆上底面积换算,设置不同有机肥添加量梯度:97 g/盆(30 t/hm²),106 g/盆(33.75 t/hm²),118 g/盆(37.5 t/hm²),129 g/盆(41.25 t/hm²),141 g/盆(45 t/hm²),153g/盆(48.75 t/hm²),165 g/盆(52.5 t/hm²),177 g/盆(56.25 t/hm²),188 g/盆(60 t/hm²)。共设9个处理(梯度),每个处理3盆。

挑选籽粒饱满、健康的苜蓿种子数粒,在生物安全柜内用碘伏溶液(有效碘含量0.45%~0.55%(W/V))震荡灭菌3 min,用无菌水冲洗5~6次,晾干。待水完全渗入河沙后,将种子植入花盆,播种量为10株/盆。播种深度为3 cm,待种子完全出苗后根据生

产田中苜蓿330万株/hm²折合花盆面积间苗至8株/盆。培养条件为光照度7 000~8 000 lx,光照时间16 h/d,有光照时温度21~25 °C,无光照时温度16~20 °C,相对湿度50%~70%。

将保存的根瘤菌株接入YMA平板培养基活化24 h。再转入YMA液体培养基,160 r/min、28 °C摇床培养至光密度值($D_{600\text{nm}}$ 值) ≥ 0.5 时,10 000 r/min离心10 min,抛去上清液后用无菌水洗下菌体,摇匀打散后用无菌水将菌液配制成 $D_{600\text{nm}}$ 值为0.5的菌悬液。在播种当天及出苗第3、7、15天时,每盆浇入根瘤菌液30 mL。后期正常温室管理措施。

1.3 适宜剂量下牛粪组分添加

试验共设对照(CK)、全牛粪、粪渣、浸提液4个处理。

牛粪前期处理:处理分为全牛粪、粪渣、浸提液3个处理。其中粪渣、浸提液处理方法为以全牛粪的每盆添加量将全牛粪与无菌水以1:6比例浸泡,24 h后固液分离,再分别放入两个花盆中,是为粪渣、浸提液处理。浸泡过程保持低温,每1 h搅拌一次保证混合均匀。固体部分为粪渣,液体部分为浸提液。

盆栽种植:将河沙洗净,pH调至中性后烘干。冷却后等量装入直径18 cm塑料花盆中。根据不同处理分别加入全牛粪、粪渣、浸提液,CK浇入全氮营养液。牛粪添加量为129 g/盆(全牛粪、粪渣在播种前需与河沙充分搅拌均匀)。每盆浇水700 mL(全牛粪每盆浇无菌水700 mL,浸提液每盆浇浸提液700 mL,粪渣每盆浇无菌水650 mL,CK每盆浇全氮营养液650 mL+无菌水50 mL)。

种子处理方式、播种量、播种方式、菌液制备、回接及日常管理同文中1.1。

1.4 取样方式及测量指标

植株生长90 d时进行取样。将盆栽从花盆中完整倒出,在流水下冲洗沙子直至根部完全露出,将植株用保鲜膜包好低温保存带回实验室测定各项指标。

生产性能测定:地上鲜重、株高、地下鲜重、根长;单株根瘤数、单株根瘤重、单株最大根瘤重、感染数、感染区长度;侧根数(一级侧根、二级侧根)。

侧根测量方法:一级侧根为主根上部分(1/2)侧根;二级侧根测量方法为随机选择1条一级侧根上的所有二级侧根数,一般为第1根。

侵染区定义:根部上侵染最丰富的区域^[17]。侵染区测量方法:侵染区是接种时根尖上方的区域,这是根部的主要侵染区域^[18]。因为根瘤菌只能侵染根的特有部分,因此在调查结瘤能力时侵染区长度可能比根总长度更能表现结构。确定侵染区域边缘的方法为3 mm内无明显其他侵染。侵染数是指有根瘤着生的根的数量。

牛粪理化性质:将全牛粪、粪渣、浸提液进行全效、速效养分及有机质测定。各指标测定方法参照有机肥测定国家标准。

2 结果与分析

2.1 不同剂量全牛粪添加对紫花苜蓿生产性能与结瘤指标的影响

在9个不同梯度的添加量下,紫花苜蓿的生产性能和结瘤能力表现出显著差异($P<0.05$) (表1)。129 g全牛粪添加后植株的株高显著高于97、106、141、153、165、177、188 g添加量($P<0.05$),但与118 g添加无显著差异。地上生物量比较,129 g添加量下显

著高于97、106、118、141、165、177、188 g($P<0.05$),但与153 g剂量无显著差异;同时,小剂量牛粪添加后的地上生物量与大剂量牛粪添加下的植株地上生物量也有显著差异($P<0.05$),大剂量添加后的植株地上生物量显著低于小剂量牛粪添加下的植株地上生物量($P<0.05$),这说明高剂量下腐熟牛粪对植物生长有较为严重的抑制作用。不同剂量添加后的根长比较显示,129处理下根长显著高于97、106、118 g这3个低剂量牛粪添加量($P<0.05$),但与141、153 g这2个中间剂量添加无显著差异,同时也显著高于165、177、188 g这3个高剂量添加($P<0.05$);这说明在一定范围内腐熟牛粪添加量稍高对植株根长不会产生显著影响。地下生物量分析,129 g牛粪添加后植株的地下生物量积累显著高于其他剂量牛粪添加($P<0.05$);在97、106、118 g 3个小剂量和141、153 g 2个中间剂量牛粪添加时,地下生物量积累差异不显著;但当牛粪添加量到165、177、188 g这3个高剂量时,地下生物量显著下降($P<0.05$),说明高剂量牛粪添加对植物根的生长有明显抑制作用。

表1 不同处理后腐熟牛粪对紫花苜蓿生产性能比较

Table 1 Comparison of production performance of alfalfa treated with different decomposed cow manure

指标	CK	浸提液 Y	粪渣 Z	全牛粪 Q
株高/cm	8.16±2.38 ^e	11.19±1.77 ^c	33.75±1.85 ^a	27.64±2.16 ^b
地上鲜重/g	0.3002±0.0396 ^e	0.7305±0.0564 ^e	5.7402±0.2713 ^a	5.0026±0.2603 ^b
地上干重/g	0.0683±0.0078 ^d	0.3439±0.0257 ^c	1.106±0.0733 ^a	0.9434±0.0442 ^b
根长/cm	25.50±0.66 ^b	28.31±1.24 ^a	22.09±0.86 ^c	17.90±0.80 ^d
地下鲜重/g	0.8117±0.0362 ^e	2.0209±0.0428 ^b	2.6408±0.1759 ^a	2.4029±0.1856 ^a
地下干重/g	0.1243±0.0059 ^d	0.3536±0.0141 ^e	0.6633±0.0339 ^a	0.5574±0.0397 ^b
一级侧根数/个	28.33±0.94 ^c	35.89±0.89 ^b	67.25±1.96 ^a	12.75±0.92 ^d
二级侧根数/个	2.11±0.84 ^d	10.78±1.01 ^c	19.88±0.79 ^b	38.63±1.75 ^a
总侧根数/个	30.44±1.46 ^d	46.67±0.97 ^c	87.13±2.08 ^a	51.38±1.90 ^b

注:表内数据为平均值±标准误,不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

根瘤数与根瘤重对牛粪添加剂量最为敏感。单株最大根瘤重在129 g牛粪添加时显著高于其他处理($P<0.05$);稍高剂量141 g和稍低剂量118 g添加剂量下的单株最大根瘤重显著高于低剂量97、106 g和较高剂量153、165 g添加后的单株最大根瘤重($P<0.05$),177、188 g两个大剂量添加后的单株最大根瘤重,显著低于其他各处理($P<0.05$)。从单株总根瘤

数上看,129g添加处理下的植株总根瘤数显著高于其他添加剂量($P<0.05$);低剂量与中剂量处理后的植株总根瘤数之间差异不显著,高剂量177、188 g添加后的植株总根瘤数显著低于低剂量处理下的总根瘤数($P<0.05$)。

2.2 不同牛粪处理对生产性能及结瘤指标的影响

4个不同处理对紫花苜蓿生产性能影响显著($P<$

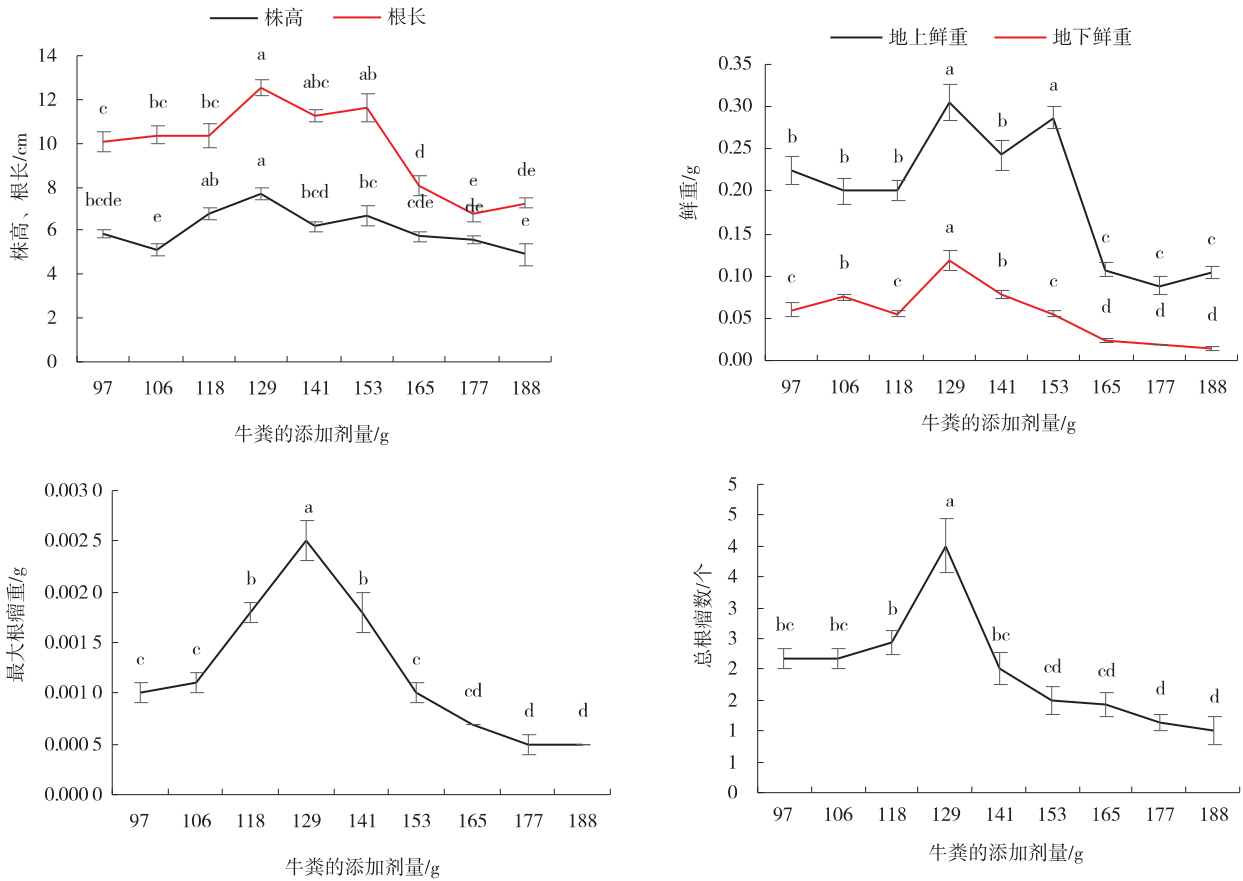


图1 不同剂量腐熟牛粪施入后生产性能及结瘤指标折线图

Fig. 1 Biological Index and nodulation index curve of different dosages of decomposed cow manure added

0.05)(表1)。全牛粪、粪渣处理下株高显著高于浸提液处理与CK($P < 0.05$),但全牛粪与粪渣处理之间,浸提液与CK之间无显著差异。地上鲜重对不同处理的响应与株高类似,全牛粪与粪渣处理的地上生物量显著高于浸提液处理与CK($P < 0.05$),但全牛粪与粪渣处理间无显著差异。同样,地上干重对全牛粪添加与粪渣添加的响应二者之间无显著差异,但他们都显著高于浸提液处理与CK($P < 0.05$)。

粪渣处理下一级侧根数显著高于全牛粪添加处理与浸提液处理及CK($P < 0.05$),浸提液处理与CK的一级侧根数无显著差异,但二者显著高于全牛粪添加后的植株一级侧根数($P < 0.05$)(表2)。4个不同处理下的二级侧根数具有显著差异($P < 0.05$);其中二级侧根数最多的是全牛粪添加,显著高于其他3个处理($P < 0.05$);其次是粪渣添加处理,显著低于全牛粪处理且显著高于浸提液添加与CK($P < 0.05$);浸提液添加后的二级侧根数与CK相比仍有显著差异($P < 0.05$)。

2.3 不同牛粪处理对结瘤指标(侵染数、侵染区长度、单株最大根瘤重、单株根瘤数、单株根瘤重)的影响

侵染数差异性分析结果表明,粪渣添加处理后根瘤菌对紫花苜蓿根的侵染数显著高于全牛粪添加、浸提液添加处理及CK($P < 0.05$),三者之间无显著差异。侵染区长度在全牛粪添加、粪渣添加、浸提液添加及CK之间无显著差异。豆科植物固氮能力主要是因为豆血红蛋白的存在,血红蛋白导致根瘤呈现粉色或粉褐色,有血红蛋白存在的根瘤我们认为是有效根瘤。选取紫花苜蓿主根、一级侧根、二级侧根上粉色根瘤和粉褐色根瘤总数进行比较(表2)。不同处理下根瘤总数差异显著($P < 0.05$),粪渣添加处理下的根瘤数显著高于全牛粪添加、浸提液添加处理及CK的根瘤数($P < 0.05$);全牛粪添加处理下的植株有效根瘤数显著低于粪渣添加处理、高于浸提液添加处理及CK($P < 0.05$);浸提液添加处理下的有效根瘤数与

CK无显著差异。对不同处理下的总根瘤重进行比较,粪渣添加依然表现出显著的促生效应($P<0.05$),其趋势与总根瘤数相似;粪渣添加处理后的紫花苜蓿总根瘤重显著高于全牛粪添加、浸提液添加及CK处理($P<0.05$),全牛粪添加处理下的总根瘤重显著高于浸提液添加处理及CK处理($P<0.05$),而浸提液添加处理与CK无显著差异。选取每个植株最大的根瘤进行差异性分析,结果表明,不同处理下的最大根瘤

重在粪渣添加处理后最高,但粪渣添加处理与全牛粪添加处理间无显著差异;浸提液添加处理与CK的最大根瘤重显著低于全牛粪添加和粪渣添加处理($P<0.05$)。总根瘤重与最大根瘤重有类似趋势,粪渣处理下紫花苜蓿的总根瘤重高于其他3个处理,但与全牛粪添加后的单株根瘤总重无显著差异,粪渣添加处理和全牛粪添加处理的单株根瘤总重显著高于浸提液添加处理和CK($P<0.05$)。

表2 不同处理腐熟牛粪对紫花苜蓿结瘤指标促生效应比较

Table 2 comparison of growth-promoting effects of decomposed cow manure with different treatments on root nodule characteristic index of Alfalfa

	对照CK	浸提液Y	粪渣Z	全牛粪Q
侵染数/个	1.78±0.22 ^c	1.00±0.24 ^c	6.63±0.42 ^a	3.50±0.27 ^b
侵染区长度/cm	0.49±0.11 ^b	0.22±0.22 ^c	1.53±0.13 ^a	1.35±0.56 ^{ab}
单株最大根瘤重/g	0.0021±0.0001 ^c	0.0005±0.0001 ^c	0.035±0.0035 ^a	0.0167±0.0016 ^b
单株根瘤数/个	2.33±0.47 ^c	1.00±0.53 ^c	13.00±0.5 ^a	7.25±0.59 ^b
单株根瘤重/g	0.0029±0.0006 ^c	0.0009±0.0006 ^c	0.0736±0.0025 ^a	0.0321±0.0021 ^b

注:表内数据为平均值±标准误,不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。

2.4 牛粪养分及化学计量比与结瘤指标典范对应分析

全牛粪与粪渣的全氮、速效氮在二者之间无显著差异,但显著高于浸提液与CK($P<0.05$);全牛粪中的全磷含量显著高于粪渣含量,粪渣中的全磷含量也显著高于浸提液与CK中含量;全钾在全牛粪中的含量显著高于其他3个处理,但粪渣、浸提液、CK三者之

间无显著差异;速效钾在粪渣中含量显著显著低于全牛粪、浸提液和CK中的含量;速效磷在粪渣中的含量显著高于全牛粪、浸提液和CK中含量,三者之间无显著差异;粪渣和全牛粪机碳含量有机碳含量无显著差异,但显著高于浸提液和CK中的有机碳含量;粪渣的C/N比显著高于其他处理,全牛粪C/N显著高于浸提液与CK,浸提液与CK之间无显著差异。

表3 各处理下牛粪养分及化学计量比

Table 3 Description of soil chemical properties in the four different treatments

	N	P	K	AN	AK	AP	OC	C/N
对照CK	0.11 ^b	0.04 ^c	0.23 ^b	0.11 ^b	0.23 ^a	0.04 ^b	0.77 ^b	7.14 ^c
全牛粪Q	2.79 ^a	1.68 ^a	2.14 ^a	0.16 ^a	0.24 ^a	0.06 ^b	42.92 ^a	15.78 ^b
浸提液Y	0.11 ^b	0.02 ^c	0.14 ^b	0.02 ^b	0.23 ^a	0.04 ^b	0.77 ^b	7.33 ^c
粪渣Z	2.44 ^a	0.38 ^b	0.34 ^b	0.14 ^a	0.18 ^b	0.14 ^a	44.51 ^a	18.60 ^a

注:不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$);C/N为有机碳(OC)与全氮的比例,测定的各指标根据每盆牛粪添加量换算成每盆养分含量。

对不同处理牛粪添加后的结瘤指标与养分及化学计量比进行典型对应分析(canonical correspondence analysis, CCA)(图2)。基质养分对结瘤指标的总解释量达到95.6%。全牛粪、粪渣所含养分对结瘤指标具正向的解释作用。其中有机质含量、C/N与总根瘤数、总根瘤重和最大根瘤重3项结瘤指标呈显著

正相关($P<0.05$);C/N与最大根瘤重趋于同向重合,极显著正相关($P<0.01$);速效磷含量与植株的根系侵染数极显著相关($P<0.01$);与总根瘤数、总根瘤重和最大根瘤重显著正相关($P<0.05$)。在有机肥对根瘤的促生效应中,养分的C/N和速效磷含量有着关键性作用。

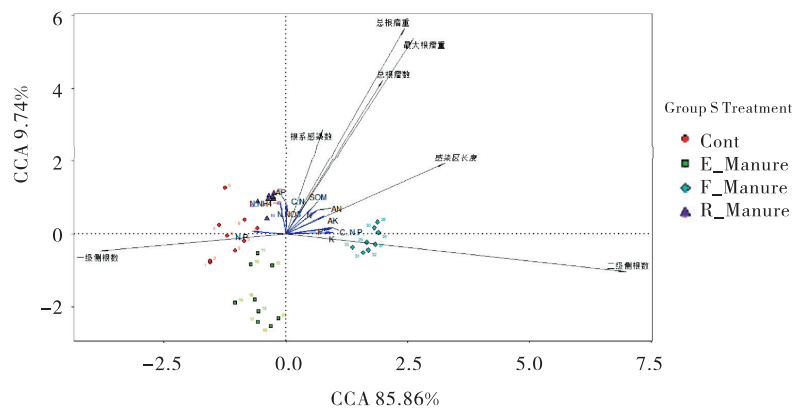


图2 结瘤指标与不同处理牛粪养分典型关联分析

Fig. 2 Canonical Correlation Analysis between nodule characteristic index and nutrient content of cow manure in different treatments

3 讨论

129 g 添加处理下的植株总根瘤数显著高于其他添加剂量;低剂量与中剂量处理后的植株总根瘤数之间差异不显著,高剂量添加后的植株总根瘤数显著低于低剂量处理下的总根瘤数。大剂量添加后的最大根瘤重显著低于其他各处理。在一定范围内有机肥添加量稍高对植株根长不会产生显著影响,高剂量有机肥添加对植物根的生长有明显抑制作用。这可能暗示结瘤指标对牛粪添加剂量最为敏感,有机肥过量后豆科植物的结瘤固氮能力要先于生产性能受到损害并表现出来,而生产性能对有机肥过量的反馈要稍微迟滞一些。

根瘤起始因子NIN(Nodule inception)与参与对硝酸盐反应的蛋白质有关^[19]。NIN及其靶核因子亚基基因NF-YA1和NF-YB1的异位表达会改变植物侧根原基的发育,并激活皮层细胞分裂进而促进根瘤器官发生^[20],这暗示NIN及其靶因子与根瘤发育和侧根发育同时相关。根瘤菌引起皮层细胞分化最终分裂成根瘤原基,以适应根瘤菌共生体。对百脉根的研究发现^[21],NIN调控侧器官边界结构域16a(ASL18/LBD16a),而ASL18/LBD16a在非豆科植物中的同源基因是侧根发育必需,ASL18a和CCAAT盒结合蛋白核因子-Y(NF-Y)亚单位的共表达可部分抑制百脉根突变体的结瘤缺陷表型;而当ASL18a在植株毛根中的表达受到抑制时,根瘤和侧根的发育也受到抑制。前人的这些研究都指向一种可能,即植物根瘤的发生与侧根的发生有一定的相关性。在本试验中,粪

渣添加处理下的紫花苜蓿一级侧根数显著高于全牛粪处理,而全牛粪添加处理下的二级侧根数显著高于粪渣处理,这一结果并未验证之前的研究;但是进一步将一级侧根和二级侧根相加,粪渣处理下的侧根总数要显著高于其他处理,这一结果与本研究中粪渣添加处理显著提高紫花苜蓿结瘤指标的结果契合,也侧面验证了前面的研究者提出的侧根也根瘤的发育在一定意义上同源的观点。

适宜剂量下的 NO_3^- -N和 NH_4^+ -N均可成为植物良好氮源^[22],但氮素形态对植物生理和发育的影响不同^[23-24]。氮素形态对作物生理代谢过程的影响,最终会在作物形态变化和产量形成上体现。硝态氮和铵态氮添加均会促进侧根的发生,但硝态氮会促进根系的生长^[25],而铵态氮却促进根系变粗而降低根系长度^[26];铵态氮下紫花苜蓿的根瘤数、根瘤重、固氮酶活性、根系全氮含量和生物量均高于硝态氮下培养^[27]。高氮条件下 NH_4^+ -N对大豆营养器官的促生效果最明显, NO_3^- -N则未表现出显著的促生效应;低氮会促进大豆根系的生长, NO_3^- -N优于 NH_4^+ -N^[28]。氮肥的过量使用会导致土壤中化合态氮浓度过高,进而影响根瘤菌对根毛的侵染,降低结瘤数量,抑制固氮酶活性,降低固氮效率,这种氮对豆科植物共生固氮的影响会随着菌株和宿主植物不同而发生变化。马霞等^[29]研究发现,当苜蓿施氮量超过 $50 \text{ kg}/\text{hm}^2$ 时根瘤菌结瘤会受到抑制,导致固氮量和生物量下降。蒯佳林等^[30]的研究结果显示,当氮素浓度超过 $105 \text{ mg}/\text{L}$ 时,虽然苜蓿的株高随着浓度的提高虽然仍有少量增加,但其对浓度的响应已不显著,而根长随氮素水平的提高而

受到抑制。当施肥水平超过一定合理值后^[31],苜蓿根长和根鲜重虽仍有一定程度的提高,但差异已不显著,同时根瘤重呈现下降趋势。本试验中,粪渣中的硝态氮与铵态氮含量都显著高于全牛粪($P<0.05$),而粪渣处理下的植株根瘤相关指标都显著优于全牛粪添加后植株表现($P<0.05$);CCA分析中显示各形态的N素供应均未对植株的根瘤生长产生抑制作用,这并不符合以往试验中氮素会抑制根瘤生成和生长的结果。另一方面,生物固氮是个极其消耗能量的过程。豆科植物利用光合作用,将获得的碳(C)分配到豆科植物根部支持根瘤生长,帮助维持根际固氮微生物功能群体,并为生物固氮提供能量,同时利用生物固氮生成铵基化合物^[32-34]。试验证明增加分配到根部的光合作用C可有效促进固氮作用或根瘤形成^[35-37]。光合作用的碳水化合物产物不仅支持固氮作用的能量消耗,同时也是根瘤生物量积累的能量来源。分配到根部的碳水化合物优先分为3部分:最低的结瘤生长的需求,生物固氮的能量消耗、根瘤正常生长的需求。如果这3部分完成后碳水化合物还有剩余,那这一部分就会支持产生更多的根瘤^[38]。许多研究表明豆科植物生物固氮与根瘤、根瘤根^[39-40]、光合作用呼吸C之间^[41]有很强的相关性。本试验中,全牛粪和粪渣中的有机碳含量并无显著差异,将这一现象与粪渣中硝态氮与铵态氮均显著高于全牛粪综合分析,我们猜想这是因为粪渣处理下有其他因素消解了培养基质中速效氮对根瘤的抑制作用。粪渣处理下的C/N比显著高于全牛粪的C/N比($P<0.05$),这个结果可能也暗示无论是硝态氮还是铵态氮,提供给豆科植物养分的N素含量在对根瘤生长的促生效应方面,C/N比可能要比单一的速效氮含量更具指示效应;在有机肥对豆科植物根瘤的促生效应评价中,C/N比的重要性可能要远远高于速效氮。在豆科植物与根瘤的共生系统中,植物的C供应对根瘤的生长发育并不是第一决定元素,而C/N重要性可能要高于有机碳;在豆科植物根瘤菌侵染与根瘤生长过程中,充足C源的存在或许可以在一定程度上消解高N对其的抑制作用。

豆科植物需要高水平的无机磷才能维持根瘤的生长。低磷通过限制宿主植物的新陈代谢来直接影

响根瘤发育。在豆科植物中磷对植物根瘤和固氮的刺激超过它对植物生长的刺激。低磷可能会损害根瘤和固氮。共生固氮是一个高耗能过程,该过程中根瘤需要共生植物或外界提供大量磷以产生ATP。齐敏兴等^[42]发现紫花苜蓿根瘤数和根瘤重在植物各器官中对磷的需求量最大,根瘤随磷水平的增大一直增大,并在磷水平为2 000 $\mu\text{mol/L}$ 时出现最大值。在豆科植物—根瘤菌共生系统中,磷对根瘤原基的刺激作用皮层细胞早期分裂时就已表现出来^[33]。当磷供应充足时植物光合效率和共生植物根瘤数量都会显著增加^[43],相应的磷元素供应不足会对结瘤固氮产生不利影响。很多豆科植物在缺磷条件下都会发生根瘤数量、重量下降,同时植株类菌体代谢速率、固氮酶活性均降低,进而光合作用减弱,最终导致豆科作物产量减少^[41-42]。有科学家提出ATP和ADP的水平、ATP/ADP的比值和能荷共同调控固氮^[47]。在大豆根瘤侵染细胞固氮过程中,共生体膜内外的ATP/ADP的比值调控固氮过程,同时AMP、ADP和ATP之间保持相对动态平衡,以此保证固氮和氧化磷酸化能够正常进行^[38]。磷缺乏会通过AON(autoregulation of nodulation)抑制根瘤的发育,通过影响NF(Nod Factor)的产生和固氮酶活性来影响代谢活动^[49-52],或者通过减少光合作用和宿主向类菌体的碳供应来影响固氮效率^[53]。在本试验中,粪渣结瘤指标最为优异,粪渣养分中的速效磷含量显著($P<0.05$)高于全牛粪,虽然其全磷含量低于全牛粪中的,但粪渣添加处理下的根瘤相关指标的突出表现说明在根瘤的生长发育过程中对磷元素的需求主要来自速效磷。

4 结论

腐熟牛粪中各营养成分对紫花苜蓿根瘤的促生效应中,C/N的正向影响要高于硝态氮和铵态氮的负面影响;豆科植物—根瘤共生系统在C源供应充足的条件下可以部分抵消高N对根瘤的抑制作用。C/N与根瘤最大根瘤重极显著正相关,与总根瘤数、总根瘤重显著正相关;速效P含量与包括根系侵染数的结瘤指标均为显著正相关。综上所述,腐熟牛粪的C/N和速效P是其对紫花苜蓿根瘤促生的主要因素,腐熟牛粪对紫花苜蓿根瘤有显著促生效应。

参考文献:

- [1] 李布青,夏文胜,葛昕. 畜禽养殖清洁生产与养殖污染的系统解决方案[C]//中国高科技产业化研究会. 中国高科技产业化研究会,2014.
- [2] 彭里. 畜禽粪便环境污染的产生及危害[J]. 家畜生态学报,2005,26(4):103-106.
- [3] 耿维,胡林,崔建宇,等. 中国区域畜禽粪便能源潜力及总量控制研究[J]. 农业工程学报,2013,29(1):171-179.
- [4] 孙超,潘瑜春,刘玉. 畜禽粪便资源现状及替代化肥潜力研究:以安徽省固镇县为例[J]. 生态与农村环境学报,2017,33(4):324-331.
- [5] 吕杰,王志刚,郝凤明,等. 循环农业中畜禽粪便资源化利用现状、潜力及对策—以辽中县为例[J]. 生态经济,2015,31(4):107-113.
- [6] 刘长庆,李天玉,王德科,等. 生物有机肥在黄瓜上的应用效果研究[J]. 西北农业学报,2006,15(1):180-182.
- [7] 孙世超. 大豆施用生物有机肥对产量及构成因素的影响[J]. 大豆科技,2002(4):10-12.
- [8] 王娜. 污泥有机肥对紫花苜蓿草生长和土壤理化性质的影响[J]. 工业安全与环保,2012,38(6):94-96.
- [9] 杨何宝. 施肥和接种根瘤菌对苜蓿生长及铁尾矿砂理化和生物学性质的影响[D]. 保定:河北农业大学,2015.
- [10] 李凤霞,郭永忠,王学琴,等. 不同改良措施对宁夏盐碱地土壤微生物及苜蓿生物量的影响[J]. 中国农学通报,2012,28(30):49-55.
- [11] 李江涛,钟晓兰,赵其国. 施用畜禽粪便和化肥对土壤活性有机碳库和团聚体稳定性影响[J]. 水土保持学报,2010,24(1):233-238.
- [12] 塔莉. 牛粪有机肥对重茬大豆生育性状及土壤性质影响研究[D]. 长春:吉林农业大学,2012.
- [13] 盛下放,曹广祥,何琳燕,等. NMF 菌群腐熟牛粪对植物病害及土壤微生物的影响[J]. 农业环境科学学报,2005,24(5):874-876.
- [14] 夏立忠, Roy Anderson. 长期施用牛粪条件下草原土壤磷的等温吸附与解吸动力学[J]. 土壤,2000(3):160-164.
- [15] 王亚奇,杜桂英,崔晓文,等. 一次性施入牛粪对土壤肥力和土壤微生物及酶活性的影响[J]. 山东农业大学学报(自然科学版),2018,49(2):181-186.
- [16] 左文刚,黄顾林,朱晓雯,等. 施用牛粪对沿海泥滩涂土壤原始肥力驱动及黑麦草幼苗生长的影响[J]. 植物营养与肥报,2016,22(2):372-379.
- [17] Calvert H E, Pence M K, Pierce M, *et al.* Anatomical analysis of the development and distribution of Rhizobium infection in soybean roots [J]. Canadian Journal of Botany,2011,62(11):75-2384.
- [18] Stacey G M, Calvin C B, KIM S Y, *et al.* Effects of endogenous salicylic acid on nodulation in the model legumes *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* [J]. Plant Physiology,2006,141(4):73-1481.
- [19] Schauser L, Wieloch W, Stougaard J. Evolution of NIN-Like Proteins in Arabidopsis, Rice, and *Lotus japonicus* [J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60 (2) : 229-237.
- [20] Soyani T, Kouchi H, Hirota A, *et al.* Nodule inception directly targets NF-Y subunit genes to regulate essential processes of root nodule development in lotus japonicus [J]. Plos Genetics,2013,9(3):e1003352.
- [21] Souano T, Shimoda Y, Kawaguchi M, *et al.* A shared gene drives lateral root development and root nodule symbiosis pathways in Lotus[J]. Science, 2019, 366:1021-1023.
- [22] 连兆煌. 无土栽培原理与技术[M]. 第一版. 北京:中国农业出版社,1994:19-21.
- [23] Beusichem M L, Vankikby E A, Baas R. Influence of nitrate and ammonium nutrition on the uptake, Assimilation and distribution in Ricinus communis[J]. Plant Physiology,1988,86:914-921.
- [24] 司江英,汪晓丽,陈冬梅,等. 不同 pH 和氮素形态对作物幼苗生长的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2007,28(3):68-71.
- [25] Bhat K K S. Nutrient inflows into apple roots [J]. Plant Soil,1983 (71):371-380.
- [26] Marcus S, Boy F, Peter S. Root morphology and nitrogen uptake of maize simultaneously supplies with ammonium and nitrate in a split-root system [J]. Annals of botany, 1993,72:107-115.
- [27] 俞艳,刘晓静,齐敏兴,等. pH 和氮素形态对紫花苜蓿根瘤特性的影响[J]. 草原与草坪,2012,32(5):7-11.
- [28] 董守坤,刘丽君,李小明,等. 不同氮源对大豆生长发育的影响[J]. 耕作与栽培,2010(3):1-4.
- [29] 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[J]. 草业学报,2013,22(1):95-102.
- [30] 蒯佳林,刘晓静,李文卿. 不同氮素水平对接种根瘤菌紫花苜蓿生长特性的影响[J]. 草原与草坪,2011,31(3):

- 56—59.
- [31] 杨何宝,李继泉,王俊娟,等. 施肥和苜蓿接种根瘤菌对苜蓿生长及铁尾矿砂理化性质的影响[J]. 草业学报, 2016,25(2):68—76
- [32] Minchin F R, Pate J S. The carbon balance of a legume and the functional economy of its root nodules[J]. Exp Bot, 1973,24:259—271.
- [33] Layzell D B, Rainbird R M, Atkins C A, *et al.* Economy of photosynthate use in nitrogen—fixing legume Nodules: observations on two contrasting symbioses 1 [J]. Plant Physiology, 1979,4(5):88—891.
- [34] King B J, Layzell D B, Canvin D T. The role of dark carbon dioxide fixation in root nodules of soybean[J]. Plant Physiol, 1986,81:200—205.
- [35] Voisin A S, Salon C, Jeudy C, *et al.* Symbiotic N₂ fixation activity in relation to C economy of *Pisum sativum* L. as a function of plant phenology [J]. Journal of Experimental Botany, 2003 (393):2733—2744.
- [36] Haase S, Neumann G, Kania A, *et al.* Elevation of atmospheric CO₂ and N—nutritional status modify nodulation, nodule—carbon supply, and root exudation of *Phaseolus vulgaris* L [J]. Soil Biology & Biochemistry, 2007, 39(9):2208—2221.
- [37] Kirizii D A, Vorobei N A, Kots Y. Relationships between nitrogen fixation and photosynthesis as the main components of the productivity in alfalfa, Russ [J]. Plant Physiol, 2007,54:89—594.
- [38] Boote K J, Hoogenboom G, Jones J W, *et al.* Modelling N Fixation and its Relationship to N Uptake in the CROPGRO Model[M]. 2008.
- [39] Mahon J D. Respiration and the energy requirement for nitrogen fixation in nodulated pea roots[J]. Plant Physiol, 1977,60:817—821.
- [40] Ryle G J A, Powell C E, Gordon A J. The respiratory costs of nitrogen fixation in soyabean, cowpea, and white clover I. nitrogen fixation and the respiration of the nodulated root[J]. Exp. Bot, 1979,30:135—144.
- [41] Lawrie A C, Wheeler C T. The supply of photosynthetic assimilates to nodules of *Pisum Sativum* L. in relation to the fixation of nitrogen[J]. New Phytol, 1973,72:1341—1348.
- [42] 齐敏兴,刘晓静,张晓磊,等. 不同磷水平对接种植根瘤菌紫花苜蓿生长特性的影响[J]. 草原与草坪, 2013,33(1):50—53.
- [43] Gentili F, Wall L G, Huss K. Effects of phosphorus and nitrogen on nodulation are seen already at the stage of early cortical cell divisions in *Alnus incana* [J]. Annals Of Botany, 2006,98:309—315.
- [44] Thuynsmr R, Valentine A, Kleinert A. Phosphorus deficiency affects the allocation of below—ground resources to combined cluster roots and nodules in *Lupinus albus* [J]. Journal of Plant Physiology, 2014,171:285—291.
- [45] Tang C, Hinsinger P, Drevon J J, *et al.* Phosphorus Deficiency Impairs Early Nodule Functioning and Enhances Proton Release in Roots of *Medicago truncatula* L. [J]. Annals of Botany, 2001,88(1):131—138.
- [46] Roux M, Khan S, Valentine A J. Organic acid accumulation may inhibit N₂ fixation in phosphorus—stressed lupin nodules[J]. New Phytologist, 2008,177(4):956—964.
- [47] Ching T M, Hedtke S, Russell S A, Evans H J. Energy state and dinitrogen fixation in soybean nodules of dark—grown plants[J]. Plant physiol, 1975,55:796—798.
- [48] Oresnik I J, Layzell D B. Composition and Distribution of Adenylates in Soybean (*Glycine max* L.) Nodule Tissue [J]. Plant Psiol, 1994,104:217—225.
- [49] Nussaume L, Kanno S, Javot H, *et al.* Phosphate Import in Plants: Focus on the PHT1 Transporters [J]. Front Plant, 2011,2(83):83.
- [50] Sulieman S, Tran L. Phosphorus homeostasis in legume nodules as an adaptive strategy to phosphorus deficiency [J]. Plant Science An International Journal of Experimental Plant Biology, 2015,239:36—43.
- [51] Liese R, Schulze J, Cabeza R A. Nitrate application or P deficiency induce a decline in *Medicago truncatula* N₂—fixation by similar changes in the nodule transcriptome [J]. Scientific Reports, 2017,7:46264.
- [52] Ma Y, Chen R. Nitrogen and phosphorus signaling and transport during legume—rhizobium symbiosis[J]. Front. Plant Sci, 2021. 12:683601.
- [53] Hernandez G, Valdes O, Ramirez M, *et al.* Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus—stressed common bean plants [J]. Plant Physiol, 2009, 151: 1221—1238.

Effect of decomposed cow manure on growth of alfalfa root nodules

ZHU Rui-fen^{1,2}, LIU Chang², RAN Qi-fan², MA Hui-zhen², FAN Yan², SHI Shang-li^{1*}

(1. College of Grassland Science, Gansu Agricultural University, Key Laboratory for Grassland Ecosystem, Ministry of Education, Grassland Engineering Laboratory of Gansu Province, Sino-U. S. Centers for Grazing Land Ecosystem Sustainability, Lanzhou 730070, China; 2. Pratacultural Institute, Chongqing Academy of Animal Sciences, Rongchang 402460, China)

Abstract: 【Objective】 The growth-promoting ability of alfalfa was studied by adding different amount of decomposed cow dung, in order to reveal the mechanism of increasing symbiotic nodulation rate and nitrogen fixation efficiency of alfalfa. 【Method】 Gannong No. 9 of alfalfa was used as experimental material and treated by adding decomposed cow dung (different amount). The biological indexes and the related indexes of root nodules were determined and compared. It was found that 129 g cow dung/basin (2.75 t/mu) was the best amount of manure for promoting growth. 【Result】 According to the experiment, the best amount of rotten cow dung was extracted and separated to obtain dung residue and extract, and pot experiment was carried out with the control and the best amount of rotten cow dung respectively, the differences of root nodule index and growth-promoting ability among the treatments showed that, the feces had the strongest growth-promoting ability to alfalfa nodules ($P < 0.05$), effective nodule number ($P < 0.05$), nodule weight ($P < 0.05$), maximum nodule weight ($P < 0.05$), infection number ($P < 0.05$), infection zone length ($P < 0.05$). Canonical correspondence analysis (CCA) showed that 95.6% of the root nodule characteristics could be explained by nutrients from different treatments. The nutrient content in cow dung and feces had a positive effect on the formation of nodule characteristic index. Especially in faecal residue treatment, C/N was significantly positively correlated with the largest nodule weight ($P < 0.01$), the total nodule number and the total nodule weight ($P < 0.05$). 【Conclusion】 There was a significant positive correlation between the content of available P and the nodulation index including the number of root infection ($P < 0.05$).

Key words: alfalfa; decomposed cow dung; rhizobium; nodulation; C/N ratio

(责任编辑:刘建荣)