DOI: 10. 11686/cyxb2025425
http://cyxb. magtech. com. cn
赵炳森, 康文娟, 师尚礼, 等. 氮添加对甘农 9 号紫花苜蓿-LL2 共生系统生产力的影响. 草业学报, 2026, 35(10): 48－60.
ZHAO Bing-sen, KANG Wen-juan, SHI Shang-li, *et al*. Effects of nitrogen addition on the productivity of the *Medicago sativa* 'Gannong No.9'-LL2 *Rhizobium symbiotic* system. Acta Prataculturae Sinica, 2026, 35(10): 48－60.

氮添加对甘农 9 号紫花苜蓿-LL2 共生系统生产力的影响

赵炳森, 康文娟*, 师尚礼*, 关键, 陆保福, 韩宜霖, 王晶晶, 陈凤娇
(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: "甘农 9 号紫花苜蓿－根瘤菌株 LL2"构成高效的固氮系统。为明确施氮量对该系统生产力的影响, 试验设置 4 个氮(N)浓度添加处理: N 0 kg·hm^{-2}(R)、N 35.09 kg·hm^{-2}(NR_1)、N 46.79 kg·hm^{-2}(NR_2)、N 58.48 kg·hm^{-2}(NR_3), 于分枝期、现蕾期和初花期测定单株有效根瘤数、单株有效根瘤重、固氮酶活性、株高、根长、地上部与地下部干重、粗蛋白(CP)、粗脂肪(EE)、中性洗涤纤维(NDF)、酸性洗涤纤维(ADF)及饲草分级指数(FGI)等指标, 以相同施氮水平下不接种根瘤菌 LL2 为对照组: N 0 kg·hm^{-2}(CK_1)、N 35.09 kg·hm^{-2}(CK_2)、N 46.79 kg·hm^{-2}(CK_3)、N 58.48 kg·hm^{-2}(CK_4), 系统研究氮浓度添加处理对甘农 9 号-LL2 共生系统的结瘤固氮、苜蓿生长及营养品质的影响。结果表明: NR_2处理下, 甘农 9 号-LL2 共生系统在分枝期、现蕾期和初花期的单株有效根瘤数分别为 22、32 和 35 个, 单株有效根瘤重分别为 0.0353、0.0745 和 0.1013 g·株$^{-1}$, 固氮酶活性分别为 4.79、26.51 和 28.13 μmol·g^{-1}·h^{-1}, 均随生长进程呈递增趋势, 初花期株高为 51.92 cm、粗蛋白含量为 20.42%, 根长以及地上、地下干重均高于其他氮添加处理和对照($P<0.05$), 中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量均低于其他氮添加处理和对照($P<0.05$)。NR_2处理的良好结瘤固氮效应和促生效应主要发生在分枝期, 单株有效根瘤数相较于 R 处理增长率为 84.44%, 单株有效根瘤重、固氮酶活性分别为 R 处理的 2.5 和 3.1 倍, 根长、地上和地下干重增长率亦均高于现蕾期和初花期。现蕾期, NR_2处理对中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维的降低效应突出, 分别较 R 处理降低 3.82% 和 6.03%, 优于分枝期和初花期。初花期, NR_2处理对粗蛋白的提高效应明显, 较 R 处理提高了 9.04%, 优于分枝期和现蕾期。通过对初花期的饲草分级指数评定, NR_2处理的 FGI 值为 54.91 MJ·d^{-1}, 饲草等级为特级。46.79 kg·hm^{-2}是优化甘农 9 号-LL2 共生系统生产力的最适施氮量。研究结果为甘农 9 号紫花苜蓿-LL2 高效共生系统的生产力提升提供了栽培理论依据。

关键词: 紫花苜蓿; 根瘤菌; 施氮水平; 固氮; 生产力

Effects of nitrogen addition on the productivity of the *Medicago sativa* 'Gannong No.9'-LL2 *Rhizobium symbiotic* system

ZHAO Bing-sen, KANG Wen-juan*, SHI Shang-li*, GUAN Jian, LU Bao-fu, HAN Yi-lin, WANG Jing-jing, CHEN Feng-jiao

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

Abstract: The "Gannong No. 9 alfalfa (*Medicago sativa*)－*Rhizobium* strain LL2" symbiotic system is recognized

收稿日期: 2025-10-18; 改回日期: 2025-12-08
基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-34)和苜蓿燕麦高产种质创新和品种选育子课题(03324007)资助。
作者简介: 赵炳森(1998－), 男, 河南驻马店人, 在读硕士。E-mail: 1073323020047@st. gsau. edu. cn
*通信作者 Corresponding author. E-mail: kangwj@gsau. edu. cn; shishangli@gsau. edu. cn

as an efficient nitrogen-fixing association. To clarify the effects of nitrogen application rates on the productivity of this system, four nitrogen (N) addition treatments were established: 0 kg·ha^{-1} (R), 35.09 kg·ha^{-1} (NR_1), 46.79 kg·ha^{-1} (NR_2), and 58.48 kg·ha^{-1} (NR_3). Corresponding non-inoculated controls at each nitrogen level were included: 0 kg·ha^{-1} (CK_1), 35.09 kg·ha^{-1} (CK_2), 46.79 kg·ha^{-1} (CK_3), and 58.48 kg·ha^{-1} (CK_4). Measurements were conducted at the branching, budding, and early flowering stages. These included the number of effective nodules per plant, effective nodule weight per plant, nitrogenase activity, plant height, root length, aboveground and belowground dry weight, crude protein (CP), ether extract (EE), neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF), and forage grading index (FGI). This study evaluated the effects of nitrogen addition on nodulation and nitrogen fixation, plant growth, and forage quality in the Gannong No. 9-LL2 symbiotic system. The results showed that in the NR_2 treatment, the number of effective nodules per plant in the Gannong 9-LL2 symbiotic system was 22, 32, and 35 at the branching, budding, and initial flowering stages, respectively. Effective nodule weight per plant was 0.0353, 0.0745, and 0.1013 g·plant^{-1}, and nitrogenase activity was 4.79, 26.51, and 28.13 μmol·g^{-1}·h^{-1} at the same development stages, displaying an increasing trend as growth progressed. At the early flowering stage, the plant height was 51.92 cm and CP content was 20.42%. Root length and both aboveground and belowground dry weight were significantly higher than those of other nitrogen treatments and the controls ($P<0.05$). Meanwhile, NDF and ADF contents were significantly lower than those under other nitrogen addition treatments and the control ($P<0.05$). The strong nodulation and nitrogen-fixing responses and the growth-promoting effect of NR_2 occurred mainly at the branching stage, where the number of effective nodules per plant was 84.44% higher than that of the R treatment, and nodule weight per plant and nitrogenase activity were 2.5-fold and 3.1-fold higher than those of R treatment, respectively. Increases in root length, aboveground dry weight, and belowground dry weight were also greater at the branching stage than at the budding and early flowering stages. At the budding stage, fiber fractions were reduced in NR_2, with NDF and ADF contents reduced by 3.82% and 6.03%, respectively, compared with R treatment, and this effect was strongest than at the branching and early flowering stages. At the early flowering stage, crude protein was markedly enhanced in NR_2 where CP content was increased by 9.04% relative to R treatment. Similar, but smaller effects were observed at earlier growth stages. During grading at the early flowering stage, the FGI value of NR_2 was 54.91 MJ·d^{-1}, corresponding to a premium forage grade. To summarize, the NR_2 nitrogen application rate of 46.79 kg·ha^{-1} was identified as the optimal N level for maximizing the productivity of the Gannong No. 9-LL2 symbiotic system. These findings provide research data useful for development of cultivation practices aimed at improving the productivity of the Gannong No. 9 alfalfa-LL2 symbiotic system.

Key words: alfalfa; rhizobium; nitrogen application level; nitrogen fixation; productivity

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)是广泛分布于温带干旱和半干旱地区的一种多年生优良豆科牧草,粗蛋白含量高达18%～24%[1],具有生物利用率高[2-3],环境适应能力强等优点。构建高产、高效、优质的苜蓿栽培技术体系对于推动我国畜牧业的可持续发展具有重要意义[4],而接种高效根瘤菌是实现苜蓿高产高效的重要途经之一[5]。根瘤菌(rhizobium)是一种革兰氏阴性菌,能与豆科植物共生形成根瘤,并能将空气中的无机氮固定转化为有机氮,固氮量200～400 kg·hm^{-2},可为紫花苜蓿生长发育提供46%～92%的氮素。根瘤菌具有良好的定殖能力,可在植株不同部位定殖,提高植株的生物[6]和非生物[7]抗性。国内外大量研究表明,将根瘤菌接种到紫花苜蓿,能促进其早结根瘤,提高固氮量[8],发挥增产效应[9]。

紫花苜蓿－根瘤菌共生系统具有高度的宿主特异性[10]。已有研究表明,不同品种的紫花苜蓿接种同一根瘤菌株,其共生固氮效果彼此间存在较大差异[11]。研究发现,将32株根瘤菌接种到甘农9号上,根瘤菌株LL2与其的共生效应较好。此外,4个品种紫花苜蓿接种9个中华根瘤菌株后,同样表现为甘农9号与LL2的组合效应最

好,其叶干重和地上干重表现最优[12]。

氮素通过调控苜蓿的生理代谢,进而影响其产量和品质[13]。但紫花苜蓿对氮肥的敏感性较高,合理施用氮肥可提高紫花苜蓿的产量和品质,过量施氮会造成其干物质减少,并降低固氮能力,导致氮肥利用率降低和环境污染[14-16]。施氮肥对苜蓿结瘤固氮具有调控作用[17],研究表明,在不施用氮素的情况下,苜蓿结瘤启动最早,结瘤率最高,根瘤固氮酶活性最高,固氮效率最大,且随着施氮水平的提高,紫花苜蓿的根瘤数、根瘤重和固氮潜力总体上呈先升后降的变化趋势,适量施用氮肥可以有效促进苜蓿结瘤固氮,不施或过量施用氮肥都不利于苜蓿根瘤的形成、生长及固氮效能的发挥[18-20]。

团队前期的研究成果[12]证实,甘农9号紫花苜蓿-LL2根瘤菌株是高效固氮促生系统,但在田间栽培环境下,氮肥施用量如何调控该系统的结瘤固氮、苜蓿生长和营养品质尚不明确,本研究以甘农9号紫花苜蓿-LL2根瘤菌株共生系统为试验对象,研究不同氮素添加水平对共生系统结瘤、固氮以及促生效应的影响,为该共生系统发挥高效生产力提供栽培理论基础。

1 材料与方法

1.1 样地概况

试验地点位于甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室牧草试验基地,坐落于兰州市西北部(东经105°41′,北纬34°05′),海拔1595 m。属于温带半干旱大陆性气候区,年均气温和年降水量分别为9.7 ℃和451.6 mm,年蒸发量1664 mm,年日照时数2446 h,无霜期210 d,土壤类型为黄绵土。

1.2 试验材料

甘农9号紫花苜蓿(*M. sativa* 'Gannong No. 9')种子、中华根瘤菌株LL2(*Sinorhizobium meliloti* LL2)均由甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室提供,尿素[$CO(NH_2)_2$]从上海源叶生物科技有限公司购买。

1.3 试验方法

1.3.1 种子处理 甘农9号紫花苜蓿品种种子用无菌水冲洗,晾干待用。选择健康、饱满及大小一致的紫花苜蓿种子1800粒,置于无菌操作平台上,将挑好的种子放入已高温灭菌的50 mL三角瓶内,依次用碘伏浸泡5 min,氯化钠-吐温(sodium chloride-Tween 80 solution,ST)溶液(0.9%氯化钠溶液,0.5%吐温80)浸泡1 min消毒,各步骤间均以无菌水清洗,最后用无菌滤纸吸干种子表面水分放置待用。

1.3.2 田间播种 本试验于2024年4月27日进行播种。将蛭石和沙子高温灭菌后按1∶1的比例混匀装入套有聚乙烯(polyethylene,PE)自封袋的花盆内(上直径为25 cm、下直径为20 cm、高30 cm),将花盆半埋入土壤20 cm深。每盆点播25粒已消毒的种子,表面覆盖无土基质(蛭石∶沙子=1∶1混合)2 cm左右。出苗后间苗,每盆保留生长一致、分布均匀的幼苗20株,期间根据需要每隔1~2 d浇水1次,每次每盆500 mL,试验地之间设置0.3 m走廊,四周设0.3 m保护行。

1.3.3 根瘤菌液的制备 将-80 ℃保存的根瘤菌株划线接种于蛋白胰酶琼脂(tryptone yeast,TY)固体培养基上进行活化。培养基配方为酪蛋白胰酶琼脂(tryptone yeast,TY):5.0 g·L^{-1}胰岛蛋白胨,3.0 g·L^{-1}酵母粉,1.3 g·L^{-1} $CaCl_2·6H_2O$,琼脂16.0 g·L^{-1},用蒸馏水定容至1000 mL并调节pH=7.0~7.2。活化后的菌株于28 ℃生化培养箱中培养24 h。用经过高温灭菌的接种针挑取单菌落转接到含有400 mL酵母甘露醇(yeast mannitol broth, YMB)液体培养基[酵母甘露醇(yeast mannitol broth, YMB)液体培养基:0.5 g·L^{-1} $K_2HPO_4·3H_2O$,0.2 g·L^{-1} $MaSO_4·7H_2O$,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1×10^9 CFU·mL^{-1},在25 ℃、10000 r·min^{-1},离心10 min后,倒掉上清液,然后用等量的无菌水清洗菌体,用涡旋振荡器将其摇匀[21]。

1.3.4 施氮和根瘤菌接种设计 本试验采用单因素随机区组设计,以甘农9号紫花苜蓿品种和中华根瘤菌LL2为材料,设置4个氮浓度处理并接种中华根瘤菌:N 0 kg·hm^{-2}(R)、N 35.09 kg·hm^{-2}(NR_1)、N 46.79 kg·hm^{-2}(NR_2)、N 58.48 kg·hm^{-2}(NR_3),并设置4个氮浓度但不接种中华根瘤菌LL2处理为对照组:N 0 kg·hm^{-2}(CK_1)、N 35.09 kg·hm^{-2}(CK_2)、N 46.79 kg·hm^{-2}(CK_3)、N 58.48 kg·hm^{-2}(CK_4),每个处理设9个重复(9个小区),每个

小区含 8 盆，共 72 盆。

于紫花苜蓿生长的第 10 天晚上，氮以尿素[$CO(NH_2)_2$]溶液形式加入。第 11 天晚 7:00 进行第一次根瘤菌接种，在 NR_1、NR_2、NR_3 花盆中浇菌悬液 125 mL，其余处理浇灌等量无菌水。

1.4 测定指标与方法

1.4.1 采样时间　于紫花苜蓿分枝期（2024 年 5 月 26 日）（播种后 30 d）、现蕾期（2024 年 6 月 15 日）（播种后 50 d）、初花期（2024 年 6 月 24 日）（播种后 60 d）取样测定。

1.4.2 结瘤固氮指标　单株有效根瘤数：每个处理设 3 次重复，每个重复随机选取 4 株植株，分别计数粉红色根瘤的数量，并计算单株粉红色根瘤的总数。

单株有效根瘤重：每个处理设 3 次重复，每个重复随机选取 4 株植株，使用电子天平（型号：SQP-220，北京，精度 1 mg）称量单株粉红色根瘤。

固氮酶活性：采用乙炔（C_2H_4）还原法[22]测定。

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

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

1.4.3 生长指标　株高和根长：每个处理设 3 次重复，各处理中随机选择 8 株植株，用直尺（精度 0.1 cm）进行测量。

地上与地下生物量：每个处理设 3 次重复，各处理随机选取 8 株植株，将其地上部与地下部分离后，样品依次经 105 ℃杀青 15 min，75 ℃烘干后，用电子天平（型号：SQP-220，北京，精度 1 mg）测其干重。

1.4.4 营养指标　粗蛋白质（crude protein，CP）参考凯氏定氮法进行测定；粗脂肪（ether extract，EE）参照索氏抽提法进行测定；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）洗涤纤维法进行测定，以上指标测定均设 3 次重复[23]。

1.4.5 苜蓿饲用品质评价　饲草分级指数（forage grading index，FGI）可将能量、CP、NDF 和 ADF 结合起来，更客观、全面地反映粗饲料的营养价值，其计算公式如下[24−25]，分级标准（GB/T 23387−2009）[24]如表 1 所示。

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

$$NE_L=[1.085-(0.124\times ADF)]\times 9.29$$

$$FGI=NE_L\times VDMI\times CP/NDF$$

式中：$VDMI$ 为随意干物质采食量（voluntary dry matter intake）；NE_L 为产乳净能值（net energy for lactation）；BW 为奶牛体重，以 600 kg 计算。

表 1　粗饲料质量等级标准

Table 1　Grade standard of roughage quality（$MJ\cdot d^{-1}$）

分级 Grade	饲草分级指数 Forage grading index
特级 Special grade	＞53.68
1 级 Grade 1	33.50～53.68
2 级 Grade 2	19.20～29.29
3 级 Grade 3	11.10～16.44
4 级 Grade 4	6.28～10.67
5 级 Grade 5	＜6.28

注：没有达到上一级别的指标仍划归到该级别。

Note：Failure to meet the criteria for the next level shall still be classified under that level.

1.5 数据分析

分别使用 Excel 2024、SPSS 27.0.1、Origin 2024 及 Graphpad Prism 10.1.2 软件完成本研究的数据处理、统计分析及图表绘制。

2　结果与分析

2.1 甘农 9 号-LL2 共生系统在不同氮素水平下的结瘤固氮动态

2.1.1 结瘤指标　如图 1a 和图 1c 所示，在播种后 30～50 d 时，各处理单株有效根瘤数呈快速上升趋势，50～60 d 各处理单株有效根瘤数上升趋势渐缓，60 d 时单株有效根瘤数达到最多，与 30 d 存在显著差异（$P<0.05$）。

在30 d时，NR_2处理的单株有效根瘤数最多(22个)，R处理最少(12个)，NR_2单株有效根瘤数显著高于NR_3($P<0.05$)。在50 d时，NR_2处理的单株有效根瘤数仍最多(32个)，R处理的单株有效根瘤数最少(24个)，NR_2单株有效根瘤数显著高于NR_3处理($P<0.05$)。在60 d时，NR_2处理的单株有效根瘤数达到最多(35个)，R处理的单株有效根瘤数最少(26个)，NR_2的单株有效根瘤数显著高于NR_3($P<0.05$)。与R处理相比，NR_2处理单株有效根瘤数的增长率在30、50和60 d分别为84.44%、33.38%和35.13%，且均显著高于NR_3处理($P<0.05$)。

如图1b和图1d所示，30、50和60 d的单株有效根瘤重分别为0.0143～0.0353 g·株$^{-1}$、0.0448～0.0745 g·株$^{-1}$和0.0660～0.1013 g·株$^{-1}$，30 d的单株有效根瘤重较R处理的增长率显著高于50、60 d，同时60 d的单株有效根瘤重显著高于30、50 d($P<0.05$)。NR_2在30、50和60 d的单株有效根瘤重均达到最大，分别为0.0353、0.0745和0.1013 g·株$^{-1}$，其次为NR_1、NR_3，R处理最小，且NR_2与NR_3、NR_1、R存在显著差异($P<0.05$)。与R处理相比，NR_2在30、50和60 d的单株有效根瘤重增长率达到最高，分别为146.35%、67.01%和53.98%，且均显著高于NR_3($P<0.05$)。

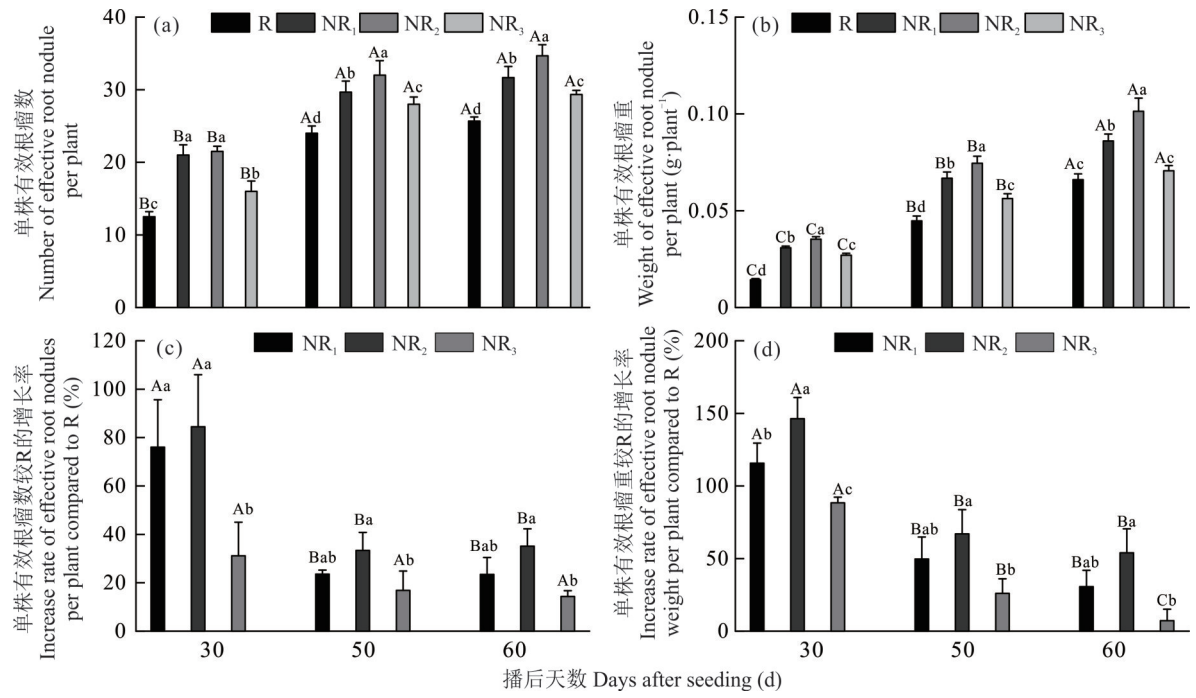


图1 不同氮素水平下甘农9号-LL2共生系统的结瘤差异

Fig. 1 Nodulation difference of the Gannong No. 9-LL2 symbiotic system under different nitrogen levels

不同大写字母表示同一处理在不同时间段差异显著($P<0.05$)，不同小写字母表示同一时期内不同处理间差异显著($P<0.05$)；R：N 0 kg·hm^{-2}处理；NR_1：N 35.09 kg·hm^{-2}处理；NR_2：N 46.79 kg·hm^{-2}处理；NR_3：N 58.48 kg·hm^{-2}处理，4个处理均为接种中华根瘤菌LL2。下同。Different uppercase letters indicate significant differences within the same treatment across different time periods ($P<0.05$), while different lowercase letters indicate significant differences among treatments within the same stage ($P<0.05$); R: Nitrogen 0 kg·ha^{-1} treatment; NR_1: Nitrogen 35.09 kg·ha^{-1} treatment; NR_2: Nitrogen 46.79 kg·ha^{-1} treatment; NR_3: Nitrogen 58.48 kg·ha^{-1} treatment, all four treatments were inoculated with rhizobium LL2. The same below.

2.1.2 固氮指标　固氮酶活性是可以直观反映甘农9号-LL2共生系统固氮能力的指标。由图2a和图2b可知，甘农9号-根瘤菌LL2共生系统在30 d的固氮酶活性增长率大于50、60 d，30 d的固氮酶活性与50和60 d时存在显著差异($P<0.05$)。在30、50和60 d时，NR_2的固氮酶活性都达到最高，分别为4.79、26.51和28.13 μmol·g^{-1}·h^{-1}，且与NR_3、NR_1、R存在显著差异($P<0.05$)。NR_1的固氮酶活性次之，分别为3.35、22.81、25.62 μmol·g^{-1}·h^{-1}。NR_3处理的固氮酶活性则相对较低，为2.11、17.66、19.52 μmol·g^{-1}·h^{-1}。R的固氮酶活性最低，仅有1.56、11.37、12.40 μmol·g^{-1}·h^{-1}。与R处理相比，NR_2在30、50和60 d的固氮酶活性增长率最高，分别为221.67%、134.91%和127.92%，且均显著高于NR_3($P<0.05$)。

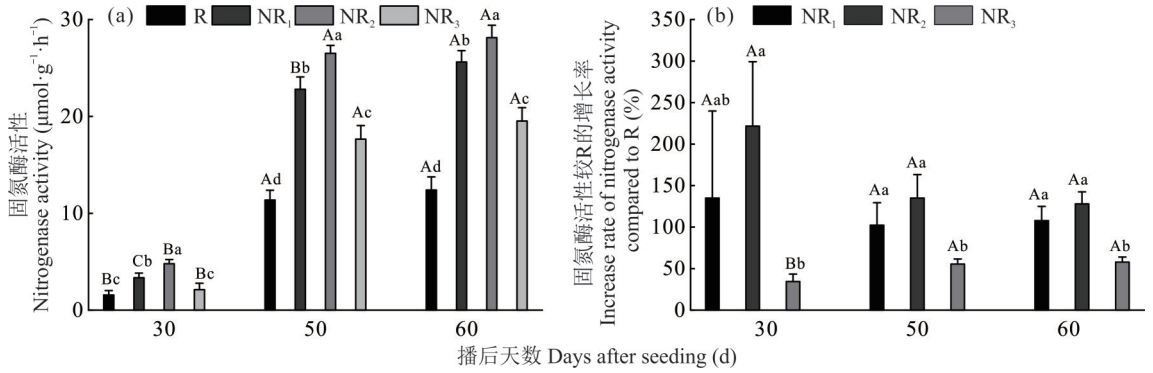


图 2　不同氮素水平下甘农 9 号-LL2 共生系统的固氮能力差异

Fig. 2　Differences in the nitrogen-fixing capacity of the Gannong No. 9-LL2 symbiotic system under different nitrogen levels

2.2　甘农 9 号-LL2 共生系统在不同氮素水平下的表型变化

2.2.1　株高与根长　　随着时间的增加，不同处理下的株高与根长均有不同程度的变化。由图 3a 和图 3e 可知，在 30 d 时，NR_2 处理下甘农 9 号-根瘤菌 LL2 共生系统的株高最高（26.55 cm），与其他各个处理差异显著（$P<0.05$）。其次为 NR_1（25.57 cm），然后是 NR_3（24.49 cm），最后为 R（23.74 cm）。与 R 相比，NR_2 的株高增长率最高（11.83%），显著高于 NR_1 和 NR_3（$P<0.05$）。由图 3g 和图 3k 可知，在 50 d 时，NR_2 的株高最高（46.38 cm），与其余处理差异显著（$P<0.05$），相较于 NR_1、NR_3、R、CK_4、CK_3、CK_2、CK_1 分别提高 4.22%、7.69%、12.41%、23.35%、28.12%、31.39%、36.41%。与 R 相比，NR_2 的株高增长率最高（12.44%），显著高于 NR_3（$P<0.05$）。由图 3m 和图 3q 可知，在 60 d 时，NR_2 的株高最高（51.92 cm）。NR_1、NR_2、NR_3 分别是 R 的 1.07、1.13、1.04 倍。除此之外，NR_1、NR_2、NR_3 的株高分别是 CK_2、CK_3、CK_4 的 1.31、1.36、1.21 倍，CK_1 株高最低（36.4 cm）。与 R 相比，NR_2 的株高增长率最高（12.95%），显著高于 NR_1 和 NR_3（$P<0.05$）。

如图 3b 和图 3e 所示，在 30 d 时，NR_2 处理下甘农 9 号-根瘤菌 LL2 共生系统的根长最长（26.76 cm），与其他各个处理差异显著（$P<0.05$）。在 30 d 时，与 R 相比，NR_2 的根长增长率最高（16.94%），显著高于 NR_3（$P<0.05$）。由图 3h 和图 3k 可知，在 50 d 时，NR_2 的根长最长（30.79 cm）且显著高于其他各个处理（$P<0.05$），相较于 NR_1、NR_3、R、CK_3、CK_4、CK_2、CK_1 分别提高 2.98%、5.09%、9.11%、16.50%、14.50%、20.89%、23.75%。与 R 相比，NR_2 的根长增长率最高（9.11%），显著高于 NR_1 和 NR_3（$P<0.05$）。由图 3n 和图 3q 可知，在 60 d 时，NR_2 的根长最长（33.82 cm），且显著高于其他各个处理（$P<0.05$），相较于 NR_1、NR_3、R、CK_3、CK_4、CK_2、CK_1 分别提高 4.67%、6.55%、9.84%、19.76%、15.39%、23.84%、29.08%。与 R 相比，NR_2 的根长增长率最高（9.84%），显著高于 NR_3（$P<0.05$）。

2.2.2　地上干重和地下干重　　由图 3c 和图 3f 可知，在 30 d 时，NR_2 处理下甘农 9 号-根瘤菌 LL2 共生系统的地上干重最重（0.35 g·株$^{-1}$），与其他处理差异显著（$P<0.05$），R 相较于 CK_1、CK_2、CK_3、CK_4 分别提高 53.33%、35.29%、15.00%、9.52%。与 R 相比，NR_2 的地上干重增长率最高（51.64%），显著高于 NR_3（$P<0.05$）。由图 3i 和图 3l 可知，在 50 d 时，NR_2 的地上干重最重（1.01 g·株$^{-1}$），与其他处理差异显著（$P<0.05$），R 相较于 CK_1、CK_2、CK_3、CK_4 分别提高 100.00%、65.22%、22.58%、7.04%。与 R 相比，NR_2 的地上干重增长率最高（32.98%），显著高于 NR_3（$P<0.05$）。由图 3o 和图 3r 可知，在 60 d 时，NR_2 的地上干重最重（1.29 g·株$^{-1}$），与其他处理差异显著（$P<0.05$），R 相较于 CK_1、CK_2、CK_3、CK_4 分别提高 38.24%、32.39%、23.68%、14.63%。与 R 相比，NR_2 的地上干重增长率最高（37.41%），显著高于 NR_3（$P<0.05$）。

由图 3d 和图 3f 可知，在 30 d 时，NR_2 处理下甘农 9 号-根瘤菌 LL2 共生系统的地下干重最重（0.38 g·株$^{-1}$），与其他处理差异显著（$P<0.05$）。与 R 相比，NR_2 的地下干重增长率为 47.73%，显著高于 NR_1 和 NR_3（$P<0.05$）。由图 3j 和图 3l 可知，在 50 d 时，NR_2 处理下甘农 9 号-根瘤菌 LL2 共生系统的地下干重最重（1.15 g·株$^{-1}$），与其他处理差异显著（$P<0.05$），相较于 NR_1、NR_3、R、CK_3、CK_4、CK_2、CK_1 分别提高 7.48%、23.66%、41.98%、85.48%、

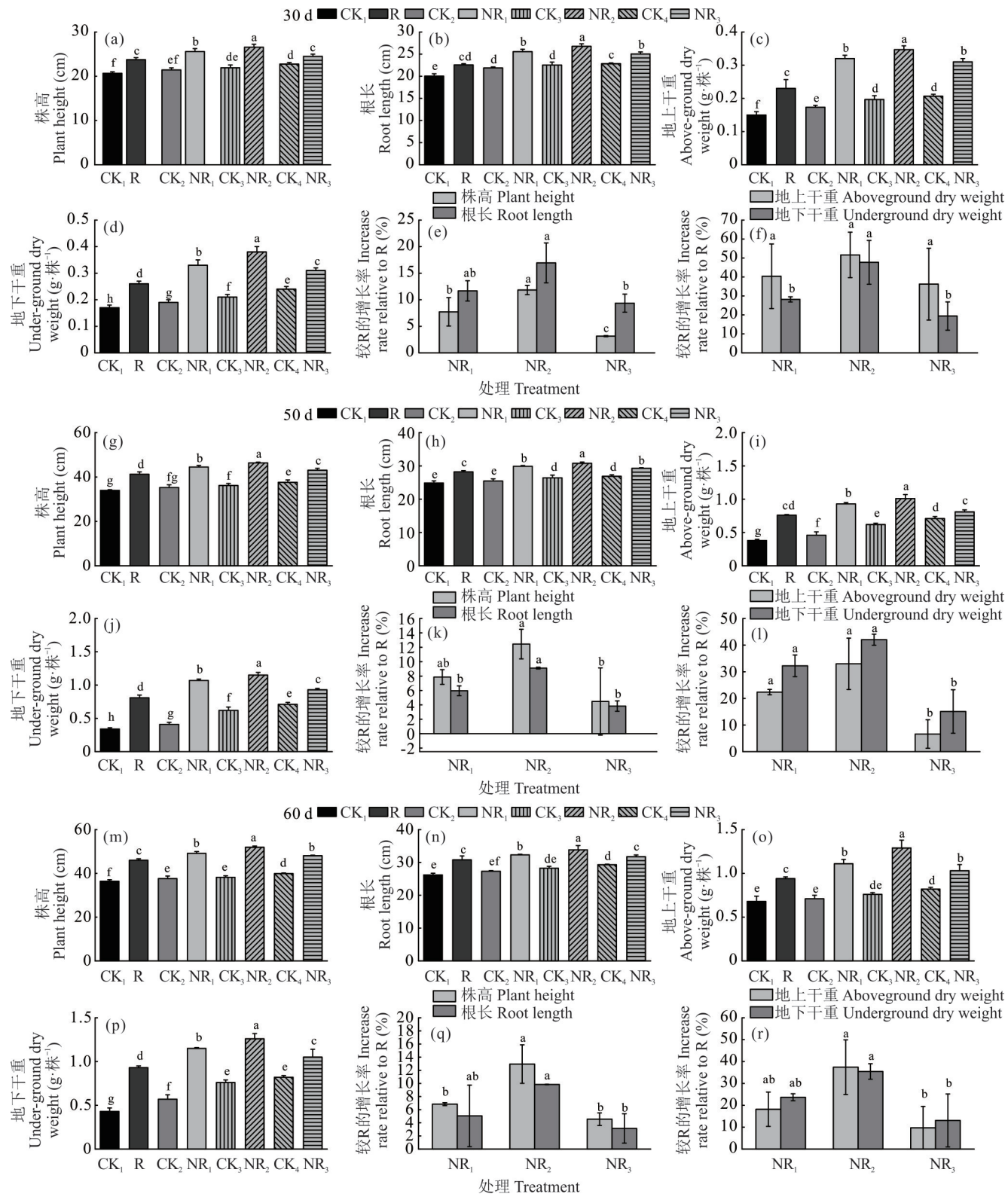


图3 甘农9号-LL2共生系统在不同氮素水平下的表型变化

Fig. 3 Phenotypic changes of the Gannong No. 9-LL2 symbiotic system under different nitrogen levels

小写字母表示同一时期内不同处理间差异显著($P<0.05$)；CK_1：N 0 kg·hm^{-2}未接种根瘤菌LL2处理；CK_2：N 35.09 kg·hm^{-2}未接种根瘤菌LL2处理；CK_3：N 46.79 kg·hm^{-2}未接种根瘤菌LL2处理；CK_4：N 58.48 kg·hm^{-2}未接种根瘤菌LL2处理。下同。Different lowercase letters indicate significant differences among treatments within the same stage ($P<0.05$); CK_1: Nitrogen 0 kg·ha^{-1} without inoculation of rhizobium LL2; CK_2: Nitrogen 35.09 kg·ha^{-1} without inoculation of rhizobium LL2; CK_3: Nitrogen 46.79 kg·ha^{-1} without inoculation of rhizobium LL2; CK_4: Nitrogen 58.48 kg·ha^{-1} treatment without inoculation of rhizobium LL2. The same below.

61.97%、180.49%、238.23%。与R相比，NR_2的地下干重增长率为42.04%，显著高于NR_3（$P<0.05$）。由图3p和图3r可知，在60 d时，NR_2处理下甘农9号-根瘤菌LL2共生系统的地下干重最重（1.26 g·株$^{-1}$），与其他处理差异显著（$P<0.05$），相较于NR_1、NR_3、R、CK_3、CK_4、CK_2、CK_1分别提高9.57%、20.00%、35.48%、65.79%、53.66%、121.05%、193.02%。与R相比，NR_2的地下干重增长率为35.43%，显著高于NR_3（$P<0.05$）。

2.3 不同氮素水平下甘农9号-LL2共生系统的饲草营养品质动态

2.3.1 粗蛋白含量　如图4a和图4e所示，在30 d时，CK_1的粗蛋白含量最低（12.28%），CK_2、CK_3、CK_4的粗蛋白含量相比于CK_1分别提高0.73%、1.47%、1.79%，R的粗蛋白含量相比于CK_2、CK_3、CK_4分别提高22.18%、21.30%、20.91%。与R相比，NR_1、NR_2、NR_3的粗蛋白增长率分别为4.58%、8.71%、2.40%。如图4g和图4k所示，第50天时，NR_2的粗蛋白含量最高（18.66%），NR_1、NR_3、R、CK_2、CK_3、CK_4、CK_1的粗蛋白含量相对于NR_2分别降低了3.27%、4.66%、5.68%、25.83%、24.87%、22.99%、26.26%。与R相比，NR_1、NR_2、NR_3的粗蛋白增长率分别为2.53%、6.06%、1.14%。如图4m和图4q所示，第60天时，NR_2的粗蛋白含量最高（20.42%），与其他各处理差异显著（$P<0.05$），R处理较CK_2、CK_3、CK_4、CK_1分别提高了27.07%、25.28%、21.62%、27.68%。与R相比，NR_1、NR_2、NR_3的粗蛋白增长率分别为3.94%、9.04%、1.88%，NR_2的粗蛋白增长率显著高于NR_3（$P<0.05$）。

2.3.2 粗脂肪含量　如图4b、图4h和图4n所示，在30～60 d期间，各个处理的粗脂肪含量均没有显著差异。

2.3.3 中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量　由图4c和图4f可知，在第30天时，CK_1的中性洗涤纤维含量最低（33.35%），CK_2、CK_3、CK_4的中性洗涤纤维含量相比于CK_1分别提高了1.38%、1.92%、2.94%，R的中性洗涤纤维含量相比于CK_2、CK_3、CK_4分别提高了4.85%、4.30%、3.26%。与R相比，NR_1、NR_2和NR_3的中性洗涤纤维增长率分别为－1.32%、－2.31% 和－1.27%。由图4i和图4l可知，在50 d时，CK_1的中性洗涤纤维含量最低（37.57%），CK_2、CK_3、CK_4的中性洗涤纤维含量相比于CK_1分别提高了2.00%、2.58%、3.46%，R的中性洗涤纤维含量比CK_2、CK_3、CK_4分别提高了6.91%、6.05%、5.15%。与R相比，NR_1、NR_2和NR_3的中性洗涤纤维增长率分别为－3.65%、－3.82% 和0.00%，NR_3与NR_1、NR_2存在显著差异（$P<0.05$）。由图4o和图4r可知，在60 d时，R的中性洗涤纤维含量最高（41.91%），相比于CK_1、CK_2、CK_3、CK_4分别提高了6.26%、6.67%、5.22%、4.28%。与R相比，NR_1、NR_2和NR_3的中性洗涤纤维增长率分别为－2.94%、－3.27% 和－0.31%，NR_3与NR_1、NR_2存在显著差异（$P<0.05$）。

由图4d和图4f可知，在30 d时，CK_1的酸性洗涤纤维含量最低（26.87%），R的酸性洗涤纤维含量比CK_1、CK_2、CK_3、CK_4分别提高了4.54%、3.81%、2.52%、1.19%。与R相比，NR_1、NR_2和NR_3的酸性洗涤纤维增长率分别为－0.44%、－0.58% 和0.05%。由图4j和图4l可知，在50 d时，CK_1的酸性洗涤纤维含量最低（31.01%），R的酸性洗涤纤维含量比CK_1、CK_2、CK_3、CK_4分别提高了11.77%、10.45%、8.75%、7.47%。与R相比，NR_1、NR_2和NR_3的酸性洗涤纤维增长率分别为－4.33%、－6.03% 和－2.05%，NR_3显著高于NR_1和NR_2（$P<0.05$）。由图4p和图4r可知，在60 d时，R的酸性洗涤纤维含量最高（35.77%），比CK_1、CK_2、CK_3、CK_4分别提高了8.53%、8.72%、6.78%、4.71%。与R相比，NR_1、NR_2和NR_3的酸性洗涤纤维增长率分别为－1.95%、－4.25% 和－1.60%，NR_2显著低于NR_1和NR_3（$P<0.05$）。

2.3.4 甘农9号-LL2共生系统的饲草分级指数　如表2所示，在第60天，NR_2的FGI值最高，为54.91 MJ·d^{-1}，CK_3的FGI值最低，为42.21 MJ·d^{-1}。CK_1、CK_2、CK_3、CK_4、R、NR_1、NR_3的FGI值在42.21～51.12 MJ·d^{-1}。所有处理的饲草等级划分中，NR_2为特级，其余处理均为1级。

3 讨论

3.1 不同氮素水平下甘农9号-LL2共生系统结瘤固氮的动态差异

根瘤菌与豆科植物结瘤形成共生体系是自然界中最有效的生物固氮体系之一，其结瘤及共生固氮效果均不同程度地受土壤环境中的生物和非生物因素的影响。土壤中的化合态氮素含量是影响根瘤菌固氮效果的一个关键因素，植物根际优先吸收环境中的化合态氮，而不合理的氮肥施用将抑制根瘤的形成并降低其固氮能力[26－27]。

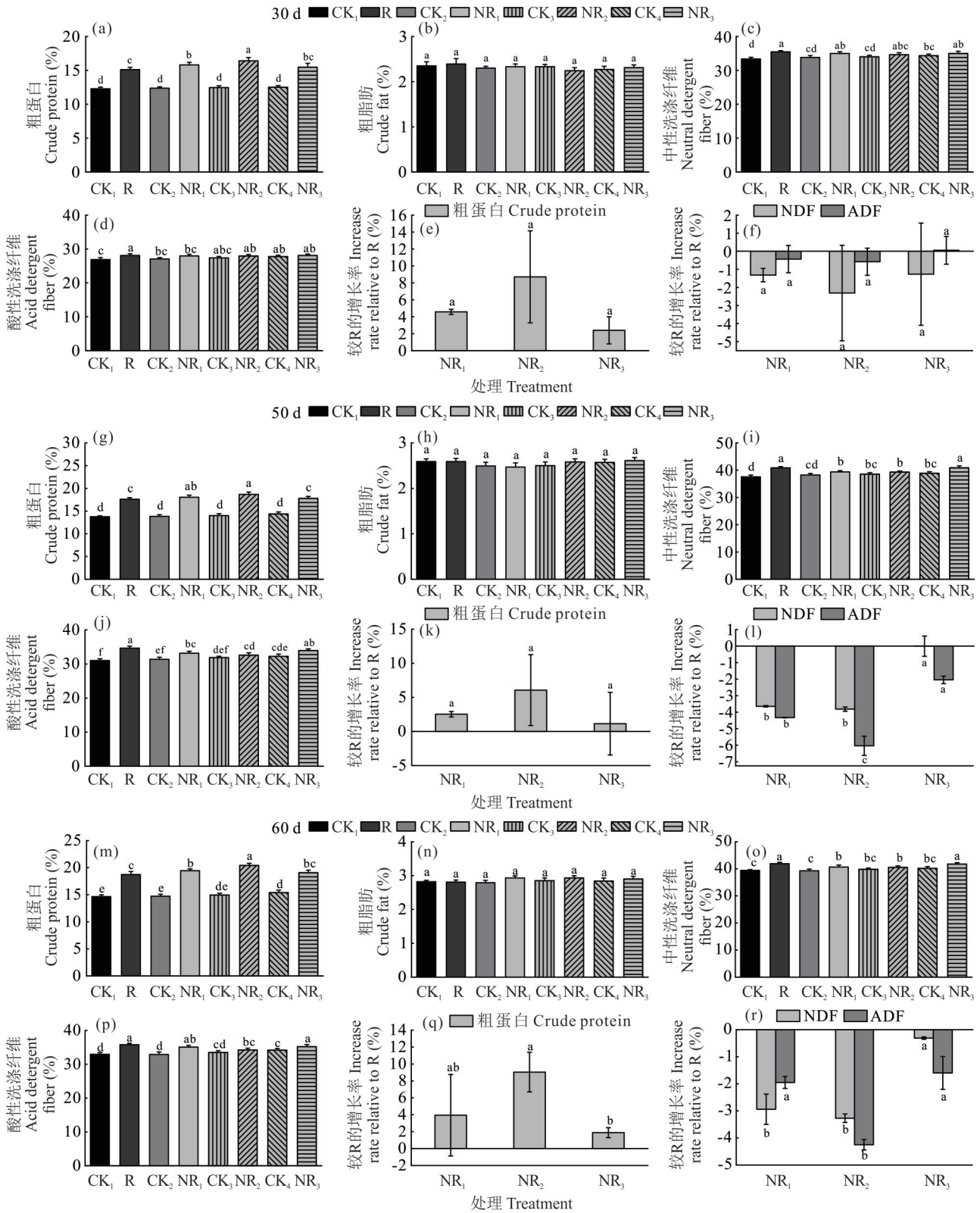


图4 不同氮素水平下甘农9号-LL2共生系统的营养品质变化

Fig. 4 Nutritional quality changes of the Gannong No. 9-LL2 symbiotic system under different nitrogen levels

本研究发现在分枝期，NR_2处理下甘农9号-LL2共生系统的单株有效根瘤数、单株有效根瘤重与固氮酶活性均高于NR_1、NR_3，这表明在紫花苜蓿生长期间，适当施用氮肥能够促进苜蓿根系的发育，提高其对养分的吸收，从而为根瘤菌的侵染与结瘤创造了有利的条件[28]。合理的氮肥用量可实现以氮换碳、以氮促碳的效果，增强植株的光合

能力及根系发育，为根瘤菌侵染、结瘤提供有利条件[29-30]。而 NR_3 处理下甘农 9 号-LL2 共生系统的单株有效根瘤数、单株有效根瘤重与固氮酶活性均有所降低。表明氮肥施用过多会影响根瘤菌对根毛的侵染，使根瘤数目减少，类菌体的固氮酶活性受到抑制[26]。本研究发现从分枝期到初花期，单株有效根瘤数、单株有效根瘤重与固氮酶活性都呈逐渐增加的趋势，这可能是随着生长发育，共生系统对氮素的需求更大，诱导结瘤并促进根瘤生长，进而提高固氮酶活性[31]。NR_2 的单株有效根瘤数、单株有效根瘤重与固氮酶活性均显著高于 R、NR_1、NR_3，说明适宜氮素可以优化共生系统的结瘤能力，激发其固氮潜力。

表 2　初花期 8 个处理的饲草分级指数级别

Table 2　Forage grading index grades of 8 treatments

处理 Treatments	饲草分级指数 Forage grading index ($MJ \cdot d^{-1}$)	饲草分级指数级别 Forage grading index grade
CK_1	42.67	1级 Grade 1
R	45.80	1级 Grade 1
CK_2	43.30	1级 Grade 1
CK_3	42.21	1级 Grade 1
CK_4	42.25	1级 Grade 1
NR_1	51.12	1级 Grade 1
NR_2	54.91	特级 Special grade
NR_3	47.46	1级 Grade 1

3.2　不同氮素水平下甘农 9 号-LL2 共生系统营养品质的动态变化

氮是构成植物叶绿素、蛋白质、核酸和激素等成分的重要元素之一，对豆科植物的生长发育具有十分重要的意义[32]。通过接种根瘤菌，可以使植株获得有效的固氮作用，从而提高紫花苜蓿的养分含量。产量的增加主要是由于同化物的积累，而品质的提高是由于同化物在不同物质之间的转换[33]。而营养物质成分是衡量紫花苜蓿品质的重要指标，其中 CP 含量高，NDF 和 ADF 含量低的苜蓿具有较高的营养价值；相反，则营养价值较低[34]。本研究表明在播种后 30～60 d，各施氮处理的粗蛋白与粗脂肪含量呈逐渐增加的趋势，粗蛋白与粗脂肪含量在 60 d 达到最高，中性洗涤纤维与酸性洗涤纤维含量呈逐渐增加的趋势。Lamb 等[35]也有类似的发现。本研究发现在播种后 30～60 d，NR_1、NR_2、NR_3 的粗蛋白含量较其他处理高，这可能与共生固氮提供的氮素与外源氮协同促进蛋白质合成有关[36]。结果表明，NR_2 的粗蛋白含量高于 NR_1、NR_3。因此，适当施用氮肥的粗蛋白含量高于不施氮，而过量施用氮肥却使其生物量和粗蛋白含量整体降低，这与前人的研究结果吻合[14,37-38]。通过对比 NR_2 与 R 的粗蛋白、中性洗涤纤维和酸性洗涤纤维含量，表明适量氮肥可以有效地提升苜蓿中粗蛋白的含量，降低 NDF 和 ADF 的含量[39]，本研究结论与其一致。

3.3　不同氮素水平下甘农 9 号-LL2 共生系统促生效应的动态差异

地上生物量是衡量紫花苜蓿生产性能的重要指标[40]，本研究显示适量施氮（NR_2 处理，46.79 $kg \cdot hm^{-2}$）显著促进了甘农 9 号-LL2 共生系统的株高、根长和生物量积累。在 30～60 d 生育期内，NR_2 处理的株高和根长较对照表现出显著优势，且地上与地下生物量积累均优于其他处理。这一趋势与 Herridge 等[41]的研究结果一致，表明适量氮素可通过促进根系发育，为根瘤侵染与结瘤提供有利的条件。随着固氮能力的增加，生物量同步增加，这可能是共生固氮效率增强后，平衡生物量和整体营养价值的结果[37]。

4　结论

施氮量为 46.79 $kg \cdot hm^{-2}$ 显著提升了甘农 9 号紫花苜蓿-LL2 共生系统的结瘤固氮能力与促生效应。46.79 $kg \cdot hm^{-2}$ 处理下，单株有效根瘤数、单株有效根瘤重及固氮酶活性随生育进程持续增强，初花期达到高值，并显著促进株高、根长及干物质积累，同时提高粗蛋白含量、降低中性与酸性洗涤纤维含量，提高饲草品质。NR_2 的促生与固氮效应在分枝期最为突出，而改善纤维含量和提高粗蛋白的效果分别在现蕾期和初花期最显著。初花期饲草分级指数达到特级水平，优于其他处理。46.79 $kg \cdot hm^{-2}$ 为优化甘农 9 号-LL2 共生系统生产力的适宜施氮量，为构建高效苜蓿－根瘤菌共生系统提供了重要的理论依据。

参考文献 References：

[1] He L. Study on the symbiotic nitrogen-fixing effect of alfalfa cultivars 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.

[2] Yang Q Y, Jie X L, Hua D L, *et al*. Effect of B, Mn and Mo combined application on grass yield and mineral element absorption of alfalfa. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(5): 182—185.
杨秋云, 介晓磊, 化党领, 等. 硼锰钼配施对紫花苜蓿草产量和矿物质元素吸收的影响. 中国农学通报, 2009, 25(5): 182—185.

[3] Zhang C M, Wang C Z, Hu X F, *et al*. Research progress on the nutritional value and applications of alfalfa. China Feed, 2005(1): 15—17.
张春梅, 王成章, 胡喜峰, 等. 紫花苜蓿的营养价值及应用研究进展. 中国饲料, 2005(1): 15—17.

[4] Zhu T Q. Study on establishment of alfalfa phosphorus efficiency evaluation system and difference metabolism in nitrogen and phosphorus. Lanzhou: Gansu Agricultural University, 2018.
朱天琦. 紫花苜蓿磷效率评价体系建立及其氮磷代谢差异研究. 兰州: 甘肃农业大学, 2018.

[5] Yan W. Screening of rhizobium strains matched with *Medicago varia* Martyn cv. Caoyuan No. 3 in three pilot planting areas. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2018.
闫伟. 草原3号杂花苜蓿在3个试点区适宜根瘤菌株的筛选. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2018.

[6] Pavlo A, Leonid O, Iryna Z, *et al*. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). Biological Control, 2011, 56(1): 43—49.

[7] Miliute I, Buzaite O, Baniulis D, *et al*. Bacterial endophytes in agricultural crops and their role in stress tolerance: A review. Zemdirbyste-Agriculture, 2015, 102(4): 465—478.

[8] Liu R, Li C, Zhang Y J, *et al*. Enhanced biological nitrogen fixation and nodulation in alfalfa through the synergistic interactions between *Sinorhizobium meliloti* and *Priestia aryabhattai*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2025, 41(6): 180.

[9] Provorov N, Saimnazarov U, Tanriverdiev T, *et al*. The contributions of plant and bacteria genotypes in the growth and nitrogen accumulation of inoculated alfalfa. Plant and Soil, 1994, 164(2): 213—219.

[10] 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: Clemson University, 2012.

[11] 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.

[12] Qu X Y, Kang W J, Guan J, *et al*. Differences in leaf characteristics, photosynthetic characteristics and yield traits between different varieties of alfalfa and rhizobia strains under symbiotic conditions. Grassland and Turf, 1—30 [2025-09-10].
屈欣怡, 康文娟, 关键, 等. 不同品种紫花苜蓿与根瘤菌株共生状态下叶特征、光合特性与产量性状的差异. 草原与草坪, 1—30[2025-09-10].

[13] Yao Y B, Zhang S Q, Chai Y S, *et al*. Study on nitrogen accumulation characteristics of soybean varieties in different growth periods. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2021(5): 169—175.
姚玉波, 张树权, 柴永山, 等. 不同生育期大豆品种氮素积累特性研究. 中国土壤与肥料, 2021(5): 169—175.

[14] Kamran M, Yan Z G, Chang S H, *et al*. Enhancing resource use efficiency of alfalfa with appropriate irrigation and fertilization strategy mitigate greenhouse gases emissions in the arid region of Northwest China. Field Crops Research, 2022, 289: 108715.

[15] Wang Q, Ji S R, Shen Y X. Interactive effects of soil moisture and nitrogen application rate on seedling growth of alfalfa. Acta Prataculturae Sinica, 2017, 26(12): 48—55.
王茜, 纪树仁, 沈益新. 土壤水分和施氮水平对紫花苜蓿苗期生长的互作效应分析. 草业学报, 2017, 26(12): 48—55.

[16] Lv Y R, Wang J H, Yin M H, *et al*. Effects of planting and nitrogen application patterns on alfalfa yield, quality, water-nitrogen use efficiency, and economic benefits in the yellow river Irrigation region of Gansu Province, China, Water, 2023, 15(2): 251.

[17] Tong C C, Liu X J, Wu Y, *et al*. Regulation of endogenous isoflavones on alfalfa nodulation and nitrogen fixation and nitrogen use efficiency. Acta Prataculturae Sinica, 2022, 31(3): 124—135.
童长春, 刘晓静, 吴勇, 等. 内源异黄酮对紫花苜蓿结瘤固氮及氮效率的调控研究. 草业学报, 2022, 31(3): 124—135.

[18] Gao L M, Su J, Tian Q, *et al*. Effects of nitrogen application on nitrogen accumulation and root nitrogenase activity in *Medicago sativa* at different soil water contents. Acta Prataculturae Sinica, 2020, 29(3): 130—136.
高丽敏, 苏晶, 田倩, 等. 施氮对不同水分条件下紫花苜蓿氮素吸收及根系固氮酶活性的影响. 草业学报, 2020, 29(3): 130—136.

[19] 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.

[20] Neumann U. Soil factors exhibit greater influence than bacterial inoculation on alfalfa growth and nitrogen fixation. FEMS Microbiology Ecology, 2011, 77(3): 590－599.

[21] 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.

[22] 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 and Energy Security, 2023, 12(4): e466.

[23] Zhang L Y. Feed analyses and quality test (the 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.

[24] 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.
张吉鹃, 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.

[25] 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.

[26] Bushby H V A. Colonization of rhizospheres by *Bradyrhizobium* sp. in relation to strain persistence and nodulation of some pasture legumes. Soil Biology and Biochemistry, 1993, 25(5): 597－605.

[27] Liu L, Zhou J C, Chen H K. The effect of different compound nitrogen concentration on the nodulation and nitrogen fixation in soybean. Scientia Agricultura Sinica, 1998, 31(4): 87－89.
刘莉, 周俊初, 陈华葵. 不同化合态氮浓度对大豆根瘤菌结瘤和固氮作用的影响. 中国农业科学, 1998, 31(4): 87－89.

[28] Liu X J, Ye F, Zhang X L. Effects of exogenous nitrogen forms on root characteristics of alfalfa at different growth stages. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(6): 53－63.
刘晓静, 叶芳, 张晓玲. 外源氮素形态对紫花苜蓿不同生育期根系特性的影响. 草业学报, 2015, 24(6): 53－63.

[29] Ci E, Gao M. Research advances in the effects of environmental factors on the symbiotic nitrogen fixation of legumes. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25(6): 1269－1274.
慈恩, 高明. 环境因子对豆科共生固氮影响的研究进展. 西北植物学报, 2005, 25(6): 1269－1274.

[30] Yan Y H, Yang W Y, Zhang X Q, *et al*. Effects of different nitrogen levels on photosynthetic characteristics, dry matter accumulation and yield of relay strip intercropping *Glycine max* after blooming. Acta Prataculturae Sinica, 2011, 20(3): 233－238.
闫艳红, 杨文钰, 张新全, 等. 施氮量对套作大豆花后光合特性、干物质积累及产量的影响. 草业学报, 2011, 20(3): 233－238.

[31] 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.

[32] Wang Q, Li S S, Li J R, *et al*. The utilization and roles of nitrogen in plants. Forests, 2024, 15(7): 1191.

[33] 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. Scientia Agricultura Sinica, 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.

[34] Ma H X, Jiang P, Zhang X J, *et al*. Effects of nitrogen fertilization combined with subsurface irrigation on alfalfa yield, water and nitrogen use efficiency, quality, and economic benefits. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1339417.

[35] Lamb J F S, Sheaffer C C, Samac D A. Population density and harvest maturity effects on leaf and stem yield in alfalfa. Agronomy Journal, 2003, 95(3): 635－641.

[36] Silvente S, Blanco L, Camas A, *et al*. *Rhizobium etli* mutant modulates carbon and nitrogen metabolism in *Phaseolus vulgaris*

nodules. Molecular Plant-Microbe Interaction, 2002, 15(7): 728－733.

[37] Kozyreva M Y, Basieva L Z, Nagham A N, *et al*. Growth and development of alfalfa depending on the type of nitrogen nutrition. BIO Web of Conferences, 2020, 23: 03007.

[38] Hakl J, Kunzov E, Tocauerov S, *et al*. Impact of long-term manure and mineral fertilization on yield and nutritive value of lucerne (*Medicago sativa*) in relation to changes in canopy structure. European Journal Agronomy, 2021, 123: 126219.

[39] Liu X J, Zhang J X, Li W Q, *et al*. Effects of fertilization and mowing on alfalfa yield and quality in arid regions. Journal of Desert Research, 2014, 34(6): 1516－1526.
刘晓静, 张进霞, 李文卿, 等. 施肥及刈割对干旱地区紫花苜蓿产量和品质的影响. 中国沙漠, 2014, 34(6): 1516－1526.

[40] Zhan J S, Liu M M, Zhao G Q. Effects of flavonoids and their application in ruminants. China Feed, 2014(23), 13－15.
占今舜, 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.

[41] Herridge D F, Peoples M B, Boddey R M. Global inputs of biological nitrogen fixation in agricultural systems. Plant and Soil, 2008, 311(1/2): 1－18.