

DOI: 10.13758/j.cnki.tr.2023.02.009

王孟佳, 冯向前, 马横宇, 等. 水稻-冬季秸秆覆盖种植马铃薯模式对水稻齐穗期根际土壤代谢组表达特征的影响. 土壤, 2023, 55(2): 295–304.

水稻-冬季秸秆覆盖种植马铃薯模式对水稻齐穗期根际土壤代谢组表达特征的影响^①

王孟佳¹, 冯向前^{1,2}, 马横宇¹, 刘元辉¹, 褚光¹, 徐春梅¹, 章秀福¹, 王丹英¹, 陈松^{1*}

(1 水稻生物学国家重点实验室(中国水稻研究所), 杭州 311400; 2 长江大学农学院, 湖北荆州 434025)

摘要: 水稻-冬季秸秆覆盖种植马铃薯是南方稻区一种经济高产的水-旱轮作模式, 其对水稻根际土壤代谢物的影响可能是调控水稻高产的关键, 但目前相关研究尚未见报道。本研究基于周年水-旱轮作模式长期定位试验, 以水稻-冬季空闲(CK)模式为对照和水稻-马铃薯(稻草覆盖种植并还田, RP)轮作模式为研究对象, 采集水稻齐穗期根际土壤样品, 利用液相色谱-质谱法(LC-MS)测定根际土壤代谢物种类与丰度, 研究 RP 轮作模式水稻齐穗期根际土壤代谢物组分和功能及其与产量形成的关系。结果表明: ①采用 OPLS-DA 模型筛选差异代谢物(HMDB 数据库)发现, 与 CK 模式相比, RP 轮作模式具有 201 个有显著性差异($P < 0.05$)的根际土壤代谢物, 分别归属于脂质和类脂分子、有机酸及衍生物、有机氧化合物、苯丙烷和聚酮等 11 个父类; 其中苯丙烷和聚酮、丙烯醇脂质、苯及其衍生物、甾体内酯、氨基酸/肽、碳水化合物和脂肪酰糖苷等代谢物丰度发生显著变化, 可作为表征 RP 轮作模式下水稻根际土壤差异性代谢物; ②有机氧化合物、有机酸及衍生物和苯丙烷和聚酮等代谢物丰度与土壤有机质、全钾、碱解氮和速效钾含量差异呈显著正相关($r = 0.816 \sim 0.938$), 其可通过为水稻直接提供养分、协助提高土壤养分供给或间接调节水稻生长等提高稻田综合生产力; ③核苷/核苷酸、脂质和类脂分子等差异代谢物与水稻产量差异呈显著正相关($r = 0.957 \sim 0.999$), 其可能是通过参与一系列代谢途径提高水稻抗逆能力, 最终对水稻产量产生一定影响。

关键词: 水稻根际; 代谢组; 轮作; 秸秆还田

中图分类号: S210.50 文献标志码: A

Effects of Rice-potato with Straw Mulch in Winter on Soil Metabolite Expression in Rice Rhizosphere at Full-heading Stage

WANG Mengjia¹, FENG Xiangqian^{1,2}, MA Hengyu¹, LIU Yuanhui¹, CHU Guang¹, XU Chunmei¹, ZHANG Xiufu¹, WANG Danying¹, CHEN Song^{1*}

(1 State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 311400, China; 2 College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: Rice-potato with straw mulch in winter is an economical and high-yield paddy-upland rotation system in southern China, and its effects on soil metabolites in rhizosphere may be the key to achieve the rice yield potential but it is still unclear. Based on a long-term experiment of paddy-upland rotation (since 2003 Fuyang of Zhejiang), the rice-fallow (CK) was set as control and composition and possible function of soil rhizosphere metabolites of rice-potato (straw mulch and return, RP) were evaluated. The rhizosphere soil samples were collected at full heading stage using “root bags” and evaluated by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). The results show that: 1) By using the OPLS-DA model, 201 different expressed rhizosphere soil metabolites (VIP > 1 and $P < 0.05$) are screened out under the RP rotation, as compared to that under CK, and these metabolites are attributed to 11 super-class, such as lipids and lipid-like molecules, organic acids and derivatives, organic oxygen compounds, etc. (based on HMDB database). In addition, the abundances of phenylpropanoids and polyketides, prenol lipids, benzene and substituted derivatives, steroid lactones, amino acids/peptides, carbohydrates and fatty acyl glycosides are changed significantly in response to the change of rotation from CK to RP, which indicate that these metabolites could be used as characteristics traits of rhizosphere soil metabolites of rice to distinguish the RP rotation from CK. 2) Organic oxygen compounds,

①基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY22C130001)、浙江省重点研发计划项目(2022C02008)和国家自然科学基金项目(32172106)资助。

* 通讯作者(chensong02@caas.cn)

作者简介: 王孟佳(1997—), 女, 河南卢氏人, 硕士研究生, 主要从事稻田土壤根际活性有机碳组分研究。E-mail: wmj15837605820@163.com

organic acids and derivatives, phenylpropanoids and polyketides have significant positive correlation with the differences of soil organic matter, total potassium, available nitrogen and available potassium ($r=0.816-0.938$), which not only provide the nutrient matter directly or indirectly, but also assist in promoting the rice growth. 3) Phenylpropanoids and polyketides, nucleosides/nucleotides and analogues, lipids and lipid-like molecules, which have significant positive correlation with rice grain yield ($r=0.957-0.999$), might improve the stress resistance of rice by participating in a series of metabolic pathways.

Key words: Rice rhizosphere; Metabolites; Rotation; Straw returning

冬季稻草覆盖种植马铃薯-水稻轮作是一种生态经济的种植模式,在有效利用资源和养分的前提下,有助于作物稳产高效^[1],因而在生产上受到广大农户欢迎。该模式集成冬季作物轮作与秸秆覆盖和翻耕还田,不仅可以有效提高土壤理化性质,还能显著改善土壤环境和微生物活性,有利于土壤养分的释放和作物吸收利用,从而提高作物产量^[2],但目前对其稳产高效的土壤调控机理研究较少。另外,大量秸秆还田(即外源有机碳添加)为土壤提供复杂且稳定的有机质组分^[3],其活性有机质组分已被证实不仅可以培育各种土壤生物,协调与促进各项土壤生理生化过程,调控土壤各组分周转,还是协调有机质矿化和作物养分需求的关键角色^[4-6]。但土壤的时空不均衡性,决定了农田土壤会随着作物生长形成一个影响稻田有机质转化的特异性热区^[7],即水稻根际(rhizosphere)。该区域根系活跃且相对独立,不仅影响水稻对营养元素的吸收,还会通过累积的代谢产物导致根际效应^[8],进而影响周围环境与作物生长。因此,轮作变更导致的根际土壤代谢物组成与功能转变可能是解析冬季稻草覆盖种植马铃薯-水稻轮作模式稳产高效的关键。

水稻根际,一般指水稻根系周围直径约 4 mm、受根系活动影响的土壤区域。该区域代谢物组分包含根系分泌物和经根际土壤微生物代谢后产生的各类小分子物质,富含糖类、有机酸等化合物,对周围土壤、根际微生物、作物本身的生长发育及其抗病和抗逆能力等均会产生一定影响,还会触发根际土壤有机质的分解与转化^[9]。水稻生长中后期(尤其是穗发育期)根系活性特征,例如根系生长能力、根长、根体积、根部生物量及根际微生物益生菌群等方面对于产量形成具有重大意义^[10],而根际的活性有机代谢物则可能是影响以上根系活力的重要因素。因此,探究水稻穗发育期根际土壤活性有机代谢物特征至关重要。但是根际土壤中代谢物组分和丰度除受病原真菌侵害^[11]、外界胁迫^[12]、植物生长调节剂^[13]等因素的调控外,还在较大程度上与作物轮作模式密切相关^[14]。近年来随着科学技术的发展,有学者发现轮作可通过变更土壤环境对作物根际土壤代谢物组成

与丰度产生影响。例如 Lu 等^[15]利用气相色谱-质谱法(GC-MS)发现水稻-水稻-休耕和水稻-水稻-油菜轮作模式下根际土壤代谢物如烷烃、有机酸和苯类等物质丰度显著不同;而康益晨等^[16]对马铃薯研究发现与马铃薯连作相比,轮作蚕豆可减少根系分泌物中酯类物质,增加烃类、酮类、羧酸及胺类等物质。由此可见,不同轮作模式下作物根际土壤代谢物种类及丰度存在较大差异,了解不同轮作条件下根际土壤代谢物的表现特征对于维持稳定的轮作制度至关重要。然而目前有关根际土壤中各种功能性代谢物对轮作模式的响应的报道较少,其中对水稻-秸秆覆盖种植马铃薯轮作模式下水稻根际土壤代谢物变化的研究尚未见报道。

根际土壤代谢组是近年来新兴的聚焦根际土壤代谢物的高通量组学筛选技术,利用液相色谱-质谱法(LC-MS)可对系统内所含的小分子代谢物进行半定量分析,探究根际代谢物与作物生理-土壤养分变化间的关系,揭示系统内生理生态功能的状态,已广泛应用于微生物研究等领域^[17]。本研究以 2003 年在浙江富阳开始的水旱轮作模式长期定位试验为基础,以水稻-冬季空闲(CK)模式为对照、水稻-马铃薯(稻草覆盖种植并还田,RP)轮作模式为处理,采用“根袋法”采集水稻齐穗期根际土壤,利用 LC-MS 法研究长期 RP 轮作模式下,水稻齐穗期根际土壤差异代谢物的表现特征及其与水稻产量的潜在关系,以为水稻-马铃薯轮作模式稳产高效种植提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验地概况

试验于 2020 年在浙江省富阳市中国水稻研究所试验农场(120.2°E, 30.3°N, 海拔 11 m)进行。试验地属亚热带季风气候区,年均温约 18 °C,年日照时数 1 500 h 以上,年均降水量 1 700 mm 左右。2020 年移栽前 CK 模式土壤有机质 32.10 g/kg,全氮 2.30 g/kg,碱解氮 125.22 mg/kg,有效磷 30.90 mg/kg,速效钾 145.08 mg/kg, pH 5.88; RP 轮作模式土壤有机质 42.40 g/kg,全氮 2.50 g/kg,碱解氮 137.07 mg/kg,有效磷 102.56 mg/kg,速效钾 320.84 mg/kg, pH 5.79。

1.2 试验设计

本研究基于以水稻为主体的多种轮作模式结合冬季作物残体还田的长期定位试验(2003年至今),该长期定位试验采用裂区随机区组设计,以6种不同轮作模式为主区,水稻季不同施氮水平为副区,主区面积为160 m²(8 m×20 m),副区面积40 m²(8 m×5 m),3个田间区组重复,小区面积及位置常年固定。供试品种为嘉58,6月中旬手工移栽,行株距20 cm×20 cm,每穴2~3株,移栽前使用小型耕田机将冬作及秸秆残留还田。

本研究选择以水稻-冬闲(CK)模式为对照、水稻-稻草覆盖种植马铃薯(RP)轮作模式作为研究对象,其2018—2020年水稻产量及还田秸秆特性见表1,可以看出,RP轮作模式下水稻产量平均较CK模式升高18.01%。在前期研究的基础上,本研究再选择以水稻生育期不施氮(N0)处理作为研究对象,试验处理具体如下:在CK处理中,上茬水稻收割后移除全部秸秆,冬季闲田放置;在RP处理中,1月下旬田面摆放种薯后,覆盖稻草8~10 cm厚,施复合肥(N:P₂O₅:K₂O=15:15:15)600 kg/hm²,5月中旬收获块茎后将腐烂的稻草及马铃薯茎秆和根系残留翻耕还田。水稻生育期间不施氮肥,磷、钾肥分别以过磷酸钙和氯化钾为主,施用量分别为P₂O₅97.5 kg/hm²和K₂O 165 kg/hm²,磷肥全部基施,钾肥基:穗肥为5:5。其他田间栽培措施与当地高产栽培一致。

表1 近3年水稻产量及还田秸秆特性
Table 1 Rice yield and characteristics of straw returned in different years

年份	处理	水稻产量(t/hm ²)	还田秸秆量(kg/m ²)	秸秆 C/N
2018	CK	5.30 ± 1.02	—	—
	RP	6.92 ± 0.22	1.37 ± 0.15	35.76 ± 1.16
2019	CK	6.64 ± 0.47	—	—
	RP	7.60 ± 0.75	1.66 ± 0.16	32.57 ± 6.44
2020	CK	8.13 ± 0.54	—	—
	RP	8.86 ± 0.55	1.86 ± 0.10	35.23 ± 3.09

1.3 样品采集与测定分析

1.3.1 根际土壤的采集 于水稻移栽一周后使用PVC柱(直径20 cm)将水稻植株及根区(0~20 cm)土壤挖出放入根袋(200目,直径20 cm,深30 cm),再次埋入田中原位培养。至齐穗期挖出根袋及水稻,小心撕下根袋维持水稻根系完整,用力抖动水稻去除根部大部分土壤,刮取附着于根表的土壤即根际土,去除杂质后保存于-80℃冰箱待测。每个处理设3个田间重复,2个实验重复,共计6个重复。

1.3.2 根际土壤代谢物测定 样本处理如下:样本解冻后称取1 000 mg于2 mL离心管,加入6 mm研磨珠和1 000 μL甲醇/水(4:1, V/V)提取液,经冷冻组织研磨仪研磨6 min(-10℃, 50 Hz)后低温超声提取30 min(5℃, 40 kHz),于-20℃静置30 min,离心15 min(13 000 g, 4℃)后取上清液氮气吹干。在分析代谢物之前,取100 μL的乙腈/水(1:1, V/V)重新溶解样本,重复上述低温超声提取和离心步骤后取上清液上机分析。每个样本分别移取20 μL上清液,混合后作为质控样本(QC)。本试验采用AB SCIEX公司的超高效液相色谱串联飞行时间质谱UHPLC-Triple TOF系统对CK和RP处理根际代谢物进行分析。色谱条件:色谱柱为ACQUITY UPLC HSS T3(100 mm×2.1 mm i.d., 1.8 μm; Waters, Milford, USA);流动相A为95%水+5%乙腈(含0.1%甲酸),流动相B为47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含0.1%甲酸);流速为0.40 mL/min,进样量为10 μL,柱温为40℃。在仪器分析的过程中,每5个分析样本中插入一个QC样本,以考察整个检测过程的稳定性。采用电喷雾电离法(ESI)分别采用正、负离子扫描模式采集质谱信号。质谱参数见表2。

表2 质谱参数
Table 2 Mass spectrum parameters

描述	参数
扫描范围(m/z)	50~1 000
喷雾气(psi)	50
辅助加热气(psi)	50
气帘气(psi)	30
离子源温度(℃)	550
离子化电压(正极)(V)	5 000
离子化电压(负极)(V)	-4 000
接口加热	on
去簇电压(V)	80
碰撞能(eV)	40 ± 20
循环时间(ms)	510

1.4 数据整理与分析

本试验所有数据均使用Microsoft Excel 2010软件进行整理,采用代谢组学软件Progenesis QI进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐,最终得到一个含保留时间、峰强度等的矩阵,保留至少一组样品中非零值80%以上的变量,再用原始矩阵中最小值填补空缺值,并利用总和归一化法对样本质谱峰的响应强度进行归一化处理;同时删除QC样本相对标准偏差(RSD)>30%的变量,并进行

对数化(lg)处理,得到最终用于后续分析的数据矩阵;通过特征峰搜库鉴定,将 MS 和 MS/MS 质谱信息与 HMDB 4.0(<https://hmdb.ca/>)和 KEGG Release 2017-05-01(<https://www.genome.jp/kegg/>)代谢数据库进行匹配,MS 质量误差设置为小于 10^{-6} ,同时根据二级质谱匹配得分鉴定代谢物;采用 R 语言(1.6.2)进行多元统计分析,并对数据进行主成分分析(PCA)和正交偏最小二乘法分析(OPLS-DA),PCA 和 OPLS-DA 置信度 0.95, OPLS-DA 置换次数为 200;单因素方差分析(ANOVA, P value)绘制火山图;基于 HMDB 和 KEGG 数据库,鉴定、筛选、归类组间差异($P < 0.05$)代谢物,并采用 OriginPro 2021 对其绘

图;基于 KEGG Pathway Database(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)进行通路富集分析并绘图(<https://www.chiplot.online/>)。

2 结果

2.1 根际土壤代谢物的质谱图谱

正、负离子模式下 12 个土壤样本分别鉴定出 6 041 和 5 544 个有效峰,经处理后最终保留 5 641 和 5 260 个有效峰(图 1)。由图 1 可以看出,总离子色谱峰形良好,分布相对均匀。基于 HMDB 和 KEGG 数据库,共鉴定到可命名代谢物 661 个,其中 HMDB 数据库可鉴定到 598 个,KEGG 数据库 172 个。

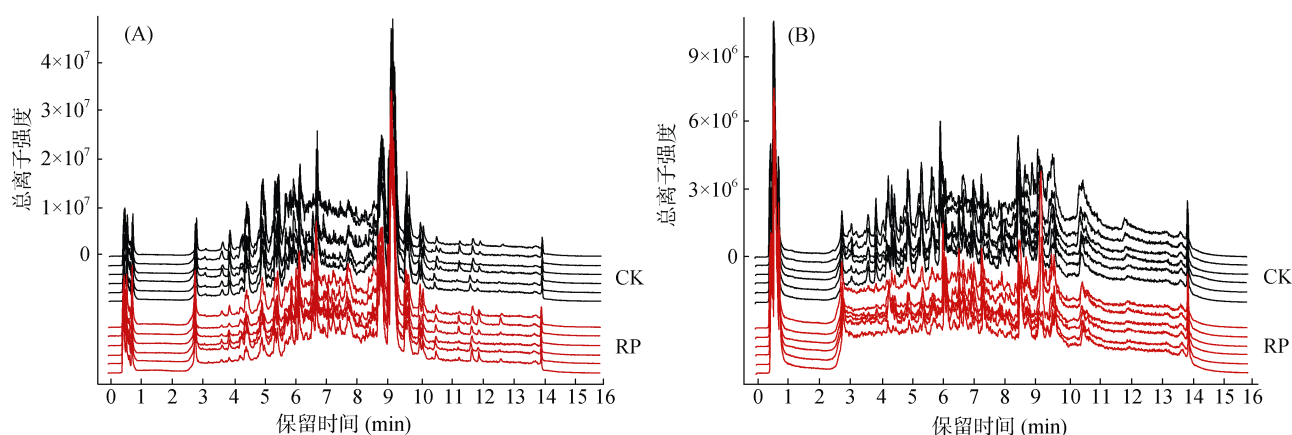


图 1 正离子(A)和负离子(B)模式下 12 个土样的重叠总离子流色谱图

Fig. 1 Overlapping total ion chromatograms of 12 soil samples in positive(A) and negative (B) ion modes

2.2 基于土壤代谢组的根际土壤代谢物主成分分析

对正、负离子模式下 CK 和 RP 处理代谢物进行主成分分析(图 2A、2B),可见,CK 和 RP 处理组间差异明显,样本间坐标点较为聚集,易于区分,所有坐标点均位于置信椭圆内,表明各样本均处于 95% 置

信度下,且组内样本相似性较高,数据处理可信度高。

2.3 根际土壤组间差异代谢物的筛选

采用 OPLS-DA 方法结合 VIP 值 (>1) 和差异表达倍数 (fold change, FC >1 或 <1),基于 HMDB 数据库对处理间差异代谢物进行筛选,共鉴定出 201 个具有显著性差异 ($P < 0.05$) 的代谢物,相对 CK 处理,RP

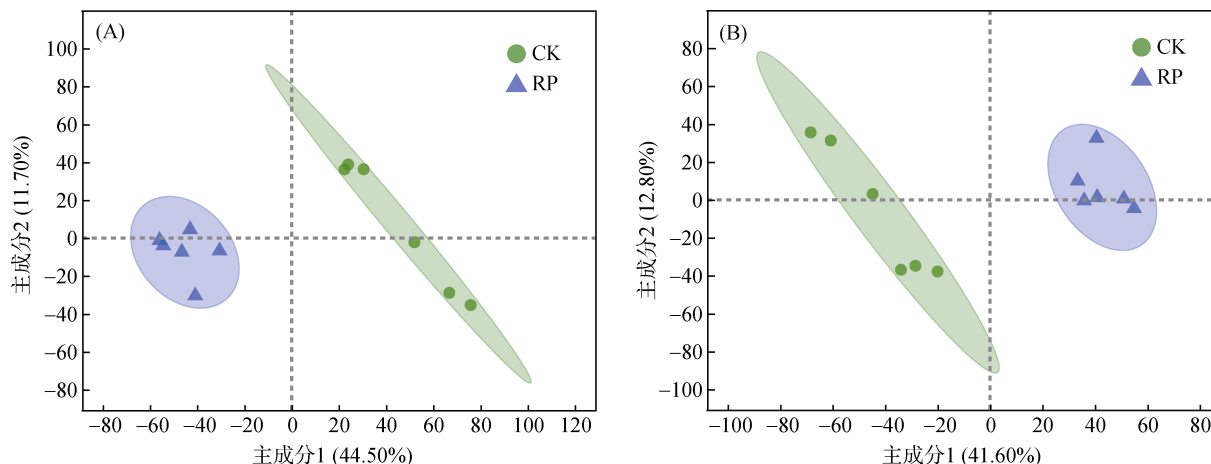
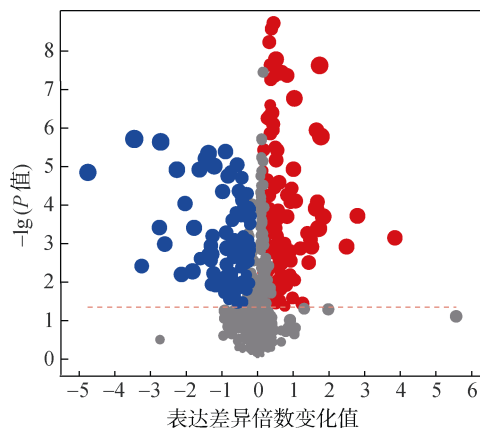


图 2 正离子(A)和负离子(B)模式下 CK 和 RP 处理组的 PCA 得分图

Fig. 2 Scores of PCA for group CK and RP in positive(A) and negative (B) ion modes

处理中表达差异上调的代谢物 112 个, 表达差异下调的代谢物 89 个(图 3)。差异代谢物分属于脂质和类脂分子、有机酸及衍生物、有机氧化合物、苯丙烷和聚酮、有机杂环化合物、苯环型化合物、核苷/核苷酸和类似物等 11 个父类(图 4A)。

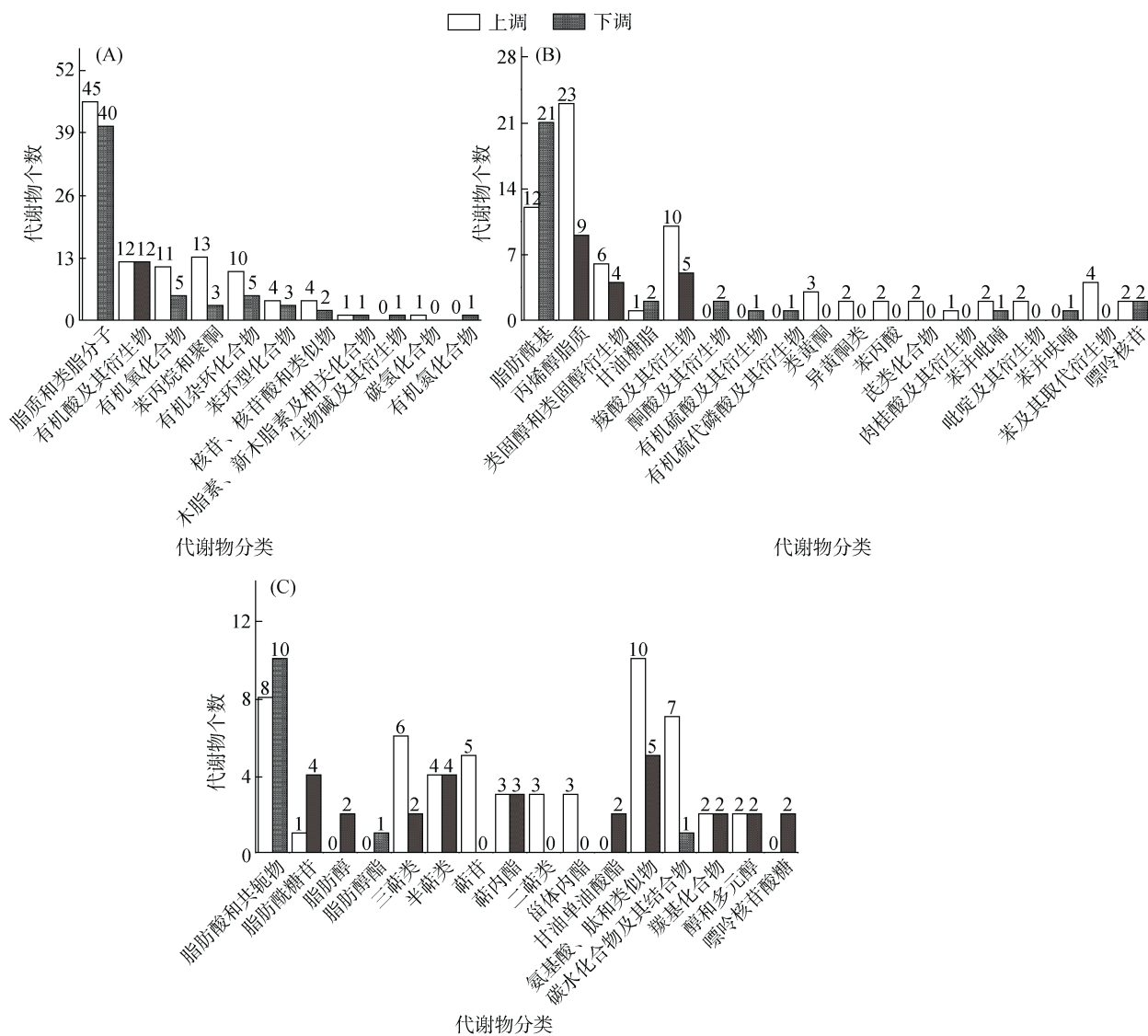
轮作处理后根际代谢物中变化最多的是脂质和类脂分子, 共含 85 个差异代谢物, 但其丰度提高和降低约各占一半(图 4A), 其中丰度下降的代谢物主要集中在脂肪酰糖苷、脂肪醇、脂肪醇酯、甘油单油酸酯、胆汁酸、醇和衍生物等子类; 丰度提高的丙烯醇脂质以子类代谢物三萜类、萜苷和二萜类为主, 另外甾体内酯子类代谢物丰度也明显提高(图 4C)。有机酸及衍生物中共有 24 个差异代谢物, 仅次于脂质和类脂分子, 其中丰度增加的代谢物主要集中在羧酸



(每个点代表一个特定的代谢物; 点的大小表示 VIP 值; 红色表示表达差异上调; 蓝色表示表达差异下调; 灰色表示无显著差异)

图 3 代谢物火山图

Fig. 3 Volcano map of metabolites



(A: 父类; B: 类; C: 子类)

图 4 HMDB 差异代谢物分类

Fig. 4 Different metabolites in HMDB classification

及其衍生物中的氨基酸/肽和类似物, 而下调代谢物则包括酮酸及其衍生物、有机硫酸及其衍生物和有机硫代磷酸及其衍生物(图 4B)。在差异性有机氧代谢物中, 碳水化合物及其结合物丰度明显增加(图 4C)。此外, 丰度明显提高的还包括苯丙烷和聚酮类化合物(包括类黄酮、异黄酮类、苯丙酸、芪类化合物、肉桂酸及其衍生物等)、有机杂环化合物(吡啶及其衍生物等)和苯及其取代衍生物等; 而丰度下降的主要是嘌呤核苷酸糖类代谢物(图 4)。

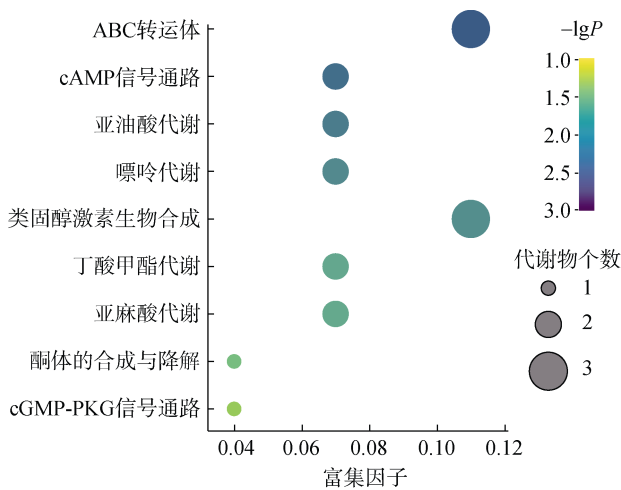
2.4 根际土壤差异代谢物代谢通路

将轮作处理后的 201 个差异代谢物对比 KEGG Pathway 数据库, 发现有 27 个差异代谢物分别注释在 28 条可能的通路上(表 3)。其中, 有 7 个差异代谢物参与各种脂肪酸代谢途径, 如花生四烯酸代谢、亚油酸代谢、 α -亚麻酸代谢和丁酸代谢, 其富集代谢物丰度存在差异。4 个差异性表达的核苷/核苷酸和类似物类代谢物中, 有 3 个除参与嘌呤或嘧啶代谢有关

的途径外, 还参与信号转导相关的途径, 如 ABC 转运子、cGMP-PKG 信号通路和 cAMP 信号通路途径; 此外, 除参与果糖和甘露糖代谢以及氨基糖和核苷酸糖代谢的 GDP-4-Dehydro-6-deoxy-D-mannose 丰度下调外, 其他代谢物丰度均表现为提高。另有 3、3 和 2 个代谢物分别参与到类固醇合成降解代谢(脂质和类脂分子及其他)、戊糖和葡萄糖醛酸转化途径(有机氧化合物以及脂质和类脂分子)、叶酸生物合成以及烟酸和烟酰胺代谢等代谢途径(有机杂环化合物), 且后 3 条代谢通路涉及的 5 个代谢物均表现为丰度提高。此外, 差异性表达代谢物还与萜类代谢、谷氨酰胺与谷氨酰胺代谢、氨基苯甲酸降解、甘油磷脂代谢等相关。利用拓扑学算法“Relative-betweenness centrality”对相关差异代谢物进行代谢通路富集分析, 发现共计 9 条代谢途径显著富集($P < 0.05$, 图 5), 包括信号传导途径和嘌呤类代谢、脂肪酸(丁酸、亚油酸、亚麻酸)代谢、类固醇激素生物合成等。

表 3 KEGG 代谢物涉及功能通路汇总
Table 3 Summary of functional pathways involved in KEGG metabolites

序号	代谢物	HMDB 父类	差异	代谢通路
1	Guanosine	核苷、核苷酸和类似物	上调	嘌呤代谢, ABC 转运子
2	Deoxyadenosine	核苷、核苷酸和类似物	上调	嘌呤代谢, ABC 转运子, cGMP-PKG 信号通路, cAMP 信号通路
3	Deoxycytidine	核苷、核苷酸和类似物	上调	嘧啶代谢, ABC 转运子
4	GDP-4-Dehydro-6-deoxy-D-mannose	核苷、核苷酸和类似物	下调	果糖和甘露糖代谢, 氨基糖和核苷酸糖代谢
5	(R)-3-Hydroxybutyric acid	有机酸及衍生物	下调	酮体的合成和降解, 丁酸代谢, cAMP 信号通路
6	4-Hydroxybutyric acid	脂质和类脂分子	下调	丁酸代谢
7	20-Hydroxyeicosatetraenoic acid	脂质和类脂分子	下调	花生四烯酸代谢
8	12, 13-DHOME	脂质和类脂分子	上调	亚油酸代谢
9	9(S)-HpODE	脂质和类脂分子	下调	亚油酸代谢
10	Traumatic acid	脂质和类脂分子	上调	α -亚麻酸代谢
11	Traumatins	脂质和类脂分子	下调	α -亚麻酸代谢
12	7 α -Hydroxydehydroepiandrosterone	脂质和类脂分子	下调	类固醇激素生物合成
13	Dehydroepiandrosterone sulfate	脂质和类脂分子	上调	类固醇激素生物合成
14	Trans-Dehydroandrosterone	其他	下调	类固醇激素生物合成, 类固醇降解
15	Octanoylglucuronide	有机氧化合物	上调	戊糖和葡萄糖醛酸转化
16	2-Phenylethanol glucuronide	有机氧化合物	上调	戊糖和葡萄糖醛酸转化
17	Tetrahydroaldosterone-3-glucuronide	脂质和类脂分子	上调	戊糖和葡萄糖醛酸转化
18	Tetrahydrofolyl-[Glu](n)	有机杂环化合物	上调	叶酸生物合成
19	Niacinamide	有机杂环化合物	上调	烟酸和烟酰胺代谢
20	Hexadecanedioic acid	脂质和类脂分子	下调	角质、木栓碱和蜡的生物合成
21	Glycerophosphocholine	脂质和类脂分子	上调	甘油磷脂代谢, 乙醚脂质代谢
22	Farnesylcysteine	脂质和类脂分子	下调	萜类主链生物合成
23	Poly-g-D-glutamate	有机酸及衍生物	上调	D-谷氨酰胺和 D-谷氨酸代谢
24	Diethylthiophosphate	有机酸及衍生物	下调	氨基苯甲酸降解
25	Anatabine	有机氮化合物	下调	(托品烷、哌啶、吡啶, 鸟氨酸、赖氨酸和烟酸衍生) 生物碱的生物合成
26	Gibberellin A24	其他	上调	二萜生物合成
27	2-Hydroxyethylphosphonate	其他	上调	磷酸盐和磷酸盐代谢, 各种次生代谢产物的生物合成-第 2 部分



(富集因子为富集在该通路的代谢物个数与富集在 28 条通路中总代谢物个数 27 的比值)

图 5 KEGG 富集分析气泡图

Fig. 5 Bubble chart of KEGG pathway enrichment analysis

总体而言，水稻-马铃薯轮作后水稻根际土壤中差异代谢物涉及的代谢通路中脂肪酸类代谢最多，且富集到各通路的代谢物个数及丰度不同。参与嘌呤和嘧啶类代谢、ABC 转运子、戊糖和葡萄糖醛酸转化等途径的代谢物均上调，而参与生物碱的生物合成等途径的代谢物则下调。

3 讨论

3.1 秸秆覆盖种植马铃薯-水稻轮作处理下根际土壤代谢物差异的基本特征

根际土壤代谢物是植物根系-土壤交流的过程中，植物及与之互作的土壤微生物分泌的各种有机无机化合物和信号分子，包含各种光合产物中的初级和次级代谢物^[18]，在不同作物栽培措施下会表现出不同的反应^[16]。Lu 等^[15]和康益晨等^[16]发现作物轮作可显著影响有机酸、苯类、酯类、烃类、酮类及胺类等代谢物；Li 等^[19]在研究秸秆还田时，利用 ¹H-NMR 技术发现秸秆还田后玉米根际土壤氨基酸、糖、低分子有机酸等发生明显变化；陈军等^[20]采用 GC-MS 分析不同氮肥运筹对水稻根际土壤代谢物的影响，发现氮肥调控的根际差异代谢物主要为醇类、酚类、醚类、脂类、酸类以及酮类。本研究利用 LC-MS 分析 RP 处理后水稻根际土壤代谢物的差异性变化，发现与 CK 处理相比，RP 处理下的差异性代谢物主要集中在脂质和类脂分子、有机酸及衍生物和有机氧化合物等 11 个父类，对比 HMDB 库，主要以苯丙烷和聚酮、丙烯醇脂质、苯及其取代衍生物、甾体内酯、氨基酸/肽和类似物、碳水化合物及其结合物和脂肪酰糖

苷物质等为主，而土壤有机酸等变化不大。这些差异可能与所采用的种植制度及其所搭配的栽培措施有关。相较于 CK 处理，RP 处理中水稻与马铃薯轮作显著改变了根际土壤代谢物的种类及丰度；其次，该轮作系统中所涉及的马铃薯季秸秆覆盖与还田、施肥及马铃薯残茬还田等措施可为土壤及水稻提供一定的氮素养分，从而使脂类等受氮肥影响的土壤代谢物发生变化^[20]。因此，苯丙烷和聚酮等差异性代谢物是 RP 模式下水稻根际土壤的特征指标之一，可为鉴定与区分 RP 轮作提供一定参考。

3.2 根际土壤代谢物在稻田综合生产力中的潜在功能

前期研究表明，周年水稻-马铃薯秸秆覆盖轮作模式有利于水稻高产潜力的实现，是一种稳产高效的轮作模式^[2, 21]。本研究中，通过对 CK 和 RP 处理间差异代谢物丰度与养分差异进行相关性分析发现，差异代谢物苯丙烷和聚酮、有机氧化合物、有机酸及衍生物等的丰度与土壤有机质、全钾、碱解氮、速效钾含量差异呈显著正相关($r=0.816 \sim 0.938$, 表 4)。基于该结果，本研究认为根际土壤代谢物对稻田综合生产力的作用可能源于：①根际土壤代谢物可直接为作物提供营养物质。前人在研究秸秆还田和外源物添加时，发现土壤根际的氨基酸、糖、低分子有机酸以及铵态氮含量等均发生不同程度的变化^[19, 22]，与之类似，本研究也发现 RP 轮作体系下水稻根际土壤中从属于苯丙烷和聚酮、有机氧化合物、有机酸及衍生物的类黄酮、碳水化合物、氨基酸/肽等丰度显著提高(图 4)，而小分子氨基酸/多肽等可作为养分被作物直接吸收，进而提高作物生产力；②通过调控土壤自养型氮矿化微生物，提高土壤供肥能力。源于光合作用的根际碳被认为是土壤养分和作物生产间的重要媒介，作为外源碳，可激发土壤固有碳氮矿化分解，促进土壤养分的供给^[23]。因此，RP 轮作后水稻根际土壤糖类丰度增加，有助于调控相关养分挖掘型微生物的增加，从而诱导土壤固有有机质的激发，最终导致稻田养分供给能力的提高。但相关机理与研究存在很大争议，仍需进一步探索与验证；③根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)的间接作用。根际促生菌是一类存在于植物根系附近的调节作物生长、缓解逆境胁迫的微生物，其在土壤中的作用与根际土壤代谢物组分密切相关^[24]。其中，碳水化合物与氨基酸是作物和 PGPR 之间共生关系的媒介^[25]，共同作用于 PGPR 对植物的调控过程。此外，黄酮类等次级代谢物也是 PGPR 诱导作物促进生长的抵御

表 4 养分含量差异与差异代谢物间的相关性
Table 4 Correlation between nutrient concentration differences and differential metabolites

序号	代谢物	父类	有机质	全氮	全磷	全钾	碱解氮	有效磷	速效钾
1	6,8-dimethyl-2-phenyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-4,5,7-triol	苯丙烷和聚酮	0.837*						
2	Hordatine A	苯丙烷和聚酮					0.904*		
3	3-phenyl-3,4-dihydro-2H-1-benzopyran-7-ol	苯丙烷和聚酮	0.845*						
4	Peonidin 3-(6"-p-coumaroyl-glucoside) 5-glucoside	苯丙烷和聚酮	0.859*						
5	3-hydroxy-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid	苯丙烷和聚酮				0.938**			
6	2-[4,6-dihydroxy-3-(4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-yl)-2-methoxyphenyl]acetic acid	苯环型化合物						0.863*	
7	3-Hydroxydodecanoic acid	有机酸及衍生物				0.827*			
8	3-Hydroxysuberic acid	有机酸及衍生物							0.862*
9	Diethylthiophosphate	有机酸及衍生物							0.819*
10	2-Hydroxyacorenone	有机氧化合物							
11	(+/-)-[R-(E)]-5-Isopropyl-8-methylnona-6,8-dien-2-one	有机氧化合物	0.816*						
12	2-Hydroxy-2,6,6-trimethylcyclohexanone	有机氧化合物			0.841*				
13	Rutalinium	有机杂环化合物							0.837*
14	(5alpha,8beta,9beta)-5,9-Epoxy-3,6-megastigmadien-8-ol	有机杂环化合物						0.875*	
15	Phenmetrazine	有机杂环化合物						0.825*	
16	Dehydroepiandrosterone sulfate	脂质和类脂分子	0.814*						
17	Hovenidulcigenin B	脂质和类脂分子							0.824*
18	3-Methyladipic acid	脂质和类脂分子			0.917*				
19	2-(14,15-Epoxyeicosatrienoyl) Glycerol	脂质和类脂分子	0.833*						
20	Ketopelenolide a	脂质和类脂分子			0.846*				
21	3,4,5-trihydroxy-6-(2-methyl-3-phenylpropoxy) oxane-2-carboxylic acid	脂质和类脂分子						0.932**	
22	Glycerophosphocholine	脂质和类脂分子	0.875*						
23	4-Hydroxybutyric acid	脂质和类脂分子					0.822*		
24	Hernandulcin	脂质和类脂分子	0.823*						
25	5,10-Pentadecadien-1-ol	脂质和类脂分子			0.906*				
26	Soyasaponin III	脂质和类脂分子				0.846*			

注：*、**分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平显著相关，下同。

病原菌攻击的重要物质^[26]。因此，RP 轮作后，苯丙烷和聚酮、有机氧化合物、有机酸及衍生物等土壤代谢物不仅直接或间接为水稻提供养分物质，还间接调控根际促生微生物的群落与结构，调节水稻生长，最终影响稻田综合生产力。

3.3 根际土壤代谢物在提高水稻抗逆能力方面的潜在功能

RP 处理中的特异性根际土壤代谢物对水稻生长发育的影响，还可能以信号分子的形式增强作物抗逆能力。植物与外界的交流、互作依靠各种信号分子；在外界环境变化时，PGPR 与植物依赖这些物质抵御外界胁迫。本研究鉴定到 4 种核苷/核苷酸

和有机酸类代谢物显著富集到 3 条信号转导途径，即 ABC 转运子、cGMP-PKG 和 cAMP 信号转导途径(图 5)。其中 ABC 转运子主要存在于质膜和液泡膜，参与生物降解或糖类中间产物的运输等多种生理过程，使植株适应不断变化的外界环境以抵抗各种生物和非生物胁迫^[27]。cAMP 信号通路是环核苷酸系统的一种，可调节植物对生理和环境刺激的响应。cGMP-PKG 信号通路可作用于生物体内一氧化氮(NO)信号转导过程，通过调控 NO 提高水稻的耐盐性、耐热性以及水稻根系对重金属毒害的抗性^[28]。除信号分子外，还有一些脂质和类脂分子参与植物抗逆防御的代谢途径，显著富集于亚油酸/亚麻酸代

谢、类固醇激素合成等。亚油酸代谢产物褪黑素可在水稻受到盐胁迫时通过增强叶绿素竞争、维持膜稳定性保障其正常生长^[29]；亚油酸和亚麻酸及其衍生物可进一步转化为氧化脂质，在水稻抗病过程中作为信号分子和抗菌化合物抑制病原体生长^[30]。此外，本研究还发现核苷/核苷酸及脂质和类脂分子等

差异代谢物丰度与水稻产量差异呈显著正相关($r=0.957\sim 0.999$, 表5)。因此, 长期 RP 轮作后水稻根际土壤中核苷/核苷酸及脂质和类脂分子等代谢物通过参与信号传导及植物抗逆、防御等相关代谢途径, 提高水稻应对外界生物和非生物胁迫的能力, 保障水稻产量的形成。

表5 水稻产量差异与差异代谢物间的相关性
Table 5 Correlation between rice yield difference and differential metabolites

序号	代谢物	父类	产量
1	Doxorubicinol	苯丙烷和聚酮	0.961*
2	Peonidin 3-(6"-p-coumaroyl-glucoside) 5-glucoside	苯丙烷和聚酮	0.979*
3	1-(4-methoxyphenyl) pentan-3-ol	苯环型化合物	0.958*
4	Didemethylcitalopram	苯环型化合物	0.976*
5	Deoxyadenosine	核苷、核苷酸和类似物	0.960*
6	Cis-3-Decene	碳氢化合物	0.983*
7	Poly-g-D-glutamate	有机酸及衍生物	0.979*
8	(+/-)-[R-(E)]-5-Isopropyl-8-methylnona-6, 8-dien-2-one	有机氧化合物	0.959*
9	Isokobusone	有机氧化合物	0.973*
10	para-hydroxyatorvastatin	有机杂环化合物	0.999**
11	Dehydroepiandrosterone sulfate	脂质和类脂分子	0.985*
12	13'-Hydroxy-gamma-tocotrienol	脂质和类脂分子	0.999**
13	10-Undecenyl acetate	脂质和类脂分子	0.960*
14	3-Isopropenylpentanedioic acid	脂质和类脂分子	0.968*
15	Glycerophosphocholine	脂质和类脂分子	0.962*
16	Tetrahydroaldosterone-3-glucuronide	脂质和类脂分子	0.957*
17	2beta, 9xi-Dihydroxy-8-oxo-1(10), 4, 11(13)-germacratrien-12, 6alpha-olide	脂质和类脂分子	0.979*
18	Physapubescin	脂质和类脂分子	0.997**
19	Deltamethrin	脂质和类脂分子	0.975*

4 结论

与水稻-冬闲模式相比, 水稻-秸秆覆盖种植马铃薯模式下水稻齐穗期根际土壤特异性代谢物主要以苯丙烷和聚酮、丙烯醇脂质、苯及其取代衍生物、甾体内酯、氨基酸/肽和类似物、碳水化合物及其结合物和脂肪酰糖苷物质等为主, 这些差异性代谢物及其丰度可作为鉴别 RP 轮作的重要参考指标。RP 轮作后, 其特有的根际土壤代谢物不仅直接或间接为水稻提供养分物质, 还通过间接调控根际土壤促生微生物促进水稻生长, 影响水稻产量表现; 另一方面, 相关代谢物通过参与信号传导及植物抗逆、防御等相关代谢途径, 提高水稻应对外界生物和非生物胁迫的能力, 从而保障水稻高产。

参考文献:

- [1] 谢小燕. 稻田水旱轮作栽培模式效益浅析[J]. 现代农业研究, 2021, 27(2): 98-100.
- [2] Chen S, Xu C M, Yan J X, et al. The influence of the type of crop residue on soil organic carbon fractions: An 11-year field study of rice-based cropping systems in southeast China[J]. Agriculture, Ecosystems & Environment, 2016, 223: 261-269.
- [3] 王虎, 王旭东, 田霄鸿. 秸秆还田对土壤有机碳不同活性组分储量及分配的影响[J]. 应用生态学报, 2014, 25(12): 3491-3498.
- [4] 张维理, Kolbe H, 张认连. 土壤有机碳作用及转化机制研究进展[J]. 中国农业科学, 2020, 53(2): 317-331.
- [5] Kuzyakov Y, Friedel J K, Stahr K. Review of mechanisms and quantification of priming effects[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(11/12): 1485-1498.
- [6] Kemmitt S J, Lanyon C V, Waite I S, et al. Mineralization of native soil organic matter is not regulated by the size, activity or composition of the soil microbial biomass—a new perspective[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2008, 40(1): 61-73.
- [7] 孙悦, 徐兴良, Yakov K. 根际激发效应的发生机制及其生态重要性[J]. 植物生态学报, 2014, 38(1): 62-75.
- [8] 徐国伟, 常二华, 陈明灿, 等. 根系分泌物对水稻及其

- 他作物生长与品质影响[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(23): 4757-4760.
- [9] Blagodatskaya E, Littschwager J, Lauerer M, et al. Plant traits regulating N capture define microbial competition in the rhizosphere[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2014, 61: 41-48.
- [10] 刘桃菊, 戚昌瀚, 唐建军. 水稻根系建成与产量及其构成关系的研究[J]. 中国农业科学, 2002, 35(11): 1416-1419.
- [11] 赵利, 钞建宾, 郭捷, 等. 基于代谢组学技术的植物抗病相关代谢物研究进展[J]. 西北植物学报, 2021, 41(6): 1071-1078.
- [12] 赵培培, 王国栋. 植物活性特异性代谢物合成生物学应用研究进展[J]. 植物生理学报, 2020, 56(11): 2296-2307.
- [13] 马琳, 郜玉钢, 臧埔, 等. 植物生长调节剂对药用植物次生代谢物积累的影响[J]. 中南药学, 2016, 14(8): 834-837.
- [14] 李崇玮, 柏新富, 陈国忠, 等. 不同恢复年限老参地土壤养分以及酚酸类代谢物含量差异[J]. 植物生态学报, 2021, 45(11): 1263-1274.
- [15] Lu S, Song H X, Guan C Y, et al. Long-term rice-rice-rape rotation optimizes 1, 2-benzenediol concentration in rhizosphere soil and improves nitrogen-use efficiency and rice growth[J]. *Plant and Soil*, 2019, 445(1/2): 23-37.
- [16] 康益晨, 杨昕宇, 张俊莲, 等. 覆膜垄播及轮作蚕豆对马铃薯连作田根系分泌物及化感效应的影响[J]. 西北农业学报, 2020, 29(8): 1148-1158.
- [17] 袁进成, 孟亚轩, 孙颖琦, 等. 基于全基因关联分析的代谢组学在植物中的应用[J]. 中国农业科技导报, 2021, 23(9): 12-18.
- [18] 刘美丽. 植物间相互作用及其林学意义分析[J]. 现代农业研究, 2018(6): 77-78.
- [19] Li R, Liu J, Li J N, et al. Straw input can parallelly influence the bacterial and chemical characteristics of maize rhizosphere[J]. *Environmental Pollutants and Bioavailability*, 2020, 32(1): 1-11.
- [20] 陈军, 黄珊瑜, 刘冰, 等. 不同氮肥运筹对水稻根际土壤理化性质及代谢物质的影响[J]. 福建农业学报, 2015, 30(11): 1082-1089.
- [21] Chen S, Liu S W, Zheng X, et al. Effect of various crop rotations on rice yield and nitrogen use efficiency in paddy-upland systems in southeastern China[J]. *The Crop Journal*, 2018, 6(6): 576-588.
- [22] Cheng N, Peng Y J, Kong Y L, et al. Combined effects of biochar addition and nitrogen fertilizer reduction on the rhizosphere metabolomics of maize (*Zea mays* L.) seedlings[J]. *Plant and Soil*, 2018, 433(1/2): 19-35.
- [23] Kirkby C A, Richardson A E, Wade L J, et al. Nutrient availability limits carbon sequestration in arable soils[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2014, 68: 402-409.
- [24] 穆文强, 康慎敏, 李平兰. 根际促生菌对植物的生长促进作用及机制研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(2): 118-127.
- [25] Fang W G, St Leger R J. Mrt, a gene unique to fungi, encodes an oligosaccharide transporter and facilitates rhizosphere competency in *Metarhizium robertsii*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(3): 1549-1557.
- [26] Abdel-Lateif K, Bogusz D, Hoher V. The role of flavonoids in the establishment of plant roots endosymbioses with arbuscular mycorrhiza fungi, rhizobia and *Frankia* bacteria[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7(6): 636-641.
- [27] Choi H, Jin J Y, Choi S, et al. An ABCG/WBC-type ABC transporter is essential for transport of sporopollenin precursors for exine formation in developing pollen[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2011, 65(2): 181-193.
- [28] Singh H P, Kaur S, Batish D R, et al. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice)[J]. *Nitric Oxide*, 2009, 20(4): 289-297.
- [29] Xie Z Y, Wang J, Wang W S, et al. Integrated analysis of the transcriptome and metabolome revealed the molecular mechanisms underlying the enhanced salt tolerance of rice due to the application of exogenous melatonin[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 11: 618680.
- [30] Yara A, Yaeno T, Montillet J L, et al. Enhancement of disease resistance to *Magnaporthe grisea* in rice by accumulation of hydroxy linoleic acid[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2008, 370(2): 344-347.