

槟榔与胡椒根系分泌物组分对比及槟榔特异组分促生作用验证

赵雅琦^{1,2,3}, 罗丽霞^{1,2,3,4}, 杨建峰^{1,2,3}, 李志刚^{1,2,3}, 祖超^{1,2,3}, 康杰^{1,2,3},
郑维全^{1,2,3}, 王灿^{1,2,3*}

1. 中国热带农业科学院香料饮料研究所, 海南万宁 571533; 2. 农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571533; 3. 海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室, 海南万宁 571533; 4. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228

摘要: 连作胡椒在槟榔间作后生长恢复, 这可能与二者根际互作, 特别是槟榔根系分泌物对连作胡椒具有促生作用有关, 但具体起作用的组分尚不清楚, 难以为深入研究提供依据。本研究采用水培方式提取胡椒与槟榔幼苗根系分泌物, 通过 LC-MS/MS 代谢组学方法明确二者根系分泌物全组分, 并对比筛选槟榔根系分泌物中特有的差异组分, 将其分类后作为外源物质添加, 进而明确不同组分对胡椒种子萌发和幼苗生长的影响。本研究共检测到胡椒根系分泌物代谢物 426 种, 槟榔根系分泌物代谢物 438 种。二者根系分泌物差异代谢物质共有 509 种, 其中显著差异的有 329 种, 槟榔中含量相对较高的有 138 种, 胡椒中含量相对较高的有 191 种。黄酮类、有机酸类物质在槟榔根系分泌物中的含量要高于胡椒, 而糖类、酚酸、香豆素、苯甲酸和氨基酸类物质在胡椒中的含量要高于槟榔。将槟榔根系分泌物含量高的差异代谢物按有机酸、氨基酸、酚酸、糖类和黄酮类分类后, 选取差异倍数较高的 2 种单质组分作为特异组分添加。结果表明, 黄酮类添加处理的胡椒种子发芽率和发芽势均最高, 幼苗的株高、地上部干质量和地下部干质量均最高, 其次为有机酸类、酚酸类, 而糖类和氨基酸类效果不明显。综上所述, 槟榔根系分泌物中特有的差异组分较多, 但不同组分对连作土培胡椒幼苗的促生作用存在差异, 其中黄酮类组分数目多、含量高, 对胡椒种子萌发和种苗生长具有明显促生作用, 是槟榔根系分泌物缓解胡椒连作障碍的主要作用组分。本研究结果可为揭示槟榔和胡椒根际互作机制, 解析槟榔间作缓解胡椒连作障碍提供基础及理论依据。

关键词: 胡椒; 槟榔; 根系分泌物; 代谢物

中图分类号: Q945.79 **文献标志码:** A

Comparison of Root Exudates of Areca Nut and Pepper and Verification of Growth Promoting Effect of Specific Components of Areca Nut

ZHAO Yaqi^{1,2,3}, LUO Lixia^{1,2,3,4}, YANG Jianfeng^{1,2,3}, LI Zhigang^{1,2,3}, ZU Chao^{1,2,3}, KANG Jie^{1,2,3},
ZHENG Weiquan^{1,2,3}, WANG Can^{1,2,3*}

1. Spice and Beverage Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Wanning, Hainan 571533, China; 2. Key Laboratory of Genetic Resources Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wanning, Hainan 571533, China; 3. Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops, Wanning, Hainan 571533, China; 4. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: After intercropping pepper with areca nut, pepper plants recovered their growth. This might be related to the mutual interaction between the rhizospheres of the two plants, especially the promoting effect of areca nut root exudates on pepper plants. However, the specific components that play a role remain unclear, which makes it difficult to provide a

收稿日期 2025-01-26; **接受日期** 2025-02-20

基金项目 国家重点研发计划项目 (No. 2023YFD1901403); 国家自然科学基金项目 (No. 32072671); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队 (No. CATASCXTD202303)。

作者简介 赵雅琦 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 热带作物栽培与生理生态。*通信作者 (Corresponding author): 王灿 (WANG Can), E-mail: wangcan_1983@catas.cn。

basis for in-depth research. In this study, the root exudates of pepper and areca nut seedlings were extracted by hydroponics. The full components of the root exudates were identified by LC-MS/MS metabolomics, and the specific differential components unique to areca nut root exudates were screened out. After classification, these were used as the exogenous substances and added to further clarify the effects of different components on pepper seed germination and seedling growth. A total of 426 metabolites were detected in the root exudates of pepper, and 438 metabolites were identified in those of areca nut. There were 509 differential metabolites between areca nut and pepper, among which 329 were significantly different, and 138 were more abundant in areca nut and 191 in pepper. The contents of flavonoids and organic acids were higher in areca nut root exudates than those in pepper, while the contents of sugars, phenolic acids, coumarins, benzoic acids and amino acids were higher in pepper than in areca nut. After classification of the differential metabolites with high content in areca nut root exudates into organic acids, amino acids, phenolic acids, sugars and flavonoids, two with higher fold differences were selected as specific components for addition. The results showed that the addition of flavonoids had the highest germination rate and germination potential of pepper seeds, and the height of seedlings, dry weight of aboveground and underground parts were the highest. The addition of organic acids and phenolic acids was second, while the effects of sugars and amino acids were not obvious. In conclusion, there are many specific differential components in areca nut root exudates, but the promoting effects of different components on the growth of pepper seedlings in soil culture after intercropping are different. Among them, the flavonoids group has a large number and high content, and has obvious promoting effects on pepper seed germination and seedling growth, which is the main component of areca nut root exudates that alleviates the disorder of pepper intercropping. The results of this study provides a basis and theoretical evidence for revealing the mechanism of rhizosphere interaction between the two plants and analyzing the alleviation of pepper intercropping disorder by intercropping with areca nut.

Keywords: pepper; areca nut; root exudates; metabolites

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.06.010

根系分泌物是植物在生长过程中向外界环境释放的一类物质, 主要包括糖类、氨基酸、有机酸、酚酸等低分子化合物和很多初生和次生代谢物^[1]。其中, 大分子物质主要由根尖分泌, 而小分子有机化合物主要由伸长区分泌^[2]。根系分泌物的组分变化可以反映植物的生长发育和代谢能力^[3], 其分泌也是驱动植物与根际环境物质、能量与信息交流的重要因素^[4]。不同植物根系分泌物种类和数量存在很大差异, 这也导致不同植物根际效应存在差异^[5]。而且不同种类植物之间可以通过分泌根系分泌物, 形成“根际对话”, 有利于提高植物微生物多样性, 改善根际生态环境^[6]。因而根系分泌物在化感作用、间套作模式等方面发挥着重要作用^[7]。

大量研究表明, 间作优势与间作作物之间根系分泌物互作有关^[8-9]。根系分泌物作为植物与其生存环境进行物质和信号交流的载体, 可以活化土壤养分, 调控根际土壤微生物群落的组成和结构, 提高微生物多样性^[10-11]。如洋葱与番茄间作时, 其根系分泌物中的紫杉素(黄酮类化合物)可以协助番茄植株招募植物有益细菌 *Bacillus* sp., 改变了番茄根际微生物群落结构, 提高了番茄植株的适应性^[10]; 玉米间作大豆体系显著增加了土壤中根系分泌物的种类和含量, 且降低了土

壤 pH、提高了有效氮和有效磷等养分供应强度, 促进了丛枝菌根真菌(AMF)在玉米根际的定殖, 从而形成了间作优势^[12]。本课题组前期研究证实, 槟榔间作后, 胡椒长势有一定恢复, 平均产量提高 40%, 这与槟榔间作能够显著提高土壤中速效磷养分含量和根际微生物多样性有关^[13-15]。推测二者间作时, 槟榔根系分泌物对连作胡椒的促生作用是间作优势形成的重要原因。因此, 开展胡椒、槟榔根系分泌物分析与鉴定, 分析其物质种类与数量的差异, 是深入研究二者“根际对话”, 揭示其互作机理的重要途径之一。前期研究证明水培法提取根系分泌物的丰富度相对较高^[16], 在此基础上, 本研究采用水培提取法对胡椒和槟榔根系分泌物进行收集提取, 再结合 LC-MS/MS 代谢组分析, 明确胡椒、槟榔根系分泌物组成, 通过分析二者差异组分、筛选槟榔根系分泌物中特有差异组分并开展添加试验, 进而验证槟榔根系分泌物的促生作用及具体作用组分, 从根系分泌物角度来揭示二者间作优势形成的原因, 为解析槟榔间作后胡椒连作障碍缓解提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取海南省万宁市兴隆镇中国热带农业科学

院香料饮料研究所(香饮所)试验基地(110°20'E, 18°74'N)长势良好、根系发达的胡椒和槟榔幼苗(品种分别是热引1号和热研1号)。

1.2 方法

1.2.1 根系分泌物提取 取出热引1号和热研1号幼苗,用去离子水反复冲洗幼苗根部至无土壤残留,然后采用霍格兰营养液通气培养,培养容器用锡箔纸包裹,模拟黑暗环境(图1)。待幼苗培养6个月,植株健壮且根系发达时,开始提取根系分泌物:首先将根系用去离子水反复冲洗后,放入盛有去离子水的1 L量筒或烧杯中通气培养;培养24 h后收集容器中胡椒和槟榔根系分泌物富集液;将富集液进行抽滤,然后在35℃下用真空旋转蒸发仪将水分蒸干;加入甲醇,用超声振荡将瓶壁上的残留物洗脱下来,倒在锡箔纸上,待甲醇挥发完全,此步骤重复2~3次,待瓶壁洗净后即获得根系分泌物。样品放于-80℃保存,待全部提取完成后送至武汉迈特维尔生物科技有限公司进行测定。

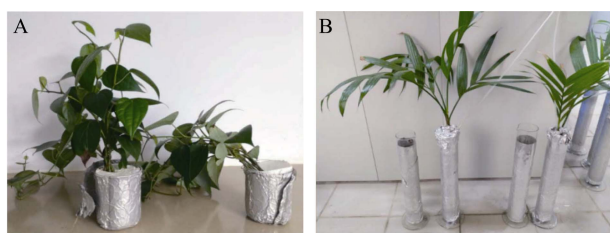


图1 水培法提取胡椒(A)和槟榔(B)根系分泌物
Fig. 1 Hydroponic extraction of root exudates from pepper (A) and areca nut (B)

1.2.2 LC-MS/MS 检测条件 (1)液相条件。色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C18 1.8 μm , 2.1 mm $\times$ 100 mm;流动相:水相为超纯水(加入0.04%乙酸),有机相为乙腈(加入0.04%乙酸);洗脱梯度:0 min 水/乙腈(V/V)为95:5, 11.0 min 为5:95, 12.0 min 为5:95, 12.1 min 为95:5, 15.0 min 为95:5;流速0.4 mL/min;柱温40℃;进样量5 μL 。

(2)质谱条件。电喷雾离子源(electrospray ionization, ESI)温度550℃,质谱电压5500 V,帘气(curtain gas, CUR)25 psi,碰撞诱导电离(collision-activated dissociation, CAD)参数设置为高。在三重四级杆(QQQ)中,每个离子对是根据优化的去簇电压(decustering potential, DP)和碰撞能(collision energy, CE)进行扫描检测。

1.2.3 根系分泌物特异组分添加对胡椒种子萌发的影响 将筛选出来的槟榔根系分泌物中显著高于胡椒的组分按含量排序,从大到小选择可以从标准品库购得的2种单质组分作为特异组分开展添加试验,胡椒种子来自香饮所试验基地(品种与前一致),选择颗粒饱满优质、大小均一、无病害或残缺的种子。供试土壤为连作30 a的胡椒园植株冠幅下靠近胡椒根系的土壤,将其置于室内风干备用。标准品均购于海南清风生物科技有限公司。将选出的胡椒种子浸泡、脱皮、消毒后,每50粒为1组置于直径为150 mm垫有纱布并装有100 g胡椒连作土的培养皿中,并盖上1层纱布。以槟榔根系分泌物水培提取液和去离子水作为对照,每个处理5个重复。槟榔根系分泌物水培液是将槟榔根系清洗后置于去离子水中培养24 h得到的溶液。试验在人工培养室内进行,设定温度28℃,湿度90%,CO₂浓度26.79 $\mu\text{mol/mol}$ 。从添加之日起开始观察,当胚芽完全从种皮中伸出时,视为有效萌发种子。每隔24 h观察1次,从第1粒种子发芽时开始记录数据,以连续5 d发芽粒数不足供试种子总数的1%时结束观察。每天记录发芽数,并补充因蒸发而损失的水分,使土壤含水量保持恒定。

用第3天记录的数据计算胡椒种子的发芽势(GP),第7天的数据计算胡椒种子的发芽率(GR)。计算公式: $GR = N/M \times 100\%$, $GP = N_m/M \times 100\%$,式中N为发芽终期种子数,M为供试种子总粒数, N_m 为种子发芽达到最高峰时种子发芽粒数。

1.2.4 根系分泌物特异组分添加对胡椒幼苗生长的影响 试验前期准备和处理与1.2.3一致。将长势一致的幼苗。将其种植于装有900 g连作28 a胡椒园土壤的花盆中,每个处理5个重复。从第1次添加试验次日开始,每14 d添加1次,共添加4次,添加完毕后再继续培养2个月。每天补充水分使土壤含水量保持恒定。试验结束取出土层中胡椒根系,洗净植株置于-80℃超低温冰箱保存。观察幼苗生长情况,测量根长、株高,称取鲜质量、干质量。

1.3 数据处理

利用Analyst 1.6.1软件处理质谱数据,将质谱检测得到的根系分泌物对峰识别、积分等处理,基于本地代谢数据库,对样本的代谢物进行物质

信息搜索整理, 经过二级质谱定性匹配注释。最终得到物质名称及相对含量, 并对代谢物进行多元统计分析。用 t 检验和 PLS-DA 相结合的方法进行差异代谢物筛选 ($\log_2FC \geq 2$ 或 $\log_2FC \leq 0.5$ 即被认为是差异代谢物)。试验数据采用 Microsoft Excel 2019 软件进行数据处理, 利用 SPSS 25.0 软件进行单因素方差分析 (One way ANOVA)、比较各处理间的差异显著性, 利用 Origin Pro 2022 软件作图。

2 结果与分析

2.1 胡椒、槟榔根系分泌物代谢物组分分析

利用 LC-MS 对水培提取的胡椒和槟榔的根系分泌物进行定性和定量分析, 共收集到胡椒根系分泌物代谢物 426 种, 槟榔根系分泌物代谢物 438 种, 这些物质主要是氨基酸、有机酸、核苷酸、黄酮类、脂质等代谢物 (图 2)。从主要物质种类和代谢数目上看, 胡椒与槟榔二者没有较大差别。其中检测出胡椒根系分泌物中氨基酸 62 种、有机酸 58 种、脂质类 57 种、核苷酸 53 种、黄酮类 41 种、羟基肉桂酰衍生物 21 种; 槟榔根系分泌物中氨基酸 71 种、有机酸 57 种、脂质类 55 种、核苷酸 51 种、黄酮类 43 种。

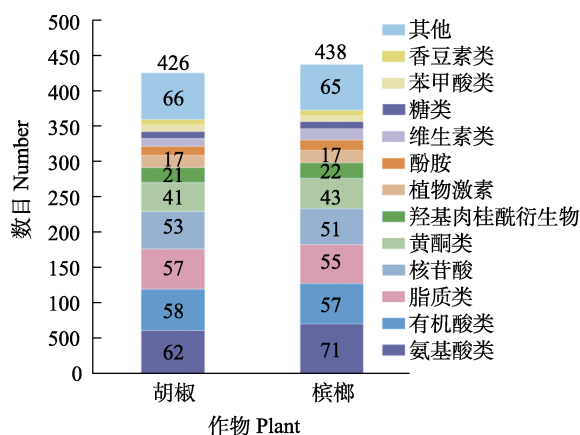


图 2 胡椒与槟榔根系分泌物代谢物数目

Fig. 2 Number of metabolites in root exudates of pepper and areca nut

为观察胡椒和槟榔根系分泌物的具体差异, 将胡椒与槟榔根系分泌物进一步对比分析。根据检测出的物质含量在胡椒和槟榔二者间的差异倍数 (FC), 按照 $\log_2FC \geq 2$ 或 $\log_2FC \leq 0.5$ 进行差异筛选, 筛选出的物质即为显著差异的代谢物质。槟榔与胡椒差异物质共有 509 种, 其中差异显著的有 329 种, 槟榔含量相对较高的有 138 种, 胡

椒含量相对较高的有 191 种。这说明胡椒与槟榔根系分泌物的差异代谢物中, 胡椒根系分泌物代谢物含量高的物质较多。

将这些差异代谢物质按照差异倍数进行排序, 槟榔中含量高的前 10 种物质以及胡椒中含量高的前 10 种物质如表 1 和表 2 所示。其中槟榔根系分泌物中较胡椒含量高的组分中, 有机酸占 7 种, 分别为对苯二甲酸、延胡索酸、3,4-二羟基苯乙酸、2-异丙基苹果酸、原儿茶酸、甲基苹果酸。胡椒根系分泌物中较槟榔含量高的组分中, 物质种类相对均匀, 主要有脂质类、黄酮类、糖类、有机酸及其衍生物等, 其中脂质类物质最多 (3 种), 分别为豆蔻酸、单酰甘油酯 (酰基 18:4) 异构 2、十八碳二烯-6-炔酸。

将在胡椒和槟榔间有显著差异的氨基酸、糖类、有机酸、黄酮、酚酸这 5 类物质及对胡椒连作障碍有潜在影响的香豆素及苯甲酸类物质进行分析 (图 3)。在物质数目上看, 具有显著差异的氨基酸、糖类、有机酸、香豆素、苯甲酸类物质在胡椒中的数目多于槟榔, 黄酮类物质在槟榔中的数目要多于胡椒, 酚酸类物质在胡椒和槟榔中的数目相等。在物质相对峰面积 (相对含量) 上看, 黄酮类、有机酸类物质在槟榔中的含量要多于胡椒, 糖类、酚酸、香豆素、苯甲酸类物质在胡椒中的含量多于槟榔。

2.2 胡椒、槟榔根系分泌物代谢物特异组分促生作用验证

2.2.1 槟榔根系分泌物中特异组分的确定 将槟榔和胡椒二者间槟榔含量更高的差异物质按照含量的多少进行排列, 并将其按照种类进行归纳, 选择处于前 5 类的差异组分为特异组分, 每组特异组分含 2 种含量较高的单质: 有机酸 (草酸+琥珀酸)、氨基酸 (L-组氨酸+L-丙氨酸)、酚酸 (4-甲氧基肉桂酸+香草酸)、糖类 (麦芽四糖+N-乙酰-D-氨基葡萄糖)、黄酮 (金合欢素+橙皮苷), 并以水培槟榔根系分泌物和去离子水作为对照 (表 3)。另外, 根据前期实际测得槟榔间作胡椒根际土壤的根系分泌物中特异组分的单一组分平均浓度 $5 \mu\text{g/g}$ 为依据进行添加, 换算成当前土质量的添加量。

2.2.2 槟榔根系分泌物中特异组分的添加对胡椒种子萌发的影响 由图 4 可知, 各特异组分对胡椒种子发芽率、发芽势的影响, 在添加 5 种特异组分处理中, 添加黄酮类物质后胡椒种子的发芽

表 1 与胡椒根系分泌物相比槟榔含量高的前 10 种代谢物质

Tab. 1 The top 10 metabolic substances with higher content in areca nut compared to root exudates of pepper

序号 No.	物质 Compound	分类 Class	差异倍数 FC
1	对苯二甲酸 (terephthalic acid)	有机酸及其衍生物	23.45
2	延胡索酸 (fumaric acid)	有机酸及其衍生物	18.81
3	3,4-二羟基苯乙酸 (3,4-dihydroxybenzeneacetic acid)	有机酸及其衍生物	16.31
4	L-(-)-苏氨酸 (L-threonine)	氨基酸	15.31
5	2-异丙基苹果酸 (2-isopropylmalate)	有机酸及其衍生物	15.07
6	原儿茶酸 (protocatechuic acid)	有机酸及其衍生物	14.99
7	氨基丙二酸 (aminomalonic acid)	有机酸及其衍生物	14.80
8	二香豆酰精胺 (N',N''-di-p-coumaroylspermine)	酚胺	14.71
9	吡咯-2-羧酸 (pyrrole-2-carboxylic acid)	氨基酸衍生物	13.88
10	甲基苹果酸 (citramalate)	有机酸及其衍生物	13.71

表 2 与槟榔根系分泌物相比胡椒含量高的前 10 种代谢物质

Tab. 2 The top 10 metabolic substances with higher content in pepper compared to root exudates of areca nut

序号 No.	物质 Compound	分类 Class	差异倍数 FC
1	3-羟基乙酸苯酯 (methyl 3-hydroxyphenylacetate)	其他	17.55
2	异鼠李素 (isorhamnetin)	黄酮醇	15.91
3	豆蔻酸[myristoleic acid (C14:1)]	脂质-脂肪酸	15.21
4	L-岩藻糖 (L-fucose)	糖类	15.04
5	3,5-二羟基-3-甲基戊酸 (Rs-mevalonic acid)	有机酸及其衍生物	14.19
6	薄荷醇[(+)-piperitol]	羟基肉桂酰衍生物	13.75
7	单酰甘油酯(酰基 18:4)异构 2[MAG (18:4) isomer 2]	脂质-甘油酯	13.55
8	麦黄酮 5-O-己糖苷 (tricin 5-O-hexoside)	黄酮	13.29
9	十八碳二烯-6-炔酸 (octadecadien-6-ynoic acid)	脂质-脂肪酸	13.23
10	7-甲基黄嘌呤 (7-methylxanthine)	核苷酸及其衍生物	13.11

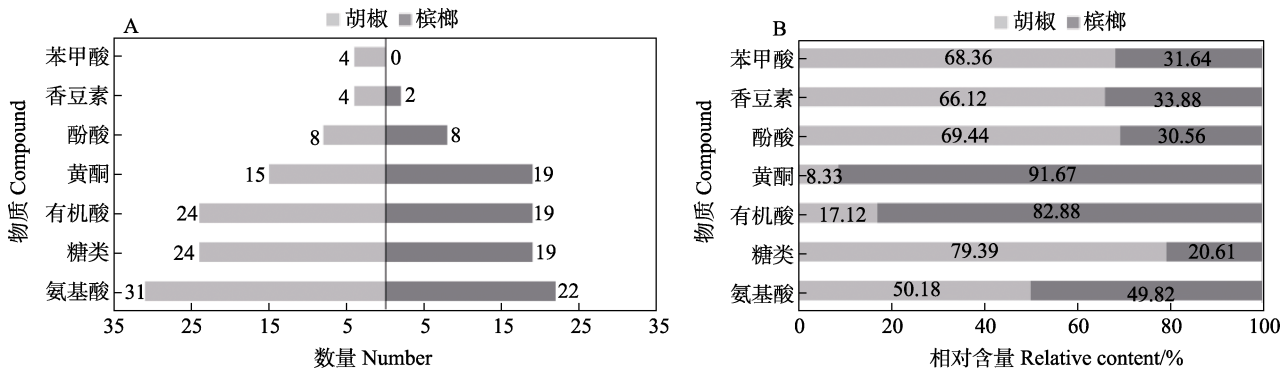


图 3 在胡椒和槟榔根系分泌物之间的显著差异的特定代谢物数目 (A) 及其相对含量 (B)

Fig. 3 The number of significant differential metabolites (A) and their relative contents (B) between root exudates of pepper and areca nut

率最高为 80.00%，高于有机酸、氨基酸、酚酸、糖类的 1.69%、10.09%、1.69%、14.29%；添加有机酸、酚酸的发芽率为 78.67%，高于氨基酸、糖类的 8.26%、12.39%。去离子水处理的胡椒种子

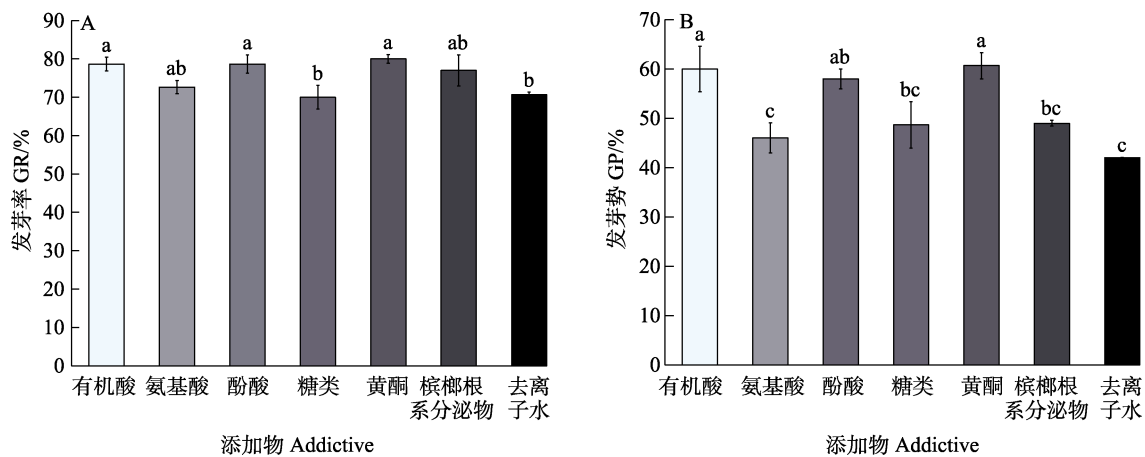
发芽率为 70.67%，糖类与去离子水处理相比降低了 0.95%，其他添加特异组分与去离子水处理相比提高了 2.83%~13.20%。添加槟榔根系分泌物后种子的发芽率为 77.00%，与去离子水处理相比提

表 3 添加物的分类及浓度
Tab. 3 Classification and concentration of additives

添加物 Additive	浓度 Concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
有机酸（草酸+琥珀酸）	5.0+5.0
氨基酸（L-组氨酸+L-丙氨酸）	5.0+5.0
酚酸（4-甲氧基肉桂酸+香草酸）	5.0+5.0
糖类（麦芽四糖+N-乙酰-D-氨基葡萄糖）	5.0+5.0
黄酮（金合欢素+橙皮苷）	5.0+5.0
槟榔根系分泌物	
去离子水	

高了 8.96%。通过多重比较可得，添加黄酮、有机酸和酚酸 3 类特异组分与去离子水对照存在显著性差异，但三者之间不存在显著性差异；添加氨基酸和糖类与去离子水不存在显著性差异，且二者之间也不存在显著性差异；根系分泌物的添加与去离子水对照不存在显著性差异；5 种特异组分与根系分泌物不存在显著性差异；5 种特异

组分之间，有机酸、酚酸、黄酮与糖类均存在显著性差异，但与氨基酸不存在显著差异（图 4A）。添加特异组分与去离子水处理相比种子发芽势提高了 9.52%~44.45%，5 种特异组分处理中，添加黄酮类物质后胡椒种子的发芽势最高为 60.67%，高于有机酸、氨基酸、酚酸、糖类的 1.12%、31.89%、4.60%、24.66%。添加根系分泌物后种子的发芽势为 49.00%，与去离子水处理相比提高了 16.67%。通过显著性分析可知，添加黄酮、有机酸和酚酸 3 类特异组分与去离子水对照存在显著性差异，但三者之间不存在显著性差异；添加氨基酸和糖类与去离子水不存在显著性差异，且二者之间也不存在显著性差异；根系分泌物的添加与去离子水对照不存在显著性差异；添加黄酮和有机酸与添加根系分泌物存在显著性差异，而氨基酸、糖类与添加根系分泌物不存在显著性差异；5 种特异组分之间，有机酸、黄酮与酚酸不存在显著性差异，但与氨基酸、糖类存在显著性差异（图 4B）。



不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。
Different lowercase letters indicate significant difference between treatments ($P<0.05$).
图 4 不同特异组分的添加对胡椒种子发芽率 (A) 和发芽势 (B) 的影响

Fig. 4 Effect of different special components on germination rate (A) and germination potential (B) of pepper seeds

由图 5 可见，不同特异组分的添加对胡椒幼苗的生长促进作用不同，黄酮类物质较其他特异组分的促进作用最大。从幼苗表型特征来看，添加黄酮类组分和槟榔根系分泌物全组分的处理株高高于其他处理，添加有机酸、氨基酸、酚酸、糖类物质与去离子水处理无显著差异（图 5A）。添加根系分泌物后胡椒幼苗地上部分的干质量显著高于去离子水处理，添加酚酸、黄酮后胡椒幼苗地上部分的干质量显著高于去离子水处理，添加 5 种特异组分与添加根系分泌物后胡椒幼苗地

上部分的干质量均不存在显著性差异，添加黄酮的处理显著高于添加氨基酸和糖类处理。添加根系分泌物后植株地下部分干质量高于添加去离子水处理，添加有机酸、酚酸、黄酮处理也显著高于去离子水处理，添加氨基酸和糖类处理显著低于添加根系分泌物处理，且添加有机酸处理显著高于添加氨基酸和糖类处理，添加酚酸和黄酮处理显著高于添加糖类处理（图 5B）。根冠比结果显示，不同物质种类的添加对根冠比影响不大（图 5C）。

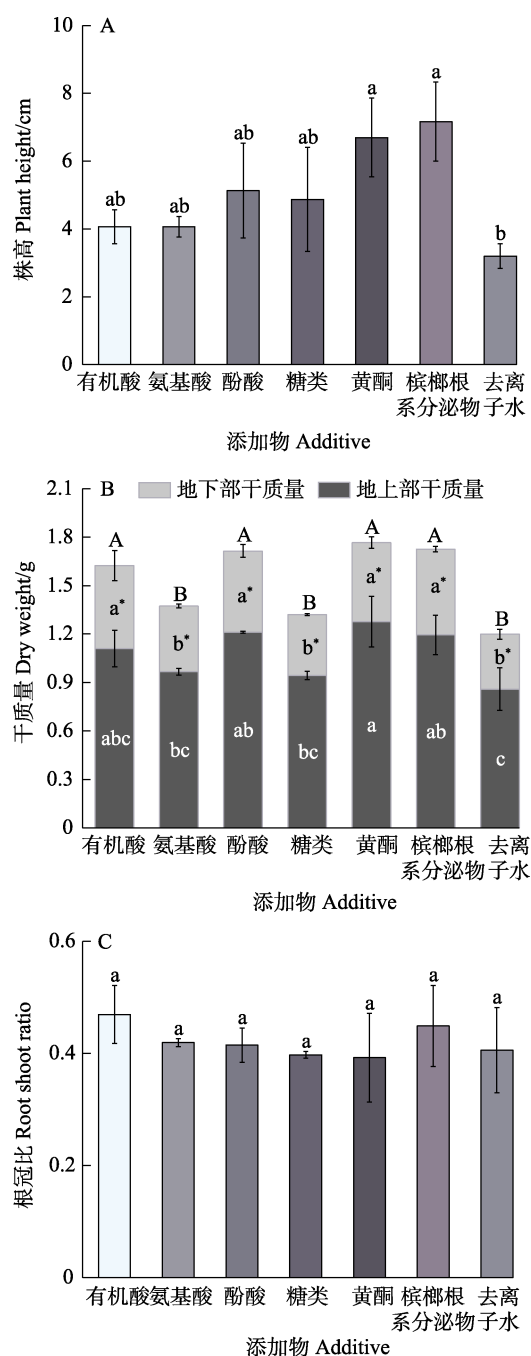


图 A 和图 C 中的不同小写字母表示处理间差异显著 ($P<0.05$)。图 B 中小写字母*表示地下部干质量在不同处理间差异显著 ($P<0.05$)；小写字母表示地上部干质量在不同处理间差异显著 ($P<0.05$)；大写字母表示总干质量在不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。

Different lowercase letters in figure A and C indicate significant difference between treatments ($P<0.05$). Different lowercase letters* in figure B indicate significant difference of underground dry weight between treatments ($P<0.05$); Different lowercase letters in figure B indicate significant difference of above-ground dry weight between treatments ($P<0.05$); Different uppercase letters in figure B indicate significant difference of total dry weight between treatments ($P<0.05$).

图 5 添加物对胡椒幼苗株高 (A)、干质量 (B) 和根冠比 (C) 的影响

Fig. 5 Effects of additives on plant height (A), dry weight (B) and root shoot ratio (C) of pepper seedlings

3 讨论

根系分泌物是植物生长过程中由根系释放到根际环境的碳活性物质, 占植物净光合产物的 21%^[12], 因而是增强土壤碳汇、维持根际微生态系统活力的关键因素。水培法提取的根系分泌物组分最为丰富, 适用于不同作物根系分泌物对比研究^[17, 18], 如在本研究中采用水培法提取到的胡椒和槟榔根系分泌物数目分别为 426 种和 438 种。从差异代谢物数目来看, 二者根系分泌物差异物质为 509 种, 差异显著达 329 种, 其中槟榔中含量较高的有 138 种, 胡椒中含量较高的有 191 种。这一结果说明, 尽管胡椒根系分泌物中相对含量较高的组分较多, 但在二者间作时, 槟榔根系分泌物中仍有 138 种相对含量较高组分向土壤中分泌, 并可能通过“根际对话”在土壤中累积, 从而为间作作物根际微生物提供更加丰富的碳源物质, 改变单作条件下因碳源输入单一而造成的微生物多样性下降、群落结构趋于单一的不利影响^[19]。

从具体代谢物来看, 差异倍数最大的前 10 的组分中, 槟榔中 7 种均为有机酸类; 对代谢组相对含量进一步分析发现, 尽管胡椒根系分泌物中有机酸数目较多, 但含量远远低于槟榔, 表明槟榔间作时根系向土体中分泌了大量有机酸。有机酸类物质不仅可以招募有益微生物、抑制病原菌, 减轻植株病害^[19], 还能活化土壤难溶性的磷^[7]、钾^[20]等养分, 从而促进间作作物养分吸收^[9], 这也与本研究团队前期发现的间作椒园土壤磷养分供应增强、胡椒叶片养分状况改善等^[13, 15]结果一致。这些结果暗示着槟榔根系分泌物中有机酸组分在这一过程中起到了关键作用。此外, 槟榔根系分泌物中黄酮类物质不仅数目更多, 含量也更为丰富。而研究发现, 黄酮类化合物不仅可以诱导根瘤菌在豆科植物根系定殖, 还可以促进丛植菌根真菌 (AMF) 在作物根系的定殖, 从而扩大作物根系搜索土体养分能力, 促进植株生长和养分吸收^[21-22]。因而槟榔根系向土体中分泌更多黄酮类物质也有助于提高间作系统整体的养分利用效率, 从而促进胡椒生长, 缓解连作障碍形成。

在胡椒根系分泌物中, 含量相对较高的组分主要为氨基酸、糖类、香豆素、酚酸和苯甲酸类物质。而氨基酸、香豆素、酚酸和苯甲酸是典型的化感物质^[23]。据报道, L-亮氨酸和 L-赖氨酸等氨基酸在较低浓度下明显抑制了拟南芥主根生长^[24], 精氨酸、天冬酰胺酸和苯丙氨酸等促进

病原菌孢子萌发和菌丝生长, 诱发植株病害^[25]。香豆素对苜蓿根系生长具有抑制作用^[26], 酚酸类物质对草莓株高、根系表现出很强的抑制作用^[27], 苯甲酸对葡萄^[28]、黄瓜^[29]、西瓜^[30]等作物生长具有强烈的自毒作用。大量化感物质组分在胡椒根系分泌物中普遍存在, 若在胡椒根际长期累积而得不到分解, 则是促进胡椒连作障碍形成的重要原因^[31]。

外源添加试验也进一步验证了槟榔根系分泌物特异组分的促生作用。如黄酮和有机酸类组分添加显著提高种子发芽率和发芽势; 黄酮类组分对胡椒幼苗株高也有很好的促进效果。对植株表型分析表明, 黄酮、酚酸和有机酸等特异添加处理主要通过促进胡椒地下部根系生长, 而非地上部生长来显著增加植株整体生物量。而氨基酸、糖类和去离子水添加处理地下部生长最弱, 整体生物量也显著减少。因而, 特异组分添加不仅通过促进根系生长提高自身对水分和养分的吸收, 还可能与其促进连作土壤中有益微生物生长^[32]、改善养分供应情况^[33]有关, 在其他作物的黄酮类^[34]或有机酸类^[35]添加试验中也有类似报道。但也看到, 酚酸虽然被认为是一类化感物质^[36], 在本研究中却具有一定促生作用, 这可能与它可以促进土壤非优势菌群生长^[37], 或者能够促进磷矿石解吸, 提供更多有效磷供植物吸收等原因有关^[38]。由此可知, 相同根系分泌物组分在不同作物的“根际对话”之间的功能效果不可一概而论, 相同组分在不同作物或间作体系之间所起作用可能存在差异, 在开展相关研究时应通过验证试验予以证实。同时, 本研究中黄酮类、有机酸类和酚酸类组分的促生作用虽得到验证, 但其具体促生机制尚不清楚, 如这些组分与土壤微生物、养分循环及功能基因的关系, 其促进作物根系生长或叶片光合作用的分子调控途径等。因此, 后期仍需进一步开展深入研究, 以解析二者根际互作机制下间作优势形成的具体原因, 为揭示槟榔间作缓解胡椒连作障碍提供理论依据。

4 结论

本研究采用代谢组学方法明确了水培下胡椒和槟榔根系分泌物全组分。共检测到胡椒根系分泌物代谢物 426 种, 槟榔根系分泌物代谢物 438 种, 主要是氨基酸、有机酸、核苷酸、黄酮类、脂质等代谢物。二者差异代谢物质共有 509 种, 其中显著差异的有 329 种, 槟榔含量相对较高的

有 138 种, 胡椒含量相对较高的有 191 种。其中槟榔根系分泌物中有机酸类物质在二者差异倍数最大的前 10 组分中占 6 种, 而胡椒物质种类分布相对平均, 主要为有脂质类、黄酮类、糖类、有机酸及其衍生物等。进一步对比发现, 黄酮类、有机酸类物质在槟榔中的含量高于胡椒, 糖类、酚酸、香豆素、苯甲酸和氨基酸类物质在胡椒中的含量多于槟榔。将槟榔根系分泌物按有机酸、氨基酸、酚酸、糖类和黄酮类分类后, 选取相对差异倍数较高的 2 个组分作为差异物质, 并以 5 $\mu\text{g/g}$ 土壤的浓度进行添加。结果表明, 黄酮类的添加处理对胡椒种子萌发和幼苗生长促生作用最为明显, 是槟榔根系分泌物缓解胡椒连作障碍的主要作用组分。这为揭示与槟榔间作缓解胡椒连作障碍奠定理论基础。

参考文献

- [1] WALKER T S, BAIS H P, GROTEWOLD E, VIVANCO J M. Root exudation and rhizosphere biology[J]. *Plant Physiology*, 2003, 132(1): 44-51.
- [2] ROVIRA A D. Plant root exudates[J]. *The Botanical Review*, 1969(35): 35-57.
- [3] BAPTIST F, ARANJUELO I, LEGAY N, LOPEZ-SANGIL L, MOLERO G, ROVIRA P, NOGUÉS S. Rhizodeposition of organic carbon by plants with contrasting traits for resource acquisition: responses to different fertility regimes[J]. *Plant and Soil*, 2015, 394(1/2): 391-406.
- [4] 申建波, 张福锁. 根分泌物的生态效应[J]. *中国农业科技导报*, 1999(4): 21-27.
SHEN J B, ZHANG F S. Ecological effects of root exudates[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 1999(4): 21-27. (in Chinese)
- [5] MCLAUGHLIN S, ZHALNINA K, KOSINA S, NORTHERN T R, SASSE J. The core metabolome and root exudation dynamics of three phylogenetically distinct plant species[J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 1649.
- [6] ZHOU X, ZHANG J, KHASHI U, RAHMAN M, GAO D, WEI Z, WU F, DINI-ANDREOTE F. Interspecific plant interaction via root exudates structures the disease suppressiveness of rhizosphere microbiomes[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16(5): 849-864.
- [7] 尹晓童, 杨浩, 于瑞鹏, 李隆. 根系分泌物在作物多样性体系中对种间地下部互作的介导作用[J]. *中国生态农业学报*, 2022, 30(8): 1215-1227.
YIN X T, YANG H, YU R P, LI L. Effects of root exudates on interspecific subsurface interactions in crop diversity[J].

- Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2022, 30(8): 1215-1227. (in Chinese)
- [8] WANG N Q, KONG C H, WANG P, MEINERS S J. Root exudate signals in plant-plant interactions[J]. Plant, Cell & Environment, 2021, 44(4): 1044-1058.
- [9] YU R, YANG H, XING Y, ZHANG W, LAMBERS H, LI L. Belowground processes and sustainability in agroecosystems with intercropping[J]. Plant and Soil, 2022, 476(1/2): 263-288.
- [10] ZHOU X G, ZHANG J Y, MUHAMMAD K R, GAO D M, WEI Z, WU F Z, FRANCISCO D A. Interspecific plant interaction via root exudates structures the disease suppressiveness of rhizosphere microbiomes[J]. Molecular Plant, 2023, 16(5): 849-864.
- [11] ZHANG S, LI S M, MENG L B, LIU X D, ZHANG Y H, ZHAO S C, ZHAO H B. Root exudation under maize/soybean intercropping system mediates the arbuscular mycorrhizal fungi diversity and improves the plant growth[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1375194.
- [12] CHAI Y N, SCHACHTMAN D P. Root exudates impact plant performance under abiotic stress[J]. Trends in Plant Science, 2022, 27(1): 80-91.
- [13] 王灿, 杨建峰, 祖超, 李志刚, 鱼欢, 邬华松. 胡椒园间作槟榔对胡椒产量及养分利用的影响[J]. 热带作物学报, 2015, 36(7): 1191-1196.
- WANG C, YANG J F, ZU C, LI Z G, YU H, WU H S. Effects of areca nut intercropping on yield and nutrient utilization of pepper in pepper garden[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(7): 1191-1196. (in Chinese)
- [14] 杨建峰, 祖超, 李志刚, 王灿, 鱼欢, 邬华松, 谭乐和. 胡椒园间作槟榔优势及适宜种植密度研究[J]. 热带作物学报, 2014, 35(11): 2129-2133.
- YANG J F, ZU C, LI Z G, WANG C, YU H, WU H S, TAN L H. Study on the advantage and suitable planting density of areca nut in pepper garden[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(11): 2129-2133. (in Chinese)
- [15] 祖超, 李志刚, 王灿, 鱼欢, 邬华松, 杨建峰. 胡椒与槟榔间作对群体养分吸收利用的影响[J]. 热带作物学报, 2017, 38(11): 2014-2020.
- ZU C, LI Z G, WANG C, YU H, WU H S, YANG J F. Effects of intercropping of pepper and areca nut on population nutrient uptake and utilization[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2017, 38(11): 2014-2020. (in Chinese)
- [16] 王灿, 赵严, 罗丽霞, 李志刚, 杨建峰, 祖超, 鱼欢, 邬华松, 郑维全. 植物根系分泌物收集方法的比较研究——以槟榔为例[J]. 热带农业科学, 2020, 40(10): 21-29.
- WANG C, ZHAO Y, LUO L X, LI Z G, YANG J F, ZU C, YU H, WU H S, ZHENG W Q. Comparative study on collection methods of plant root exudates-taking areca nut as an example[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2020, 40(10): 21-29. (in Chinese)
- [17] 陈虹, 唐昊冶, 郭家欢, 潘畅, 王如海, 吴永红, 俞元春. 根系分泌物主要作用及解析技术进展[J]. 土壤, 2023, 55(2): 225-233.
- CHEN H, TANG H Y, GUO J H, PAN C, WANG R H, WU Y H, YU Y C. The main functions of root exudates and advances in analytical techniques[J]. Soils, 2023, 55(2): 225-233. (in Chinese)
- [18] 黄建凤, 吴昊. 植物根系分泌的有机酸及其作用[J]. 现代农业科技, 2008(20): 323-324.
- HUANG J F, WU H. Organic acids secreted by plant roots and their functions[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008(20): 323-324. (in Chinese)
- [19] WEN T, YUAN J, HE X, LIN Y, HUANG Q, SHEN Q. Enrichment of beneficial cucumber rhizosphere microbes mediated by organic acid secretion[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 154.
- [20] YANG Z X, YU S Z, LIN Y C, ZHANG W J, WANG Y, WANG R G, XU S X, YANG T Z, XUE G. Activation of potassium released from soil by root-secreted organic acids in different varieties of tobacco (*Nicotiana tabacum*)[J]. Functional Plant Biology, 2020, 47(4): 318-326.
- [21] YU P, HE X, BAER M, BEIRINCKX S, TIAN T, MOYA Y, ZHANG X, DEICHMANN M, FREY F P, BRESGEN V, LI C, RAZAVI B S, SCHAAF G, VON WIREN N, SU Z, BUCHER M, TSUDA K, GOORMACHTIG S, CHEN X, HOCHHOLDINGER F. Plant flavones enrich rhizosphere oxalobacteraceae to improve maize performance under nitrogen deprivation[J]. Nature Plants, 2021, 7(4): 481-499.
- [22] TIAN B, PEI Y, HUANG W, DING J, SIEMANN E. Increasing flavonoid concentrations in root exudates enhance associations between arbuscular mycorrhizal fungi and an invasive plant[J]. The ISME Journal, 2021, 15(7): 1919-1930.
- [23] 陈玲, 董坤, 杨智仙, 董艳, 汤利, 郑毅. 连作障碍中化感自毒效应及间作缓解机理[J]. 中国农学通报, 2017, 33(8): 91-98.
- CHEN L, DONG K, YANG Z X, DONG Y, TANG L, ZHENG Y. Autotoxic effect of allelopathy in continuous cropping disorder and mitigation mechanism of intercropping[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(8): 91-98. (in Chinese)
- [24] 程晓园. 拟南芥根系生长发育响应 L-亮氨酸及 L-赖氨酸的生物学机理研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- CHENG X Y. Study on biological mechanism of *Arabidopsis* root growth response to L-leucine and L-lysine[D]. Beijing: China Agricultural University, 2017.

- jing: China Agricultural University, 2017. (in Chinese).
- [25] 沈怡斐, 鄂垚瑶, 阳芳, 张楠, 黄启为, 沈其荣. 西瓜根系分泌物中氨基酸组分对多黏类芽孢杆菌 SQR-21 趋化性及根际定殖的影响[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(1): 101-108.
- SHEN Y F, E Y Y, YANG F, ZHANG N, HUANG Q W, SHEN Q R. Effects of amino acid components in watermelon root exudates on chemotaxis and rhizosphere colonization of *Bacillus polymyxa* SQR-21[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(1): 101-108. (in Chinese).
- [26] 陶茸, 师尚礼, 张翠梅, 陈建纲, 王晓瑛. 外源香豆素和咖啡酸对紫花苜蓿根系形态建成与解剖结构的影响[J]. 草地学报, 2019, 27(2): 404-412.
- TAO R, SHI S L, ZHANG C M, CHEN J G, WANG X Y. Effects of coumarin and caffeic acid on cell development at root tip and root margin of alfalfa[J]. Acta Agrariae Sinica, 2019, 27(2): 404-412. (in Chinese).
- [27] 赵绪生, 齐永志, 甄文超. 不同抗连作障碍品种草莓根系分泌物化感物质差异分析及其化感效应[J]. 河北农业大学学报, 2012, 35(3): 100-105.
- ZHAO X S, QI Y Z, ZHEN W C. Analysis of allelopathic substances in root secretion of strawberry cultivars with resistance to continuous cropping[J]. Journal of Hebei Agricultural University, 2012, 35(3): 100-105. (in Chinese).
- [28] 李坤. 葡萄连作障碍机理及调控途径的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2010.
- LI K. Study on mechanism and regulation pathway of grape continuous cropping obstacle[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2010. (in Chinese)
- [29] 胡元森, 李翠香, 杜国营, 刘亚峰, 贾新成. 黄瓜根分泌物中化感物质的鉴定及其化感效应[J]. 生态环境学报, 2007(3): 954-957.
- HU Y S, LI C X, DU G Y, LIU Y F, JIA X C. Identification of allelopathic substances in cucumber root secretion and their allelopathic effects[J]. Ecology and Environment sciences, 2007(3): 954-957. (in Chinese)
- [30] 王倩, 李晓林. 苯甲酸和肉桂酸对西瓜幼苗生长及枯萎病发生的作用[J]. 中国农业大学学报, 2003(1): 83-86.
- WANG Q, LI X L. Effects of benzoic acid and cinnamic acid on growth and *Fusarium* wilt of watermelon seedlings[J]. Journal of China Agricultural University, 2003(1): 83-86. (in Chinese).
- [31] LI Z G, ZU C, YANG J F, YU H, WU H S. Different responses of rhizosphere and non-rhizosphere soil microbial communities to consecutive *Piper nigrum* L. monoculture[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 35825.
- [32] LIDOY J, BERRIO E, GARCIA M, ESPANA-LUQUE L, POZO M J, LOPEZ-RAEZ J A. Flavonoids promote rhizosphere irregular spore germination and tomato root colonization: a target for sustainable agriculture[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1094194.
- [33] WANG G, JIN Z, WANG X, GEORGE T S, FENG G, ZHANG L. Simulated root exudates stimulate the abundance of Saccharimonadales to improve the alkaline phosphatase activity in maize rhizosphere[J]. Applied Soil Ecology, 2022, 170: 104274.
- [34] WANG S, DUAN S, GEORGE T S, FENG G, ZHANG L. Adding plant metabolites improve plant phosphorus uptake by altering the rhizosphere bacterial community structure[J]. Plant and Soil, 2024, 497(1/2): 503-522.
- [35] 李彦林, 陈杨洋, 杨霜溶, 刘菊梅. 植物根系分泌的有机酸对土壤碳氮矿化的影响[J]. 生态环境学报, 2024, 33(9): 1362-1371.
- LI Y L, CHEN Y Y, YANG S R, LIU J M. Effects of organic acids secreted by plant roots on soil carbon and nitrogen mineralization[J]. Ecology and Environment Sciences, 2024, 33(9): 1362-1371. (in Chinese)
- [36] 战宇, 张连学, 孟祥茹, 王恩鹏, 王欢, 唐敏, 李琼, 陈长宝. 不同盆栽人参土壤酚酸含量及酶活性变化[J]. 吉林农业大学学报, 2024, 46(1): 98-106.
- ZHAN Y, ZHANG L X, MENG X R, WANG E P, WANG H, TANG M, LI Q, CHEN C B. Changes of phenolic acid content and enzyme activity in soil of different potted ginseng[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2024, 46(1): 98-106. (in Chinese)
- [37] BADRI D V, CHAPARRO J M, ZHANG R, SHEN Q, VIVANCO J M. Application of natural blends of phytochemicals derived from the root exudates of arabidopsis to the soil reveal that phenolic-related compounds predominantly modulate the soil microbiome[J]. Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(7): 4502-4512.
- [38] HU H, TANG C, RENGEL Z. Role of phenolics and organic acids in phosphorus mobilization in calcareous and acidic soils[J]. Journal of Plant Nutrition, 2005, 28(8): 1427-1439.