

不同外源根系挥发物对杉木响应低磷胁迫的影响机理

李亚超^{4,2}, 张慧^{1,2}, 李林鑫^{1,2}, 李明^{1,2}, 马祥庆^{1,2}, 吴鹏飞^{1,2*}

1. 福建农林大学林学院 福州 350002; 2. 国家林业和草原局杉木工程技术研究中心 福州 350002

摘要:【目的】为深入探究植物根系挥发性有机化合物对植物响应胁迫的影响,明确不同外源根系挥发物对杉木响应低磷胁迫的影响机理。【方法】本研究以耐低磷 M25 号杉木无性系为材料,进行不同磷浓度下不同外源挥发物(丁香酸和 1-丁烯)处理,并对处理后杉木幼苗根系总长度、表面积、体积、直径、SOD、POD 等指标进行检测,同时对幼苗地上部分叶绿素、Fv:Fm 等光合指标进行检测,并对地上部分和地下部分磷含量、磷累积量以及磷利用效率进行分析,利用蛋白组学方法对不同处理中差异蛋白进行分析。【结果】1) 不同外源根系挥发物对杉木根系生长发育具有显著影响, P₀₁ 和 P₀₅ 处理下杉木幼苗根系的总长度显著下降, P₀₁ 显著促进了杉木根系表面积的增加, P₀₅ 处理显著提高了 MAD, 1-丁烯则对不同磷浓度处理下的杉木 MAD 和 Apase 具有显著性影响。在对抗氧化酶分析时发现, P₀₁ 和 P₀₅ 能处理显著上调抗氧化酶活性。2) P₀₅ 处理显著降低杉木的 Fv:Fo 和 Fv:Fm, P₀₁ 和 P₁₁ 处理下杉木幼苗 Fv:Fm 显著高于 P₁₅ 和 P₀₅ 处理下的。P_{1D} 处理显著促进也叶绿素 A、叶绿素 B 和总叶绿素的含量。3) 相较于 P₁₁, P₁₅ 显著促进整株杉木幼苗的磷素含量; P₁₁ 处理下整株磷素累积量却显著高于 P₁₅, P₀₁ 处理下整株的磷素累积量显著低于 P₁₁。4) P₀₁vs P₁₁ 组差异蛋白(22 个下调, 34 个上调)ABC 转运体通路和几丁质识别蛋白、几丁质酶 I 类等功能区域。P₀₅vs P₁₅ 组差异蛋白(112 个下调, 145 个上调)集中在苯丙酸生物合成、丙酮酸代谢等通路。P₀₅vs P₀₁ 组差异蛋白集中在 RNA 转运、光合作用等通路中和蛋白酪氨酸激酶、纤维素酶等功能区域。【结论】在研究中,我们发现不同根系挥发物的外源添加对杉木根系生长发育的调节作用具有差异性。1-丁烯在调节根系生长、提高抗逆性等方面对杉木幼苗缓解低磷胁迫具有重要意义,虽然丁香酸响应低磷胁迫调节杉木抗逆性,但丁香酸对高磷处理具有更强烈的响应。因此,本研究为低磷处理下添加不同外源挥发物对杉木的生长发育调节机制进行深入探索,同时为根系挥发物在营养元素胁迫中的影响机理研究提供理论参考意义。

关键词: 1-丁烯; 丁香酸; 低磷胁迫; 杉木

中图分类号: S718.4 **文献标识码:** A **文章编号:**

1 Regulation mechanism of different exogenous root exudates on response of Chinese fir to low phosphorus stress

Li Yachao^{1,2}, Zhang Hui^{1,2}, Li Linxin^{1,2}, Li Ming^{1,2}, Ma Xiangqing^{1,2}, Wu Pengfei^{1,2}

1. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, 350002; 2. China Fir Engineering Technology Research Center, National Forestry and Grassland Administration, Fuzhou, 350002

Abstract: 【Objective】 In order to investigate the effects of volatile organic compounds in plant roots on plant response to stress, the regulatory mechanism of different exogenous root volatiles on Chinese fir's response to low phosphorus stress was clarified. 【Methods】 In this study, the clones of M25 Chinese fir with low phosphorus tolerance were treated with different exogenous volatiles (syringic acid and 1-butene) at different phosphorus concentrations. The total root length, surface area, volume, diameter, SOD, POD and other indicators of treated Chinese fir seedlings were detected. At the same time, chlorophyll and Fv:Fm in the above-ground part of the seedlings were measured. The phosphorus content, phosphorus accumulation and phosphorus utilization efficiency of above-ground and underground parts were analyzed, and the different proteins in different treatments were analyzed by proteomics method. 【Results】 1) Different exogenous root volatiles had significant effects on the growth and development of Chinese fir roots. The total root length

基金项目: 国家自然科学基金[31870614]

*吴鹏飞为通讯作者

of Chinese fir seedlings significantly decreased under P_{01} and P_{0S} treatments, P_{01} significantly promoted the increase of root surface area, P_{0S} significantly increased MAD, 1-butene significantly affected MAD under different phosphorus concentrations. The same phenomenon was observed for apase. In the analysis of antioxidant enzymes, it was found that P_{01} and P_{0S} could significantly regulate the activity of antioxidant enzymes. 2) P_{0S} treatment significantly decreased Fv:Fo and Fv:Fm of Chinese fir seedlings. Exogenous 1-butene under P_{01} and P_{11} treatments was significantly higher than that under P_{1S} and P_{0S} treatments. P_{1D} treatment significantly promoted the content of chlorophyll A, chlorophyll B and total chlorophyll. 3) Compared with P_{11} , P_{1S} significantly promoted the phosphorus content of the whole Chinese fir seedlings; the phosphorus accumulation under P_{11} treatment was significantly higher than that under P_{1S} treatment, and the phosphorus accumulation under P_{01} treatment was significantly lower than that under P_{11} treatment. 4) P_{01} vs P_{11} group differential proteins (22 down-regulated, 34 up-regulated) ABC transporter pathway, chitin recognition proteins, chitinase class I and other functional regions. P_{0S} vs P_{1S} differential proteins (112 downregulated and 145 upregulated) were concentrated in phenylpropionic acid biosynthesis and pyruvate metabolism. P_{0S} vs P_{01} group differential proteins were concentrated in RNA transport, photosynthesis and other pathways to neutralise protein tyrosine kinase, cellulase and other functional regions. 【Conclusion】 In this study, we found that the exogenous addition of different root volatiles had different regulatory effects on the growth and development of Chinese fir roots. 1-Butene plays an important role in alleviating low phosphorus stress of Chinese fir seedlings by regulating root growth and improving stress resistance. While eugenol regulates stress resistance of Chinese fir seedlings in response to low phosphorus stress, dantivanic acid has a stronger response to high phosphorus treatment. Therefore, this study provided an in-depth exploration of the growth and development regulation mechanism of Chinese fir by adding different exogenous volatiles under low P treatment, and also provided a theoretical reference for research on the regulation mechanism of root volatiles under nutrient stress.

Key words: 1-butene; Syringic acid; Low phosphorus stress; Chinese fir

1 前言

磷是植物生长发育所必需的大量元素之一，以多种形式参与植物体内重要的代谢过程(Alexova and Millar, 2013)。然而，土壤有效磷含量低已成为全球 30%以上农林生产的主要限制因子(Fort et al., 2015)。岩石或凋亡植物为最初的植被发育提供了磷的主要来源，在数百万年的时间里，这种来源的磷素逐渐耗尽(Viana et al., 2022)，土壤中大部分磷素易被金属氧化物或碳酸盐化合物吸附固定(Wu et al., 2013)，亚马孙森林(Viana et al., 2022)、黄土高原农田(Liu et al., 2020)等广泛地区中植物生长发育受磷素限制的状况。然而，利用施肥等方式缓解植物对磷素的吸收和利用并不符合生产力的可持续发展。在生态环境中磷素利用度取决于土壤磷的供应和有机结合磷的回收有效性，由于磷在矿质土壤中的固定性，同样植物也具有不动性，因此，增强有效磷的吸收对植物来说似乎是一个巨大的挑战(Liu et al., 2020)。

杉木(*Cunninghamia lanceolata*)是我国南方广泛栽植的优质造林树种，但其主要分布的南方红壤区有效磷含量匮乏，这已大大限制了其速生性及可持续经营。在长期缺磷的土壤条件下，有些杉木地理种源或基因型已进化出高度复杂的特殊适应机制(邹显花等, 2019)。其中，杉木通过增加根系有机酸和质子的分泌是其抵抗低磷胁迫的策略之一，即通过酸化、络合或螯合等反应来溶解土壤中的难溶性磷(Wu et al., 2017; Zou et al., 2018)。低磷环境中杉木通过改变根系分泌物种类和数量影响磷素形态转化，提高磷有效性，是杉木适应低磷逆境的重要策略之一(蔡银美等 2021)。

植物根系挥发性有机化合物是一种重要的根系分泌物，作为外部化学信号，能够在植物不同部位以及邻近植物之间进行传递交流，影响邻近植物的萌发和生长，介导地下植物根系、土壤生物和食草动物之间的相互作用(Huang et al., 2019)。其中，它们已经被证明介导植物和植食性害虫之间的相互作用，受损植物部分释放的挥发物可以启动同一植物未受损部分的直接/间接防御机制(Das et al., 2013)。除了介导植物与昆虫之间的相互作用外，还可以介导植物与植物之间的通信。芽孢杆菌释放挥发物的作用机制显示，挥发物在短时间暴露后可调节多种细胞靶点，调节必需营养物质浓度、激素平衡、代谢和糖浓度，并且能在远距离激活目标，诱导地上部分和地下部分生长(Fincheira et al., 2017)，对于抵御生物或非生物胁迫有着重要作用(阮维斌等, 2010)。因此，根系挥发物在植物种内、种间的化学通讯中具有重要的意义。

综上，本研究采用室内模拟试验，选用课题组前期筛选出与低磷胁迫具有重要关系的丁香酸和 1-丁烯

为研究对象,以用于模拟低磷处理中根系挥发物对于杉木生长发育的作用。从形态、生理及分子三方面分析根系挥发物丁香酸和 1-丁烯对杉木响应低磷处理的调控机制,这将有助于进一步揭示出杉木在低磷处理下的应答体系,以深入了解根系挥发物对低磷处理环境杉木适应性策略的作用机制,为进一步阐明低磷环境杉木根系释放挥发物的应答策略和杉木人工林长期生产力维持理论及实践技术提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 植物材料和生长条件

杉木幼苗选用国家林业和草原局杉木工程技术研究中心培育的耐低磷 M25 号杉木无性系一年生的健壮幼苗(吴文景等,2019)。选用宽 20cm、高 18cm 的陶瓷盆容器,在福建农林大学林学院温室大棚(昼/夜:28°C/25°C, 16h/8h; 光子通量密度: $21 \text{ mol quanta m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$; 相对湿度: 白天 42.7%、夜晚 67.7%)内进行室内盆栽模拟沙培试验,为避免因环境改变造成植株变化,在大棚中缓苗一个月后进行处理(Wu et al., 2014)。

杉木幼苗低磷处理设计 2 个供磷水平,2 个丁香酸和 1-丁烯浓度水平:高磷处理添加丁香酸($1.0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 200mg/L Syringic acid P_{15})、低磷处理添加 L-精氨酸($0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1.0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, P_{05})、高磷处理下添加 1-丁烯 ($1.0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, 2ml/盆 1-butylene, P_{11})和低磷处理下添加 1-丁烯($0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1.0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, 2ml/盆 1-butylene, P_{01})、高磷处理不添加挥发物($1.0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, P_1)、低磷处理不添加挥发物($0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$, $1.0 \text{ mM} \cdot \text{L}^{-1} \text{ KCl}$, P_0)。为避免钾离子浓度造成实验误差,低磷处理中使用 KCl 补齐钾离子,为满足实验处理期间幼苗对其他元素的需求,根据改良的 1/3Hoagland 不完全营养液进行补充(Wu et al.,2011),每次每盆各浇 200 ml 营养液,三天一次。用于杉木幼苗培养的沙全磷浓度为 $0.034 \pm 0.007 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,有效磷为痕量。每个供磷水平在处理开始时分别添加外源根系挥发物丁香酸(上海麦克林公司,上海,中国)和 1-丁烯(成都华夏化学有限公司,成都,中国),丁香酸和 1-丁烯浓度参考前人实验(Lai et al.,2018; 梁薇薇等, 2021)。处理时将 L-精氨酸按比例混合在营养液中,与营养液一同浇灌;处理周期选择杉木响应低磷处理大量产生根系挥发物的时间:7 天(Lai et al., 2018),处理时间为 2021 年 9 月 1-7 日,每个处理进行 6 个重复。

为保证进行蛋白组学和生理指标检测的样品具有足够的活性及形态指标样品具有重量和形态上的正确性,将 6 个重复分成 A, B 两组,每组三个重复, A 组在处理结束后使用纯水反复冲洗至干净,使用吸水纸将幼苗水分蘸取干净,迅速标号标记放入液氮中速冻,并在 -80°C 储存;另一组在处理结束后使用纯水反复冲洗至干净,将幼苗水分蘸取干净,进行形态指标等检测。

2.2 生物量测定和根系生长指标测定

B 组幼苗利用数字化扫描仪(STD1600 Epson, USA)进行扫描,并用 WinRHizo(version4.0B, USA)根系分析软件分析根系的总根长、总表面积、总平均直径和总体积。处理后的杉木幼苗的地上和地下部分于 108°C 下杀青, 80°C 烘干至恒重,并对地上部分和地下部分称量,小数点精确到千分位。

2.3 磷素含量及抗氧化酶活的测定

[1] 对烘干后的样品进行粉碎并过 100 目筛子,称取过筛后样品各 0.002g,采用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-HClO}_4$ 消煮法(国家标准; GB/T1.1-1993),使用 Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer(ICP-OES)Optima 8000(珀金埃尔默仪器有限公司生产,上海,中国)测定磷素含量(g/kg);利用公式计算每个重复地上部分、地下部分和全株的磷素利用效率和磷累积量,磷素利用效率=干重 mg/(干重 mg*磷素含量 mg/kg);磷素累积量=干重 mg*磷素含量 mg/kg(吴文景等, 2020);称取 0.20g 鲜品使用采用氮蓝四唑(NBT)方法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性(于姣姐等, 2017);采用愈创木酚比色法测定过氧化物酶(POD)活性(于姣姐等, 2017)。采用硫代巴比妥酸显色法测定丙二醛(MDA)含量(陈敏, 2021);参照 Mclachlan 等的方法测定根系酸性磷酸酶(Apase)活性(陈敏, 2021)。

2.4 光合特性测定

选在早上 9:00-11:00, 使用 OS-30P 荧光仪(LI-Cor, 美国)对颜色、大小均相当的杉木叶片进行叶绿素荧光参数进行测定。

2.5 蛋白组学检测

蛋白提取及浓度测定: 将样品从超低温冰箱取出, 称取适量, 至研钵中加液氮充分研磨至粉末状。加入缓冲液后超声裂、离心, 取上清液加入乙酸铵/甲醇, 过夜后用甲醇和丙酮洗涤蛋白沉淀, 用尿素复溶。使用标准品对照, 利用酶标仪测定, 计算样品中的蛋白浓度。

SDS-PAGE: 根据蛋白浓度测定结果, 加样品到离心管中, 依次加入 Loading buffer、SDS; 依次将预染蛋白和蛋白样品上样, 样品相邻的空白孔上样 20 μ L 1 \times Loading buffer 封闭; 浓缩胶至蛋白浓缩为一条线; 分离胶至 dye 电泳到胶底部; 胶取出后用考马斯亮蓝染色, 然后脱色至条带清晰。

胰酶酶解: 取等量样品蛋白, 加入 20% TCA 后涡旋混匀沉淀。离心 5 mins 后用丙酮洗涤沉淀。晾干沉淀后加入 200 mmol/L 的 TEAB 用超声打散沉淀, 加入胰蛋白酶进行酶解过夜。加入二硫苏糖醇使其终浓度为 5 mmol/L, 56 $^{\circ}$ C 还原 30 mins。加入碘乙酰胺使其终浓度为 11 mmol/L, 室温避光孵育 15 mins。

液相色谱-质谱联用分析: 将肽段用液相色谱流动相 A 溶解后, 用 NanoElute 超高效液相系统进行分离。肽段经由超高效液相系统分离后被注入 Capillary 离子源中进行电离然后进 Tims TOF Pro 质谱进行分析。在搜索前, 使用 Maxquant (v1.6.15.0, 德国)检索二级质谱数据。

2.6 生物信息学分析

蛋白的 GO 注释被分为 3 个大类: 生物过程、细胞组分、分子功能。使用费希尔精确检验 (Fisher's exact test) 对差异表达蛋白进行 GO(Gene Ontology)富集显著性分析 (以鉴定到的蛋白为背景), P value < 0.05 被认为是显著的。KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 数据库用于差异表达蛋白的通路富集分析。使用费希尔精确检验 (Fisher's exact test) 对差异表达蛋白进行通路富集显著性分析 (以鉴定到的蛋白为背景), P value < 0.05 被认为是显著的。Pfam 数据库用于分析差异表达蛋白的功能结构域的富集情况。费希尔精确检验方法被用于检验差异表达蛋白在以鉴定蛋白为背景下的结构域富集显著性, P value < 0.05 被认为是显著的。

2.7 数据统计分析

三个生物重复用于根系形态分析; 三个生物重复和每个生物重复的两个技术重复用于生化分析。采用 T 检验(T-test)在显著水平 0.05 和 0.001 对不同处理组之间的差异进行分析。SPSS 19.0(IBM, 美国)用于执行统计分析; 热图使用 heatmapper (<http://www.heatmapper.ca/>)进行绘制。

3 结果

3.1 不同外源根系挥发物对杉木根系生长发育的影响

不同外源根系挥发物对杉木根系生长发育具有显著影响(表 1)。相较于高磷处理, P₀₁ 和 P_{0S} 处理下杉木幼苗根系的总长度显著下降, 两种不同外源根系挥发物添加之间并没有显著差异。然而, 对比于 P_{0S}, P₀₁ 显著促进了杉木根系表面积的增加。相较于丁香酸, 外源 1-丁烯的添加都显著提高了杉木根系体积, 但杉木根系的直径显著降低, 并且在低磷处理下降低的显著性更强。相较于 P_{1S}, P_{0S} 处理显著提高了 MAD, 1-丁烯则对不同磷浓度处理下的杉木 MAD 具有显著性影响, 同样的现象在 Apase 中被发现。在对抗氧化酶分析时发现, 相较于 P₁₁, P₀₁ 能促进低磷处理下 SOD 和 POD 的活性, P_{0S} 处理提高 POD 活性, 但对 SOD

酶活性没有显著影响。

表 1 不同外源挥发物下杉木幼苗根系生长发育状况

Table 1 Root growth and development of Chinese fir seedlings under different exogenous volatiles

处理 Treatment	根系总长 Total root length(cm)	根系表面 面积 Root surface area(cm ²)	根系体积 Root volume(cm ³)	根系直径 Root diameter(m)	酸性磷酸酶 Acid phosphatase(U· g ⁻¹ ·min ⁻¹)	过氧化物酶 Peroxidase(U· g ⁻¹ ·min ⁻¹)	超氧化物歧化酶 Superoxide dismutase(U·g ⁻¹ · min ⁻¹)
P _{1S}	836.012A a	222.662A a	4.580Aa	0.923Aa	75.496Aa	81.654Aa	219.975Aa
P ₁₁	967.793A a	243.087A a	5.402Ba	0.900Ba	78.322Aa	76.486Aa	202.401Ab
P _{0S}	723.229A b	213.337A a	4.855Aa	0.857Aa	84.661Ab	125.413Aa	244.296Aa
P ₀₁	747.571A b	257.645B a	6.268Bb	0.823Ba	79.568Aa	129.845Ab	243.183Ab

大写字母表示在同一磷浓度进行对比，小写字母表示在同一外源挥发物浓度水平进行对比，不同字母表示处理间存在显著差异，采用 T 检验(T-test) ($p < 0.05$) 进行数据分析。

Note: Uppercase letters indicate comparison at the same phosphorus concentration, lowercase letters indicate comparison at the same exogenous volatile concentration level, and different letters indicate significant differences between treatments. T-test ($p < 0.05$) was used for data analysis.

3.2 不同外源根系挥发物对杉木光合指标的影响

不同外源根系挥发物对杉木光合指标具有显著影响(表 2)。无论是不同磷浓度处理还是不同根系挥发物的外源添加对杉木 Fo 和 Fv 都没有显著性影响。相比于 P_{1S}，P_{0S} 处理显著降低杉木的 Fv:Fo 和 Fv:Fm，但对比与 P₁₁，P₀₁ 对杉木 Fv:Fo 值没有显著性影响。P₀₁ 和 P₁₁ 处理下的外源 1-丁烯的添加下杉木幼苗 Fv:Fm 显著高于 P_{1S} 和 P_{0S} 处理下的。相较于 P₁₁，P_{1D} 处理显著促进也叶绿素 A、叶绿素 B 和总叶绿素的含量。

表 2 不同外源挥发物下杉木幼苗光合指标变化情况

Table 1 Photosynthetic indices of Chinese fir seedlings under different exogenous volatiles

处理 Treatment	Fo	Fv	Fv-Fo	Fv-Fm	叶绿素 A	叶绿素 B	总叶绿素 Total
					Chlorophyll A (mg·g ⁻¹)	Chlorophyll B (mg·g ⁻¹)	chlorophyll(mg·g ⁻¹)
P _{1S}	0.028Aa	0.135 Aa	3.810Aa	0.793Aa	1.057Aa	4.694Aa	5.753Aa
P ₁₁	0.032Aa	0.122 Aa	3.089Aa	0.753Aa	0.687Ba	3.369Ba	4.057Ba
P _{0S}	0.030 Aa	0.109 Aa	2.696Ab	0.697Ab	1.101Aa	5.296Aa	6.399Aa
P ₀₁	0.030 Aa	0.125 Aa	3.181Aa	0.770Ba	0.961Aa	4.420Aa	5.381Aa

大写字母表示在同一磷浓度进行对比, 小写字母表示在同一外源挥发物浓度水平进行对比, 不同字母表示处理间存在显著差异, 采用 T 检验(T-test) ($p < 0.05$)进行数据分析。

Note: Uppercase letters indicate comparison at the same phosphorus concentration, lowercase letters indicate comparison at the same exogenous volatile concentration level, and different letters indicate significant differences between treatments. T-test ($p < 0.05$) was used for data analysis.

3.3 不同外源根系分泌物对杉木磷素的影响

无论是不同磷浓度处理还是不同根系挥发物的外源添加对杉木地下部分磷素含量、磷素累积量、磷素利用效率和地上部分磷素含量、磷素累积量和磷素利用效率没有显著性影响(表 3)。对比 P₁₁, P_{1S} 显著促进整株杉木幼苗的磷素含量; P₁₁ 处理下整株磷素累积量却显著高于 P_{1S}, P₀₁ 处理下整株的磷素累积量显著低于 P₁₁。

表 3 不同外源挥发物对杉木磷素含量、磷累积量和磷利用效率的影响

Table 3 Effects of different exogenous volatiles on phosphorus content, phosphorus accumulation and phosphorus utilization efficiency of Chinese fir

处理 Treatment	地下部分磷含量 Phosphorus content in underground parts(g·kg ⁻¹)	地上部分磷含量 Phosphorus content in above-ground parts(g·kg ⁻¹)	全株磷含量 Phosphorus content in whole plant(g·kg ⁻¹)	地下部分磷积累量 Phosphorus accumulation in underground parts(g)	地上部分磷积累量 Phosphorus accumulation in above-ground part(g)	全株磷积累量 Total plant phosphorus accumulation(g)	地下部分磷利用率 Phosphorus utilization efficiency in underground part(kg·g ⁻¹)	地上部分磷利用率 Phosphorus utilization efficiency in above-ground part(kg·g ⁻¹)	全株磷利用率 Phosphorus utilization efficiency in whole plant(kg·g ⁻¹)
P _{1S}	0.583Aa	1.511 Aa	2.165Aa	1.194 Aa	4.553 Aa	5.772Aa	1.739 Aa	0.673 Aa	0.756 Aa
P ₁₁	0.610Aa	1.295 Aa	1.905Ba	1.344 Aa	5.348 Aa	7.253Ba	1.673 Aa	0.793 Aa	0.853 Aa
P _{0S}	0.700Aa	1.403 Aa	2.104Aa	1.393 Aa	4.791 Aa	6.185Aa	1.498 Aa	0.748 Aa	0.841 Aa
P ₀₁	0.548Aa	1.434 Aa	1.982Aa	1.220 Aa	4.891 Aa	5.570Bb	1.867 Aa	0.721 Aa	0.848 Aa

注：大写字母表示在同一磷浓度进行对比，小写字母表示在同一外源挥发物浓度水平进行对比，不同字母表示处理间存在显著差异，采用 T 检验(T-test) ($p < 0.05$)进行数据分析。

Note: Uppercase letters indicate comparison at the same phosphorus concentration, lowercase letters indicate comparison at the same exogenous volatile concentration level, and different letters indicate significant differences between treatments. T-test ($p < 0.05$) was used for data analysis.

3.4 不同外源根系分泌物处理下各指标相关性分析

P₀₁ 处理时，杉木幼苗形态生理指标之间的相互联系如图 1A 所示，根表面积与根平均直径、全株 P 利用效率、反应中心 PS II 潜在的活性 Fv/Fo 及 MDA 含量有显著负相关性，地上部生物量与地上部磷积累量有显著正相关性，根系生物量与根系磷积累量有显著正相关性；地上部磷含量与地上部磷积累量与全株磷利用效率有显著负相关性，而地上磷利用效率与全株磷利用效率显著正相关；反应中心磷 S II 潜在的活性 Fv/F0 与地上磷积累量显著负相关，与地上磷利用效率和全株磷利用效率显著正相关。

P_{0S} 处理时，杉木幼苗形态生理指标之间的相互联系如图 1B 所示，根长与反应中心 PS II 最大光能转换效率 Fv/Fm、反应中心 PS II 潜在的活性 Fv/F0 以及根系 Apase 显著负相关，根表面积和根体积与根系磷利用效率显著负相关，地上部磷含量与地上部磷利用效率显著负相关，根系磷含量与根系磷利用效率有显著负相关性，反应中心 PS II 潜在的活性 Fv/F0 与根系 Apase 活性显著正相关，与根系 POD 酶活性显著负相关。

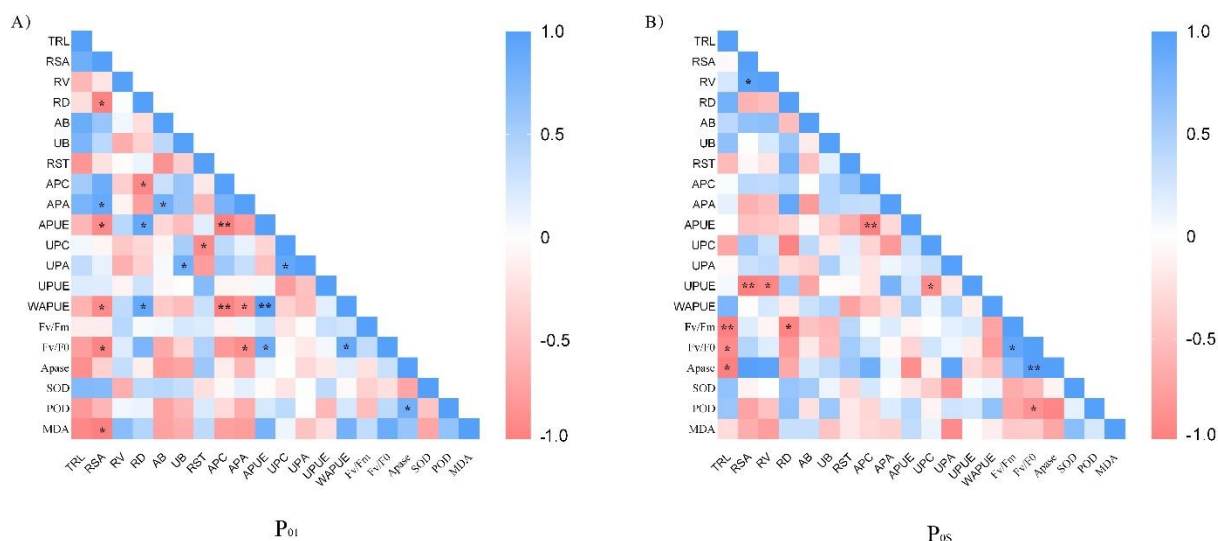


图 1 P₀₁ 和 P₀₅ 处理下各指标的相关性分析

Figure 1 P₀₁ and P₀₅ treatment of the correlation analysis of the indicators

注: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, AB: 地上部分生物量(Aboveground biomass)、APA:地上部分磷累积量(Aboveground phosphorus accumulation)、APC: 地上部分磷含量(Aboveground phosphorus content)、APUE: 地上部分磷利用效率(Aboveground phosphorus utilization efficiency)、ARD: 根直径(Average root diameter)、Fv/Fm: 叶绿体光系统 II 光化学最大吸收量(Maximum quantum yield of Photosystem II photochemistry)、POD: 过氧化物酶(Peroxidase)、PUEWP: 全株磷利用效率(Phosphorus utilization efficiency of whole plant)RSR: 根冠比(Root-shoot ratio)、SOD:超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)、TRL: 总根长(Total root length)、TRSA: 总根表面积(Total root surface area)、TRV: 总根体积(Total root volume)、UB: 地下部分生物量(Underground biomass)、UPA:地下部分磷累积量(Underground phosphorus accumulation)、UPC:地下部分磷含量(Underground phosphorus content)UPUE:地下部分磷利用效率(Underground phosphorus utilization efficiency)。

Note: *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, AB: Aboveground biomass, APA: Aboveground phosphorus accumulation, APC: Aboveground phosphorus content, APUE: Aboveground phosphorus utilization efficiency, ARD: Average root diameter, Fv/Fm: Maximum quantum yield of Photosystem II photochemistry, POD: Peroxidase, PUEWP: Phosphorus utilization efficiency of whole plant, RSR: Root-shoot ratio, SOD: Superoxide dismutase, TRL: Total root length, TRSA: Total root surface area, TRV: Total root volume, UB: Underground biomass, UPA: Underground phosphorus accumulation, UPC: Underground phosphorus content, UPUE: Underground phosphorus utilization efficiency.

3.5 不同外源根系分泌物对杉木差异的影响

3.5.1 差异蛋白的鉴定

为深入分析外源挥发物对杉木低磷处理下的内在调控机制，我们选择直接接触到外源挥发物的杉木根系进行蛋白组学研究。在对不同处理下杉木根系进行蛋白组学的检测，发现不同处理组别之内具有较好重复性(图 2A)。因此，蛋白组学结果具有可信性。P₀₁vs P₁₁具有 56 个(22 个下调，34 个上调)差异蛋白，P₀₅vs P₁₅之间对发现具有 257 个(112 个下调，145 个上调)差异蛋白不同磷浓度处理下，P₀₅vs P₀₁具有 201 个(115 个下调，86 个上调)差异蛋白(图 2B)。

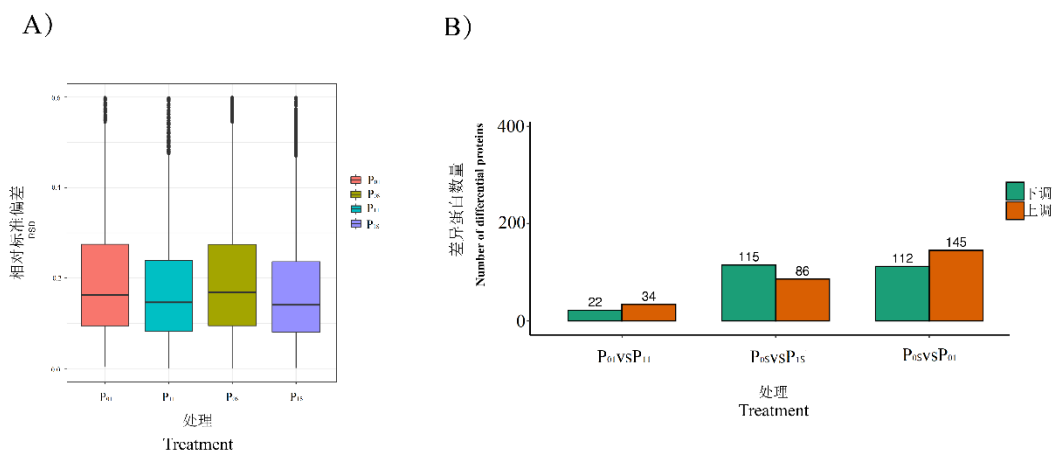


图 2 蛋白组学中相对标准偏差和差异蛋白数量

Fig. 2 Relative standard deviation and differential protein number in proteomics

3.5.2 差异蛋白功能富集分析 通过对 P₀₁vs P₁₁ 组差异蛋白进行 GO 功能注释分析发现(图 3 A), 较多差异蛋白集中在细胞(26)、细胞内(23)等方面。通过对 P₀₁vs P₁₁ 组差异蛋白进行 KEGG 功能富集分析发现(图 4A), 较多差异蛋白集中在 ABC 转运体(2)等方面。通过对 P₀₁vs P₁₁ 组差异蛋白进行 Domain 功能富集分析发现(图 4D), 较多差异蛋白集中在几丁质识别蛋白(2)、几丁质酶 I 类(2)、花粉过敏原(2)等功能区域。通过对 P₀₁vs P₁₁ 组差异蛋白进行亚细胞定位分析发现(图 5A), 较多差异蛋白集中在细胞质(18)、叶绿体(16)等部位。

通过对 P₀₅vs P₁₅ 组差异蛋白进行 GO 功能富集分析发现(图 3B), 较多差异蛋白集中在细胞(118)、细胞内(108)等方面。通过对 P₀₅vs P₁₅ 组差异蛋白进行 KEGG 功能富集分析发现(图 4B), 较多差异蛋白集中在苯丙酸生物合成(13)、丙酮酸代谢(9)、糖酵解/糖异生(9)、丙酸代谢(5)、醚脂质代谢(3)等方面。通过对 P₀₅vs P₁₅ 组差异蛋白进行 Domain 功能富集分析发现(图 4F), 较多差异蛋白集中在 FAD 结合域(5), 小檗碱和小檗碱样(3), 几丁质识别蛋白(3)等功能区域。通过对 P₀₅vs P₁₅ 组差异蛋白进行亚细胞定位分析发现(图 5B), 较多差异蛋白集中在叶绿体(98), 细胞质(70)等部位。

通过对 P₀₅vs P₀₁ 组差异蛋白进行 GO 功能富集分析发现(图 3C), 较多差异蛋白集中在细胞(97)、细胞内(81)等方面。通过对 P₀₅vs P₀₁ 组差异蛋白进行 KEGG 功能富集分析发现(图 4C), 较多差异蛋白集中在 RNA 转运(9)、光合作用(2)等通路中。通过对 P₀₅vs P₀₁ 组差异蛋白进行 Domain 功能富集分析发现(图 4F), 较多差异蛋白集中在蛋白酪氨酸激酶(4)、纤维素酶(糖基水解酶家族 5)(3)、CS 结构域(2)、肽酶二聚化结构域(2)等功能区域。通过对 P₀₅vs P₀₁ 组差异蛋白进行亚细胞定位分析发现(图 5C), 较多差异蛋白集中在叶绿体(51)、细胞质(46)等部位。

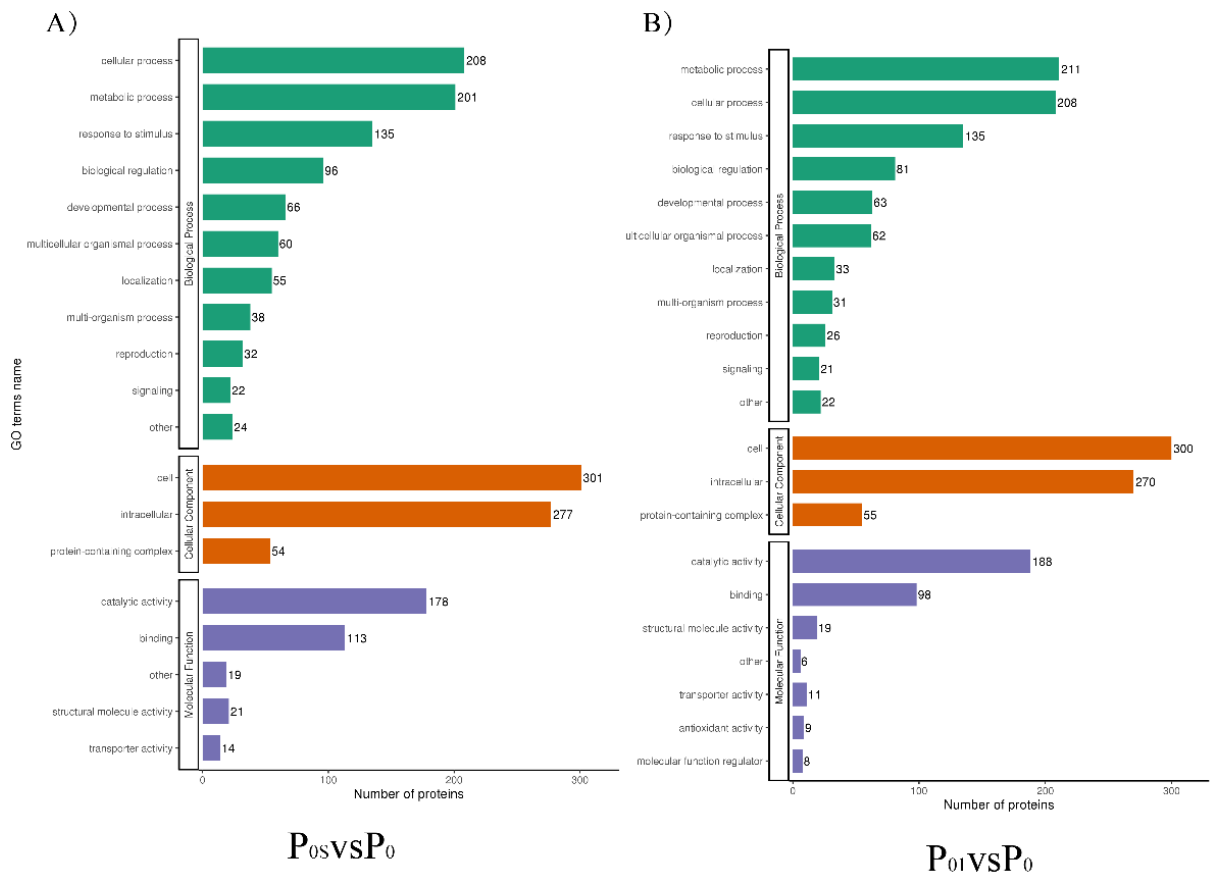


图 3 不同处理下差异蛋白 GO 功能注释情况

Fig. 3 Functional annotation of differential protein GO under different treatments

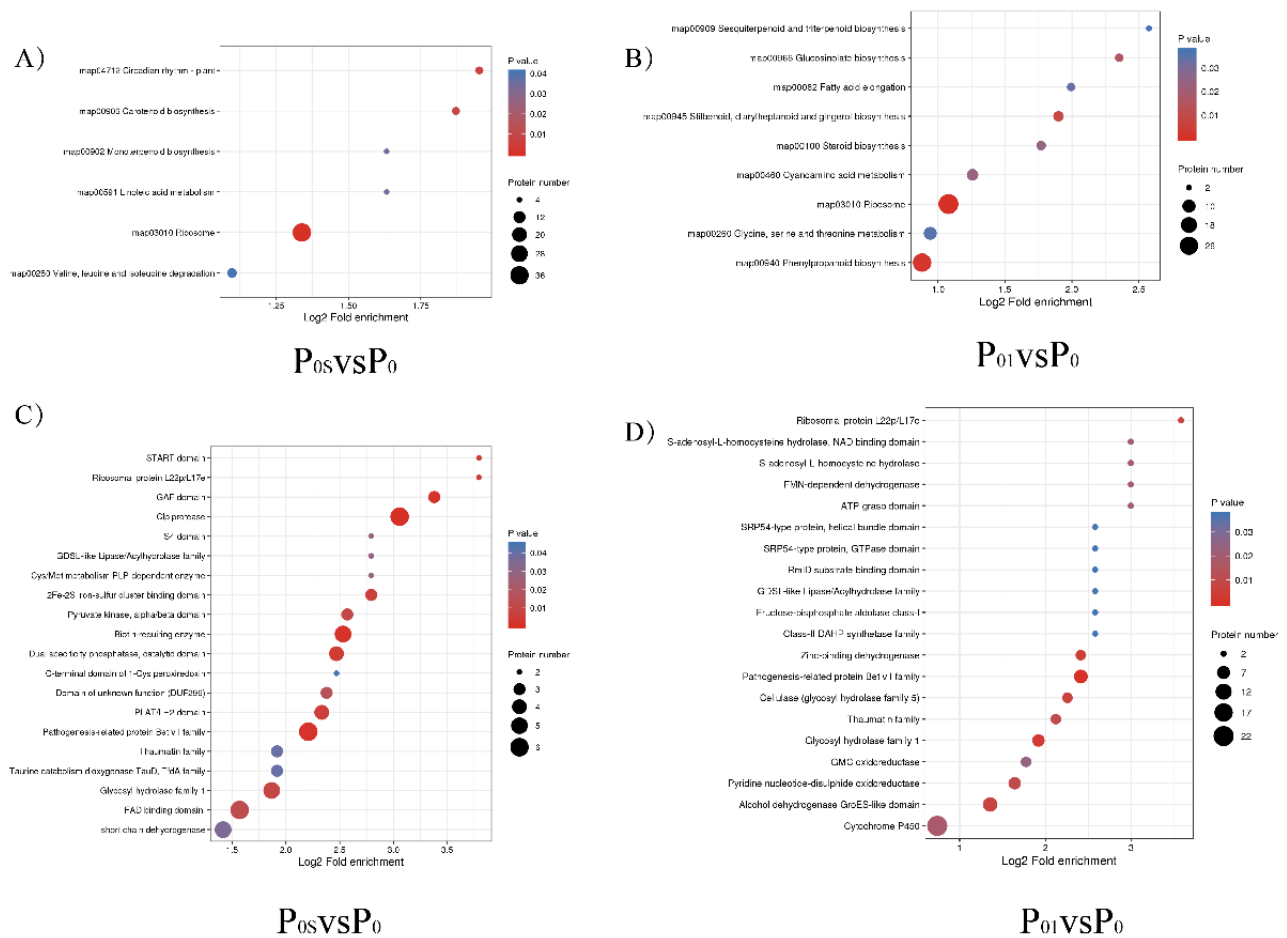


图 4 不同处理下差异蛋白 KEGG 和 Domian 富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of differential proteins KEGG and Domian under different treatments

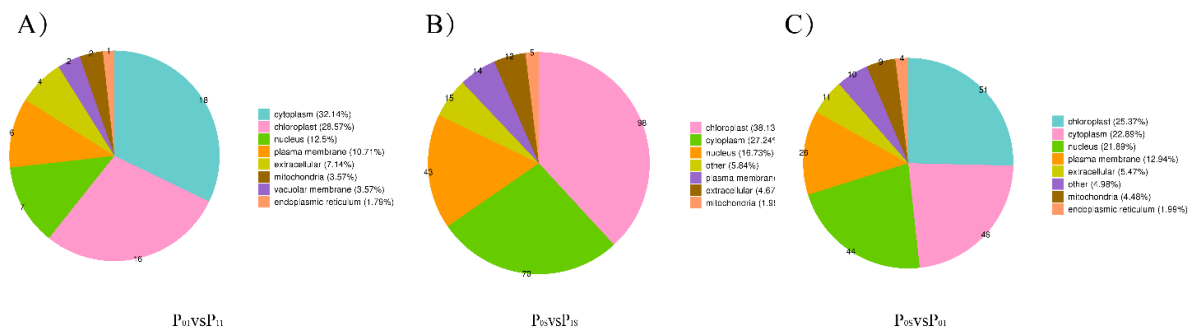


图 5 不同处理下差异蛋白亚细胞定位分析

Fig. 5 Subcellular localization analysis of differential proteins under different treatments

4 讨论

植物根系作为重要的“感知系统”，受环境养分信息和邻居竞争关系的影响会改变其根系行为，表现出较强的可塑性(任永哲等，2011；Garlick et al., 2021)。其中，毗邻根系分泌物释放的化学信号物质和化感物质是驱动根系形态发生变化的重要原因之一(Wang et al., 2021)。这使处于逆境中的植物对所遭遇的挑战或

机遇及时做出反应(Falik et al., 2006)。低磷处理下,根系中丁香酸和 1-丁烯的分泌量具有显著变化。因此,本研究对不同外源根系挥发物添加下的杉木进行研究,深入探究不同根系挥发物对低磷胁迫下杉木生长发育的作用机制,为植物根系挥发物响应非生物胁迫提供根系解析策略。

4.1 不同外源挥发物的添加对杉木幼苗的生长发育以及提高杉木幼苗抵抗性的影响

相比于 P_{1S} 和 P_{11} 处理, P_{0S} 和 P_{01} 显著降低低磷环境下杉木幼苗根系的总长度,但两种不同外源根系挥发物添加之间并没有显著差异(表 1)。相较于 P_{0S} , P_{01} 显著促进了杉木根系表面积的增加,当根系与土壤表面积的接触增加时,磷素的吸收量也会随之增加(Liao et al., 2003; Zhou et al., 2017)。因此,外源 1-丁烯的添加比丁香酸的添加更能促进杉木幼苗对磷的吸收。同时发现添加外源 1-丁烯下杉木根系体积比添加丁香酸的更大,直径也会更小(表 1)。两种外源挥发物的添加便显出对根系生长的不同调控状态,外源 1-丁烯的添加是对根系吸收磷具有正向作用,提高根系表面积和体积、降低了根系直径,提高了对磷的吸收能力。

POD、SOD 等抗氧化酶作为一种抗氧化剂,是植物应对生物和非生物胁迫的重要初始防御(Cocozza et al., 2022; Tewari et al., 2021)。我们在对杉木根系 SOD 和 POD 等抗氧化酶进行检测时发现, P_{01} 处理显著促进 SOD 和 POD 活性(表 1),而在蛋白组学数据中并没有发现调控 POD 和 SOD 的蛋白发生显著差异, P_{01} 处理显著提高 POD 酶活性,发现调控 POD 的差异蛋白表现出下调,调控 SOD 酶活性的差异蛋白显著上调。蛋白表达情况更加敏感,极有可能外源添加挥发物质缓解低磷胁迫后,抗氧化相关蛋白表达恢复正常状况。因此,可以判断 1-丁烯的添加更能提高杉木幼苗的抗逆性,同时具有具有更强缓解低磷胁迫的能力,而丁香酸具有较弱调节能力。

P_{0S} 处理下杉木的 Fv:Fo 和 Fv:Fv 被显著降低,同时 P_{01} 处理下的 Fv:Fv 值显著高于 P_{0S} (表 2)。相对比于 P_{11} , P_{1D} 的处理显著提高了叶绿素 A、叶绿素 B 和总叶绿素的含量(表 2)。因此,通过对外源挥发物的对比发现,外源丁香酸的添加促进高磷处理下幼苗的光合作用,降低低磷处理下幼苗的光合作用,而 1-丁烯促进低磷处理下幼苗光合作用,提高低磷处理下幼苗的光合作用。

4.2 不同外源挥发物的添加对杉木幼苗的生长发育以及提高杉木幼苗抵抗性的内在影响机理

相对比于 P_{0S} vs P_{1S} 处理之间的 275 个差异蛋白, P_{01} vs P_{11} 之间发现较少的差异蛋白,只有 56 个差异蛋白,并且集中在 ABC 转运通路上(图 2B、4A)。 P_{0S} vs P_{1S} 具有 275 个差异蛋白,主要集中在苯丙烷代谢通路(13)中(图 2B、4B),并且在 13 个差异蛋白中 10 个差异蛋白属于显著下调,3 个差异蛋白显著上调,说明外源丁香酸的添加降低了低磷处理下杉木根系中类黄酮物质的生物合成。在对 Domain 进行分析时发现,主要集中在 FAD 结合域(图 4E),FAD 结合域也是氧化还原酶的主要结构域(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/PF00667>),表明外源丁香酸的添加显著提高低磷处理下杉木幼苗的抗氧化活性。为深入分析外源挥发物质的添加与低磷胁迫之间的响应关系,我们对比 P_{01} 和 P_0 之间的蛋白组学数据,分析发现, P_{01} vs P_0 之间共有 615 个差异蛋白,差异蛋白主要集中在苯丙烷代谢通路(27)通路中(附图 2B),并且大部分处于上调状态,因此外源 1-丁烯的添加促进低磷处理下杉木根系中类黄酮物质的合成,并且在 Domain 富集过程中(附图 2D),也发现多个抗氧化功能区域。同时也对 P_{0S} 和 P_0 之间的蛋白数据进行对比,发现差异蛋白主要集中在核糖体(附图 2A),核糖体是通过高度调节的细胞过程产生的,该过程决定了细胞的生长能力(Lempiaainen and Shore, 2009),这表明外源丁香酸的添加对杉木幼苗生理生化具有显著的影响。

通过不同处理之间蛋白组学数据对比,我们发现了一个有趣的现象, P_{0S} vs P_{1S} 时有较多差异蛋白显著富集在苯丙烷代谢通路中(图 4B),而在 P_{0S} vs P_0 却没有发现这种情况(附图 2A),在 P_{01} vs P_0 时发现较多差异蛋白集中在苯丙烷代谢通路中(附图 2B),在 P_{01} vs P_{11} 时却没有发现这种情况(图 4A),因此我们可以推断,外源丁香酸对杉木根系类黄酮物质的调节作用主要是取决于高磷处理,外源 1-丁烯则可以影响低磷

处理下苯丙烷类生物合成，而不是受高磷处理的影响。这也与我们前面生理结果相吻合。

为了验证我们的假设，我们对 P_{11} vs P_1 和 P_0 vs P_1 数据进行分析发现，并没有发现苯丙烷代谢通路被显著富集；同时对 P_{1S} vs P_1 和 P_0 vs P_1 数据进行分析发现，也没有发现苯丙烷代谢通路被显著富集到，因此我们可以确定，苯丙烷物质代谢途径是外源 1-丁烯响应低磷胁迫的主要途径。同时对比 P_{0S} 和 P_{01} ，可以发现

不同挥发物处理不仅仅是不同的影响作用，也具有相同的影响作用。苯丙氨酸氨裂解酶(Phenylalanine ammonia-lyase: PAL) 是苯丙烷代谢通路中关键的“门户酶”，PAL 是含螺旋的蛋白质，在其催化活性位点中含有一个共同结构域 4-甲基二烯-咪唑-5-酮 (MIO) (Poppe, 2001; Strom et al., 2012)。在植物中，PAL 蛋白主要由多基因家族编码，特定的 PAL 通常表现出独特但重叠的表达模式，这表明 PAL 亚型具有独特但冗余的功能(Zhang and Liu, 2015)。PAL 在 P_{01} vs P_0 中具有最大表达差异值—35 倍，然而在 P_{01} vs P_{11} 、 P_{11} vs P_1 中均未检测到这个差异蛋白的存在，因此我们推测 PAL 在 1-丁烯响应低磷胁迫中发挥着重要作用(附图 4)。同时在 P_{0S} vs P_0 中发现具有最大差异的蛋白也是 PAL，差异倍数具有 25 倍之高，在对 P_{0S} vs P_{1S} 、 P_{1S} vs P_1 中均未发现 PAL 作为差异蛋白出现(附图 4)。PAL 会受到低磷胁迫的调节而发生上调(Gho et al., 2020; Zhang and Liu, 2015; Al-Shwaiman et al., 2022; He et al., 2022)，本研究中发现 PAL 受到低磷胁迫下调，但受丁香酸和 1-丁烯影响而显著上调，外源挥发物的添加调节 PAL 从而缓解杉木的低磷胁迫。

5 结论

综上所述，通过对杉木响应外源根系挥发物添加的研究，揭示根系挥发物对杉木响应低磷胁迫的具有重要意义。在研究中，我们发现不同根系挥发物的外源添加对杉木根系生长发育的调节作用具有差异性。1-丁烯在调节根系生长、提高抗逆性等方面对杉木幼苗缓解低磷胁迫具有重要意义，虽然丁香酸响应低磷胁迫调节杉木抗逆性，但丁香酸对高磷处理具有更强烈的响应，不同根系挥发物对低磷的响应影响机理是不同，1-丁烯明显更能协助幼苗缓解低磷胁迫。因此，本研究为低磷处理下添加不同外源挥发物对杉木的生长发育影响机理进行深入探索，同时为根系挥发物在营养元素胁迫中的影响机理研究提供理论参考意义。

参考文献

附件

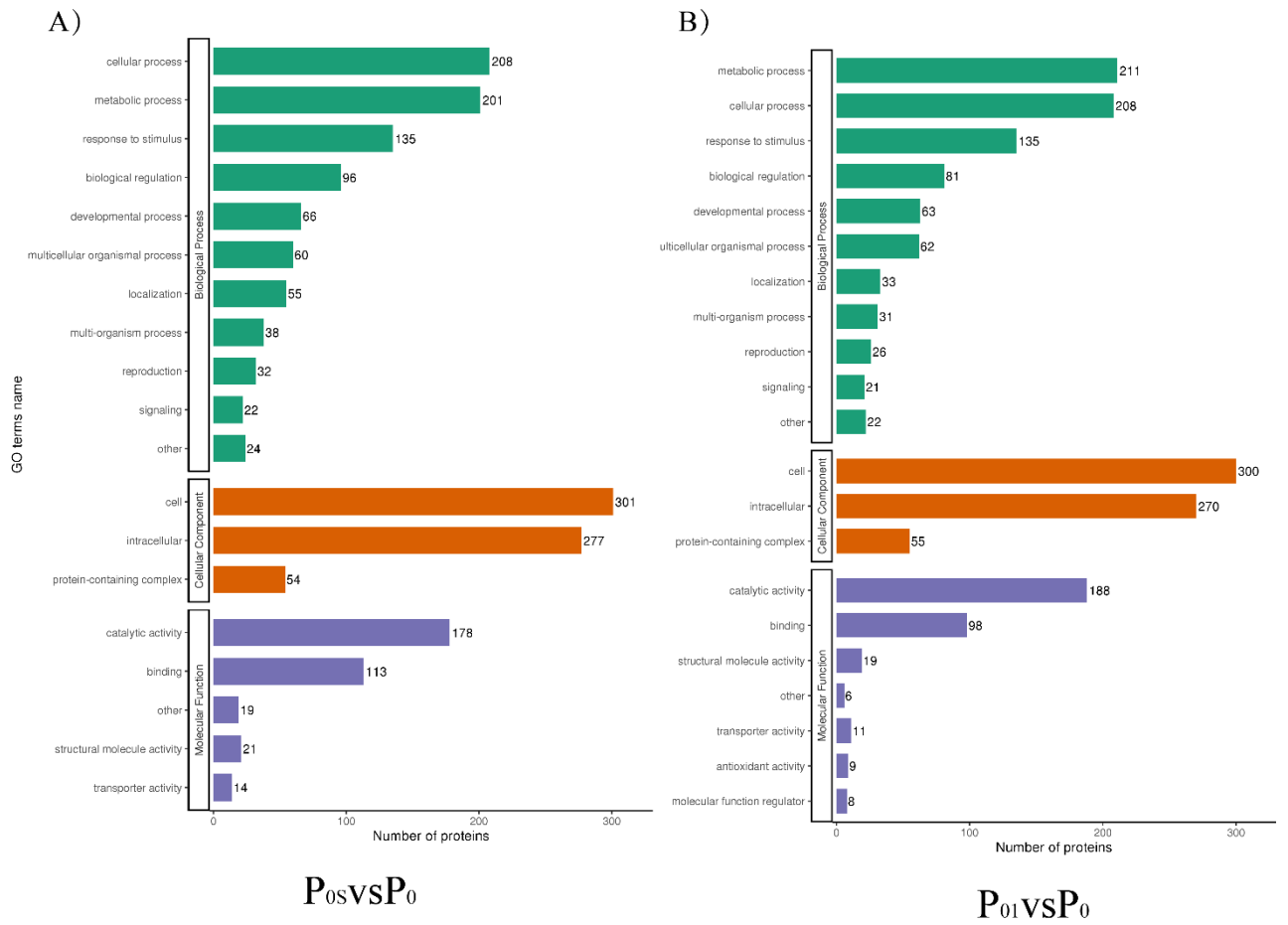


图 1 P_{0S}vsP₀ 和 P₀₁vsP₀ 处理下差异蛋白 GO 注释分析

Fig. 1 GO annotation analysis of differential proteins treated with P_{0S}vsP₀ and P₀₁vsP₀

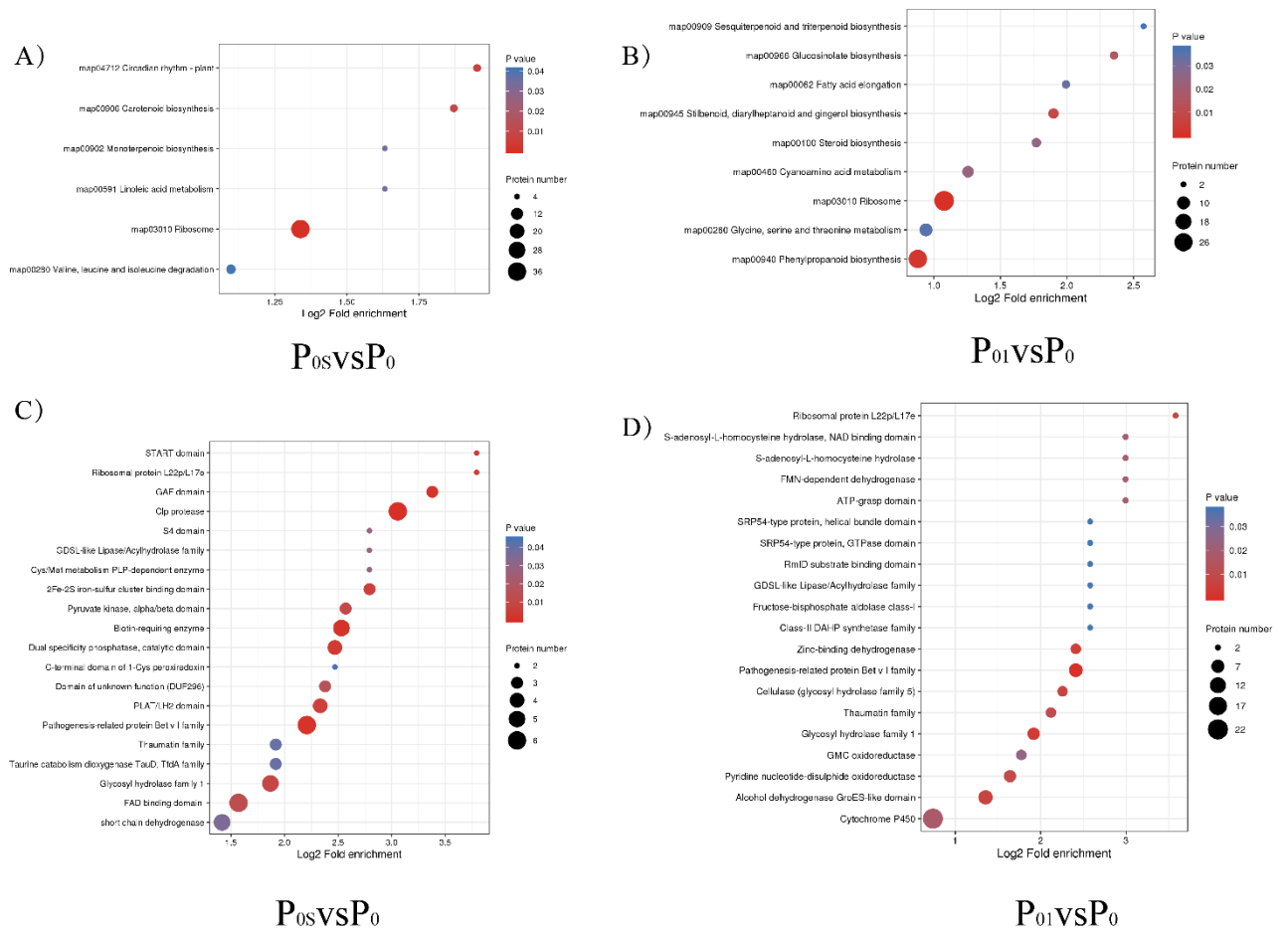


图 2 P_{0s}vsP₀ 和 P₀₁vsP₀ 处理下差异蛋白 KEGG 和 Domain 富集分析

Fig. 2 KEGG and Domain enrichment analysis of differential proteins treated with P_{0s}vsP₀ and P₀₁vsP₀

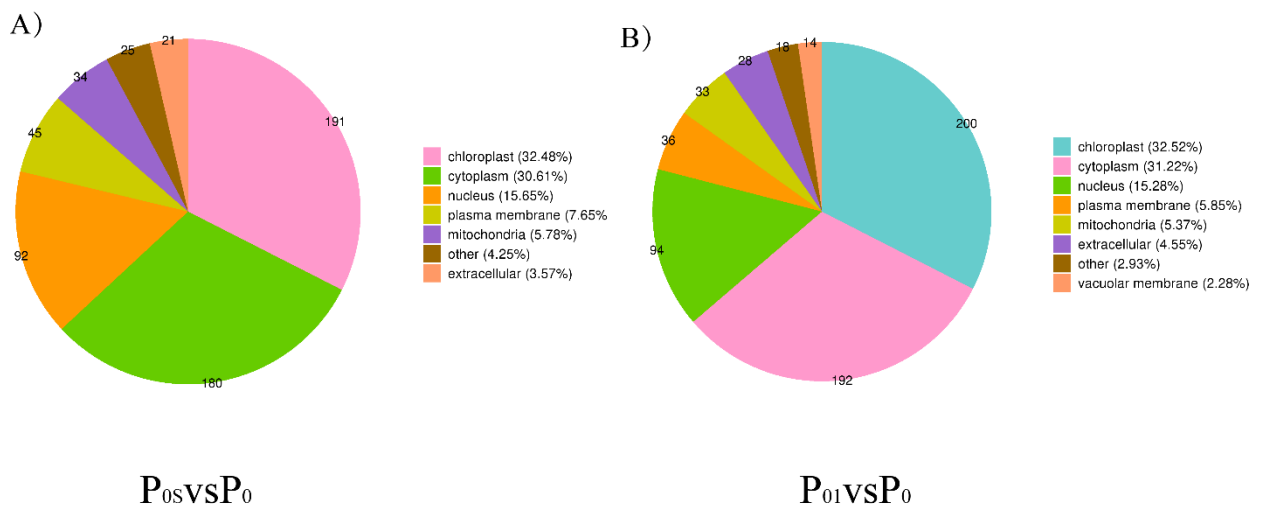


图 3 P_{0s}vsP₀ 和 P₀₁vsP₀ 处理下差异蛋白亚细胞定位分析

Fig. 3 Subcellular localization analysis of differential proteins treated with P_{0s}vsP₀ and P₀₁vsP₀

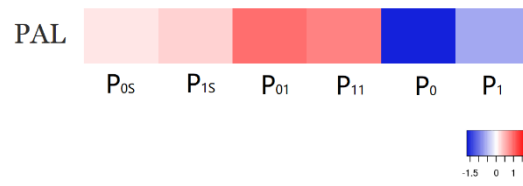


图 4 不同处理下 PAL 的表达情况
Fig. 4 Expression of PAL under different treatments