

不同钾水平下烟草根内皮层木栓化的适应性发育差异研究

许耘祥^{1,2}, 张莉汶^{1,2}, 王朋¹, 顾迎晨^{1,2}, Madan Lal Kolhi^{1,2}, 张标^{1,2}, 朱莹莹¹, 刘海伟^{1*}¹中国农业科学院烟草研究所/农业农村部烟草生物学与加工重点实验室, 山东青岛 266101; ²中国农业科学院研究生院, 北

京 100081

摘要 根内皮层分化的质外体屏障在植物抗逆和养分吸收均起到重要作用, 其中木栓层发育成为近年研究的热点。本研究以烟草栽培品种中烟 100 为材料, 通过 0.1–4.0 mmol·L⁻¹ 钾浓度梯度水培实验, 探讨供钾水平对根内皮层木栓化发育的影响及其生理分子机制。结果表明, 低钾胁迫(0.1 mmol·L⁻¹)显著增强内皮层木栓化: 完全木栓化区域绝对长度由对照的 0–2 cm 延伸至 4–6 cm, 相对占比从 0–15.0%提升至 33.2–44.3%, 表明木栓化是烟草响应低钾胁迫的关键形态适应机制之一。表型分析显示, 低钾胁迫下植株根系伸长但生物量下降, 地上部与根系钾离子含量及积累量分别减少, 木质部汁液流量及钾离子浓度运输效率降低。内源激素含量检测发现, 低钾胁迫提高根系内源脱落酸含量, 并抑制乙烯和茉莉酸甲酯含量, 形成特异性激素调控网络。转录组数据进一步佐证木栓化发育的分子基础, 木栓质合成与转运相关基因(如 *CYP86*、*GPAT*、*ABCG*)及其上游正调控因子 *MYB36/41/92/93* 显著上调。因此, 本研究首次阐明烟草低钾胁迫通过 ABA 介导的激素信号, 调控木栓化发育程序, 为解析作物钾胁迫适应机制提供了全新视角。

关键词 木栓化, 钾, 根内皮层, 激素

水分和矿质养分通过植物根系得以吸收、转运和利用, 这一过程中受到多种途径的调节, 根内皮层细胞在根内径向转运环节中的调节作用是其中的重要一环。内皮层细胞壁会逐渐发育形成分别由木质素(lignin)和木栓质(suberin)构成的凯氏带(Casparian strip)和木栓质片层(suberin lamella)两种物理屏障结构(Naseer et al., 2012, Andersen et al., 2015)。木栓质起初被认为是凯氏带的组分, 然而后来研究发现凯氏带质外体屏障功能缺陷突变体 *Enhanced suberin1-1 (ESB1-1)*表现出木栓质沉积增强(补偿木栓化)现象(Baxter et al., 2009), 同时多荧光定位表明内皮层木栓质沉积不参与典型的凯氏带质外体屏障功能建成(Naseer et al., 2012)。因此相区别于木质素构成的凯氏带, 木栓质沉积屏障存在独立的功能性。

植物根内皮层的木栓化结构参与抵御盐胁迫、重金属胁迫、养分胁迫等多种非生物胁迫。内皮层木栓质屏障通过直接阻碍镉离子(Cd²⁺)在根系内皮层细胞的质外体/跨细胞转运降低植物对镉的积累(Tao et al., 2022, Liu et al., 2022, Chen et al., 2023); 通过阻碍钠离子(Na⁺)的内流与钾离子(K⁺)的外排来抵御高盐胁迫逆境(Wang et al., 2020); 通过适应性发育响应环境养分的变化, 调控养分的质外体/跨细胞转运(Pfister et al., 2014, Barberon et al., 2016, Melino et al., 2021, Zhang et al., 2024, 张标等, 2024)。木栓质与 K⁺间也存在互作: 在拟南芥中包括钾在内的多种元素缺乏会诱导木栓化发育(Barberon et al., 2016), 同时内皮层木栓化发育缺陷会导致植株钾素含量的减少(Baxter et al., 2009, Pfister et al., 2014, Barberon et al., 2016)。

收稿日期: 2024-12-09; 接受日期: 2024-03-18

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(No.ZR2023MC150)和中国农业科学院科技创新工程项目(No.ASTIP-TRIC03)

* 通讯作者。E-mail: heaveyliu@163.com

根内皮层木栓化受激素信号通路调控。脱落酸信号通路是内皮层木栓化发育所必需的(Barberon et al., 2016, Tao et al., 2019), 乙烯信号通路则会延迟木栓化的发育或者促进已发育的木栓质沉积降解(Barberon et al., 2016, Liu et al., 2021, Liu et al., 2022), 近期又有研究发现茉莉酸甲酯参与了周皮和愈伤创面的木栓质沉积(Wei et al., 2023, Wei et al., 2024b)。检测上述植物内源激素的变化有助于辅助判断木栓质发育状况。荧光黄 088 (Fluorol Yellow 088, FY 088)是一种亲脂性多环芳烃有机染料, 大量应用研究表明这是一种良好的木栓质沉积显影剂(Lux et al., 2005, Naseer et al., 2012, Baxter et al., 2009, Barberon et al., 2016), 应用 FY 088 染色-荧光成像技术能够获得木栓化发育的可靠图像信息。

烟草是典型的喜钾富钾作物, 钾素含量对烟叶生产具有双重关键作用。首先, 在产量形成方面, 钾作为多种生化反应的必需元素, 既是光合作用、物质同化和呼吸代谢中关键酶的激活因子, 又通过调节细胞渗透压和气孔运动直接影响光合效率, 从而优化同化产物的积累 (杨铁钊等, 2002)。其次, 在品质构建层面, 钾离子通过调控碳氮代谢动态, 抑制蛋白质等大分子过度合成, 促进苹果酸等小分子有机酸的合成, 为香气物质合成建立适宜的前体物质基础。充足钾营养可提升烟叶燃烧性能 28%–35%, 延长阴燃时间 40 秒以上, 同时使香气成分总量增加 15%–20%, 并显著降低焦油释放量 12%–15% (闫慧峰等, 2013)。这些协同效应表明, 钾素水平是决定烟叶农艺性状与工业可用性的核心调控因子。所以提升烟株钾素含量, 提高烟草钾肥利用率是烟草农业发展的主流方向。根内皮层木栓化发育或是提高作物钾肥利用率的新切入点, 因此研究不同浓度钾培养下根内皮层木栓化对于钾素养分的高效吸收利用就具有积极意义, 然而目前未见有关烟草在根内皮层木栓化与钾素相关研究的报道。

因此, 基于上述信息, 本文对不同浓度钾离子培养下烟草生物量、根系形态、植株地上地下部钾含量、木质部汁液钾含量、三种根系内源激素含量、根内皮层木栓化荧光成像情况进行了研究, 同时开展了低钾胁迫下的转录组分析, 探究了不同钾浓度下内皮层木栓化发育的规律, 研究结果将以内皮层木栓化发育为基础, 为烟草大田生产和新品种改良提供新思路。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试烟草为普通型红花烟草(*Nicotiana tabacum*), 品种中烟 100。种子由国家烟草种质资源中期库(青岛)提供。

1.2 试验地点及方法

试验于 2024 年 6 月在中国农业科学院烟草研究所人工气候培养室采用水培方式开展。培养温度 26°C/20°C (昼/夜), 相对湿度 70%/85% (昼/夜), 光周期 10 h/14 h (昼/夜), 光照强度为 280 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ 。营养液每 5 d 更换一次, 每隔 2 h 向水培系统中通气 0.5 h。

将供试材料种子播于 50 孔基质穴盘中生长 25 d 左右, 选择均匀的两叶一心的烟草幼苗, 移入 1/2 改良版霍格兰营养液中缓苗 6 d, 而后移入正常营养液进行处理。改良版霍格兰营养液配方为: 2 mmol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、0.25 mmol·L⁻¹ NaH_2PO_4 、1 mmol·L⁻¹ K_2SO_4 、0.25 mmol·L⁻¹ MgSO_4 、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-EDTA、184 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_3BO_3 、36 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MnCl_2 、3.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZnSO_4 、1.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CuSO_4 、2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Na_2MoO_4 , 以 NaOH 调节营养液 pH 至 6.0±0.1。

施用单一钾源 K_2SO_4 , 设置 5 个不同的钾离子浓度处理, 分别为 0.1、0.5、1、2、4 mmol·L⁻¹ K⁺培养, 以正常培养条件下(K⁺ 2 mmol·L⁻¹)的烟苗作为对照。低于对照供钾水平的采用硫酸钠(Na_2SO_4)以补充营养液中的 SO_4^{2-} 。处理 15 d 后收获所有植株。

1.3 植株生物量及根系形态指标的测定

取各处理植株以吸水纸擦干,在根茎结合处切断,以分析天平称取并记录植株地上部/根系鲜重。将鲜样放入烘箱中于 105°C 杀青 30 min,之后调整烘箱温度为 75°C 将样品烘至恒重,后称取并记录植株地上部/根系干重。以根系干重/地上部干重计算根冠比。

取长势一致的烟苗,展开平铺在黑色塑料板上,用直尺测量根基部到根尖的长度并记录(精确到 0.1 cm)。收获植株根系后,徒手处理使得次级侧根可以清晰扫描,用根系扫描仪(Expression 11000XL, Epson, JPN)扫描成像,分别测定根总长、根表面积、根体积、根尖数指标,四次重复。

1.4 植株地上/地下部钾含量及木质部汁液钾离子浓度的测定

将收集的植株地上/地下部干样磨粉,采用 $\text{H}_2\text{SO}_4\text{-H}_2\text{O}_2$ 法消解后所得试液用于检测钾离子浓度。汁液的收集参考 Liu et al., 2023 的方法,具体为:首先称量脱脂棉与自封袋的空重(m_1);取各处理烟株,小心地以大量蒸馏水冲洗根部再放入盛有原培养液的 50 mL 离心管中,然后将烟草根与茎临界处以上 2–3 cm 处切开,迅速用去离子水冲洗,然后用吸水纸吸干切口余液并去除切口破碎细胞。用脱脂棉套在切口上并用皮筋固定,使木质部伤流液能源源不断地渗入脱脂棉内,套自封袋固定。收集伤流液 12 h 后称取自封袋与脱脂棉重量(m_2)。差重法(m_2-m_1)求得木质部汁液收集量。润洗自封袋得到的润洗液连同脱脂棉一道在 25 mL 比色管中稀释,取出脱脂棉并挤干、润洗后在比色管中定容并收集试液。最终以火焰光度计(Model 410, Sherwood, UK)检测木质部汁液及植株地上/地下部钾离子含量,四次重复。

1.5 根系内源激素含量测定

采用上海酶联生物植物(Plant)激素脱落酸(ABA) ELISA 检测试剂盒、植物(Plant)茉莉酸甲酯(MeJA) ELISA 检测试剂盒以及上海科艾博植物乙烯(Eth) ELISA 酶联免疫分析试剂盒,进行酶联免疫吸附实验。均采用双抗体一步夹心法酶联免疫吸附法,分别往预先包被激素(ABA、ETH、MeJA)抗体的包被微孔中,依次加入标本、标准品、HRP 标记的检测抗体,经过温育并彻底洗涤。用底物 TMB 显色, TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的激素(ABA、ETH、MeJA)含量呈正相关。用酶标仪(Infinite F50, TECAB, CH)在 450 nm 波长下测定吸光度(OD 值),计算样品浓度即可分别计算根系内源脱落酸、乙烯、茉莉酸甲酯含量,五次重复。

1.6 根内皮层木栓化发育染色观察

荧光染色所需试剂的配置参考表 1。选取各处理最长的根,去离子水清洗后用滤纸吸掉多余水分;于 FY 088 染液中 70°C 染色 60 h 后用去离子水洗净;将烟草根转移至甲苯胺蓝染色液中室温避光染色 30 min,用去离子水洗净。染色完成的样本分别用作纵向及横向切片荧光观察:

1. 在载玻片上反贴刻度贴纸,将染色后的根在载玻片上展平并平行于刻度,滴 1 滴 50% (V/V)的甘油-乙醇及 1 滴抗荧光猝灭剂,盖玻片封片并用擦掉多余试剂用作纵向观察,三次重复;

2. 自根基起每隔 2 cm 取点,即分别在距根基 2、4、6、8、10、12 cm 处选择健康根段,预切长约 0.5 cm 根段以 4% (W/V)琼脂包埋,修块使得样品垂直于切面,应用振动切片机(VT1200, Leica, DE)对包埋样品切片,所得切片滴加 1× PBS 后于 4°C、100%湿度下保存,滴 1 滴 50% (v/v)甘油-乙醇及 1 滴抗荧光猝灭剂封片,用作横切观察;

制得纵向及横切片样本用正倒置一体荧光显微镜(RVL-100-G, Echo, USA)观察,选择 FITC 通道,纵向样本通过载玻片上的刻度贴纸记录长度。

表 1 烟草根栓化荧光染色所需试剂配制方法

Table 1 Preparation method for reagents required for suberization fluorescence staining of tobacco root.

Reagent	Configuration method
0.01%(W/V)FY 088	Dissolve 0.01 g of FY 088 powder in 100 mL of distilled water, mix well, and heat to 70°C before using
0.05%(W/V)Toluidine Blue O	Dissolve 0.05 g of toluidine blue O powder in 100 mL of distilled water, mix well and store away from light
4% (W/V) agar	Dissolve 4 g of agar powder in 100 mL of distilled water, mix well and heat in a microwave oven over medium heat for 3 min
50%(V/V)Glycerol-ethanol	Mix absolute ethanol 1:1 with glycerol well

1.7 RNA-Seq 分析

对 0.1 mmol·L⁻¹、2.0 mmol·L⁻¹ 处理 15 天后的烟草根系取样，设三次生物学重复。将根系以去离子水清洗后用吸水纸轻轻吸掉多余水分，使用手术剪切下根样(>0.3 g)，包裹在锡纸袋中迅速放入液氮速冻。1 h 后将锡纸袋移入干冰泡沫盒中，寄送杭州广科安德生物科技有限公司。从组织样品中提取 Total RNA，利用 Nanodrop2000 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测，琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性，Agilent5300 测定 RQN 值。将检测合格的 RNA 样品进行 mRNA 的富集、片段化、双链 cDNA 的合成、连接 adaptor、片段筛选和文库富集，利用 NovaSeq X Plus/DNBSEQ-T7 平台上机测序转录组测序。参考基因组为 NtaSR1 (Wang et al., 2024)。本文通过比较 TPM 值来表征目的基因的表达差异。

1.8 统计分析

试验数据用 Microsoft Office Excel 2019 及 GNU PSPP 2.0.0 进行统计分析，方差分析 $P<0.05$ 。应用 Origin 2021 Pro、CNSknowall 作图。

2 结果

2.1 不同钾浓度培养处理对烟苗生长及根系形态发育的影响

不同钾浓度处理对烟草生长发育产生了影响，整体呈现出生物量随培养液 K⁺浓度降低而降低的趋势(表 2)。0.1 mmol·L⁻¹ 处理下植株地上干、鲜重及地下干、鲜重分别达到了最低值 0.30、6.89、0.06、0.70 g; 4 mmol·L⁻¹ 处理分别达到地上部干鲜重最大值 0.60、16.03 g, 2 mmol·L⁻¹ 处理则分别达到地下部干鲜重最大值 0.08、1.09 g。根冠比受不同 K⁺浓度处理的影响显著，随培养液 K⁺浓度降低根冠比不断提升, 0.1 mmol·L⁻¹ 处理下根冠比达到最大值 0.19。

表 2 不同钾浓度处理下烟草生物量及根冠比差异

Table 2 Differences in tobacco biomass and root/shoot ratio under different potassium concentrations

Treatment (mM)	Shoot Fresh weight (g)	Root Fresh weight (g)	Shoot Dry weight (g)	Root Dry weight (g)	Root-shoot ratio
0.1	7.32±0.96c	0.7±0.08b	0.3±0.04b	0.06±0b	0.19±0.02a
0.5	10.51±2.25bc	0.84±0.08ab	0.47±0.09a	0.06±0b	0.14±0.03bc
1.0	12.33±2.43b	0.93±0.07ab	0.53±0.1a	0.06±0.01ab	0.12±0.03c
2.0	13.24±2.51ab	1.09±0.41ab	0.54±0.13a	0.08±0.02a	0.16±0.01b
4.0	16.03±2.76a	1.03±0.26a	0.6±0.1a	0.08±0.02a	0.14±0.01bc

注: 同一栏内标不同字母者表示数值有显著差异($P<0.05$), 数据为平均值 \pm 标准差。

Note: Different letters indicate significant differences in the values ($P<0.05$), data are means \pm SD.

烟苗根系形态也随各处理培养液钾浓度的不同发生了适应性发育。首先随各处理培养液 K^+ 浓度的降低, 根长总体呈现而增长的趋势(图 1)。2、4 mmol·L⁻¹ 处理下根长居于最小均值, 均为 12.6 cm, 显著短于其它处理; 0.1 mmol·L⁻¹ 处理下根长均值达到了峰值 19.4 cm, 显著长于其它处理组; 各处理中, 仅 2、4 mmol·L⁻¹ 处理间未有显著差异。

各处理中总根长、根表面积、根总体积、根尖数四项指标的趋势趋同于干、鲜重生物量指标, 随培养液 K^+ 浓度降低呈现为降低的趋势。0.1 mmol·L⁻¹ 处理下总根长、根表面积、根总体积、根尖数分别达到了最低值 156.96 cm、20.63 cm²、0.22 cm³、534.75 个; 2 mmol·L⁻¹ 处理下根尖数达到了最大值 1561.25 个, 4 mmol·L⁻¹ 处理下总根长、根表面积、根总体积达到了最大值, 分别为 600.76 cm、79.46 cm² 及 0.839 cm³。 K^+ 低于 2 mmol·L⁻¹ 时在根总长、根表面积、根体积、根尖数四项指标中均未表现显著差异。而当培养液 K^+ 达到 2 mmol·L⁻¹ 后情况则发生了变化, 2、4 mmol·L⁻¹ 处理下烟株在根总长、根表面积、根体积三项指标数值均显著大于 0.1、0.5、1 mmol·L⁻¹ 处理, 同时 4 mmol·L⁻¹ 处理下三指标亦显著大于 2 mmol·L⁻¹ 处理。

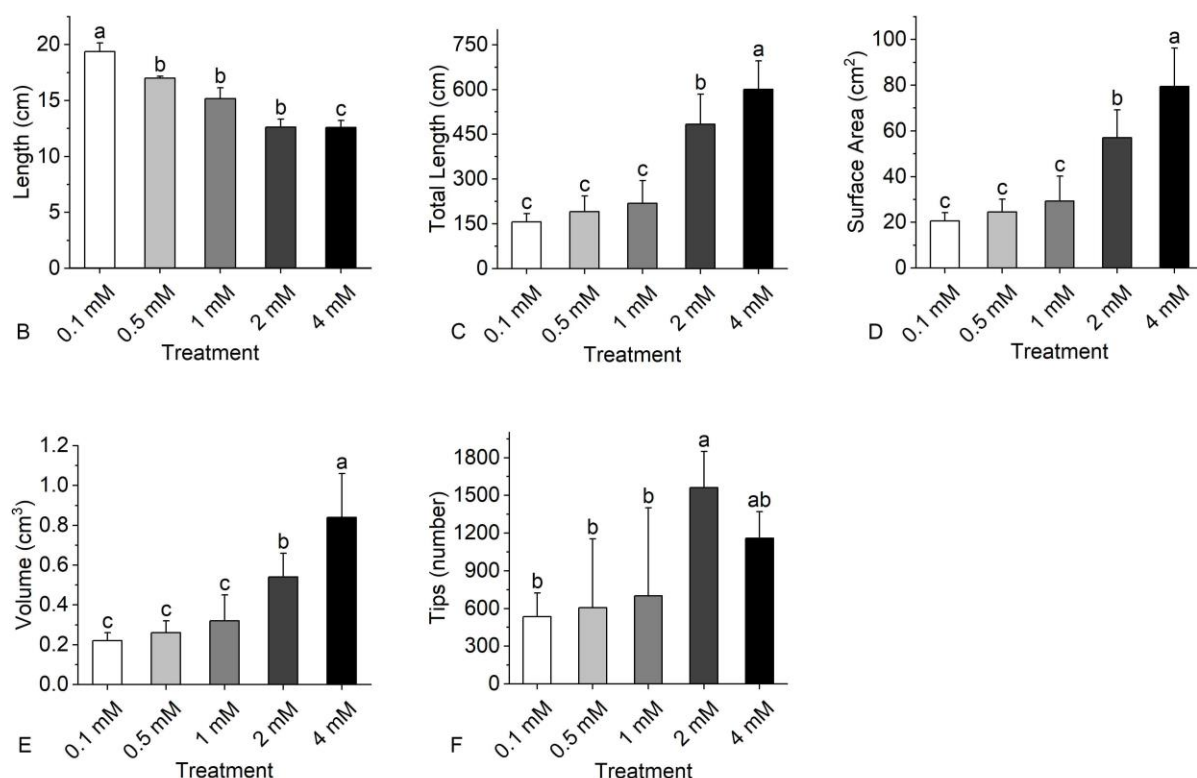


图 1 不同钾浓度处理下烟草生长及根系形态发育状况。(A), 处理 15 天后烟苗根、叶状况。(B), 最长根长。(C), 总根长。(D), 根系表面积。(E), 根系体积。(F), 根尖数。不同字母表示数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 1 The growth and root morphological development of tobacco under different potassium concentration treatments. (A), Root and leaf conditions of tobacco seedlings after 15 days of treatment. (B), The longest root length. (C), Total root length. (D), Root surface area. (E), Volume of root. (F), Number of root tips. Different letters indicate significant differences in the values ($P<0.05$).

2.2 不同钾浓度培养处理对烟草植株及木质部汁液钾浓度的影响

对烟草植株地上/地下部干样消解后检测了钾素含量, 结果表明培养环境中的 K^+ 含量与烟草地上/地下部钾素浓度、钾素积累量呈正相关, 且随浓度变化梯度变化趋势明显。在地下部、地下部的钾素浓度检测中 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 分别检测到最小值 50.51 、 $41.06 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$, $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 间地上、地下部钾素浓度则无显著差异, 同时各处理烟草地上部钾离子浓度均明显高于地下部。

营养液钾离子浓度及流量亦与取得木质部汁液的量及其钾浓度亦呈正相关, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 下取得木质部汁液平均 0.82 mL , 显著低于其它处理, 其它处理间无显著差异。 0.1 、 0.5 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理间木质部汁液钾离子浓度存在显著性差异, 更高浓度处理差异不显著。值得注意的是同时发现木质部汁液钾浓度高于营养液的钾离子浓度。

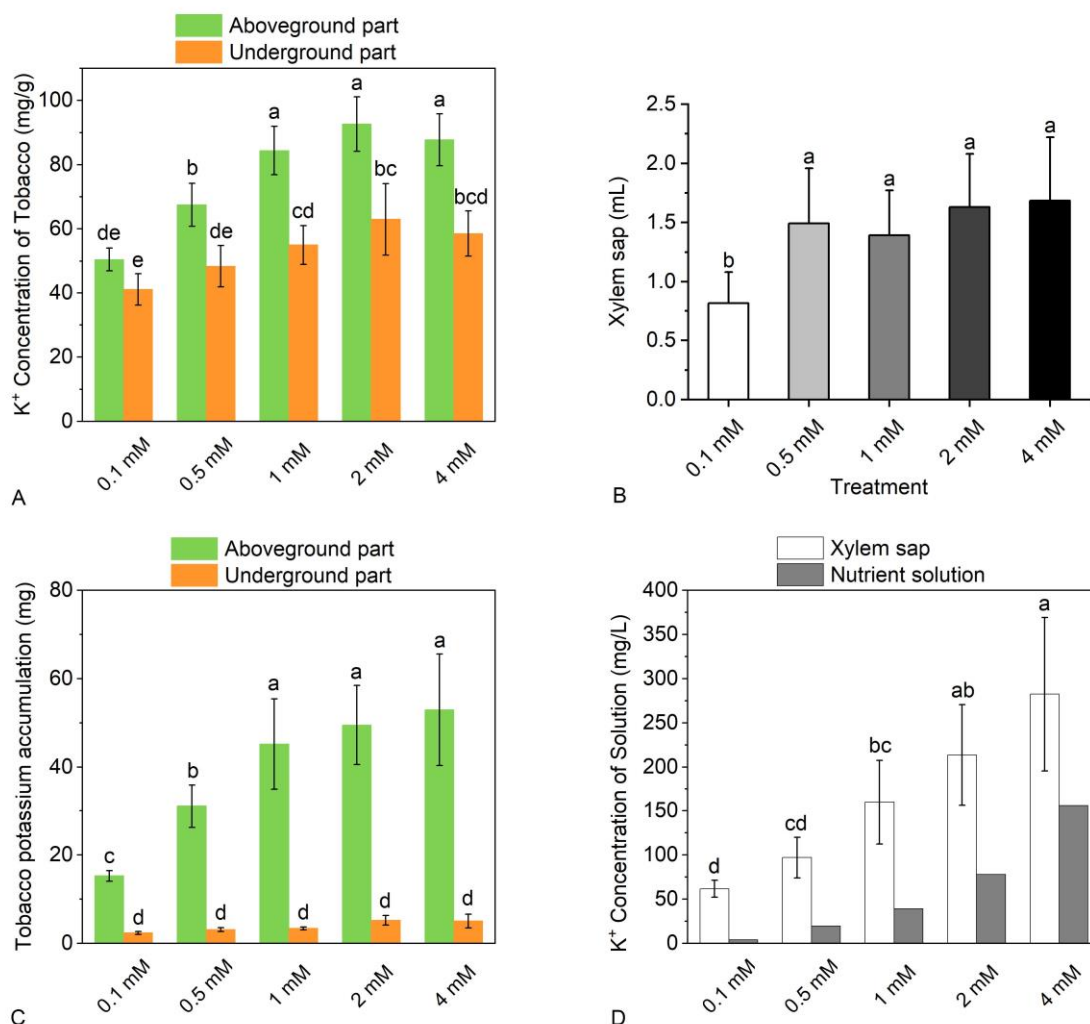


图 2 不同钾浓度处理下烟草植株及木质部汁液的钾浓度状况

(A) 地上部/地下部钾离子浓度。(B) 木质部汁液收集量。(C) 地上部/地下部钾素积累量。(D) 木质部汁液的钾离子浓度。不同字母表示数值有显著差异($P<0.05$)。

Figure 2 The potassium concentration in tobacco plants and xylem sap under different potassium concentration treatments

(A) Potassium ion concentration of Aboveground part and Underground part. (B) Xylem sap collection volume. (C) Potassium accumulation of Aboveground part and Underground part. (D) Potassium ion concentration in xylem sap. Different letters indicate significant differences in values ($P<0.05$).

2.3 不同钾浓度培养处理对三种烟草根系内源激素的影响

通过检测不同钾浓度处理下根系内源脱落酸、乙烯、茉莉酸甲酯的含量发现, 营养液钾浓度与内源激素含量间存在明显相关关系。随着培养环境钾浓度的降低, 脱落酸含量显著递升, 乙烯与茉莉酸甲酯则随之递降(图 3)。各处理中, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下内源脱落酸含量最高, 达到了 $794.27 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$; 乙烯、茉莉酸甲酯含量最低, 分别达到了 $35.15 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 、 $4.02 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。相反 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理内源脱落酸含量在各处理

中表现为最小值, 均值在 $455.08 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$; 内源乙烯、茉莉酸甲酯含量则处于最高点, 分别为 $74.72 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 及 $9.22 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 。各处理间内源脱落酸的检测结果中, 仅 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组间不存在显著差异; 内源乙烯的检测结果则仅有 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组间不存在显著性差异; 内源茉莉酸甲酯的检测结果则显示 0.1 、 1 、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组间存在显著性差异。值得注意的是, 与对照($2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)相比, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下三种内源激素水平差异均超过了极显著水平。

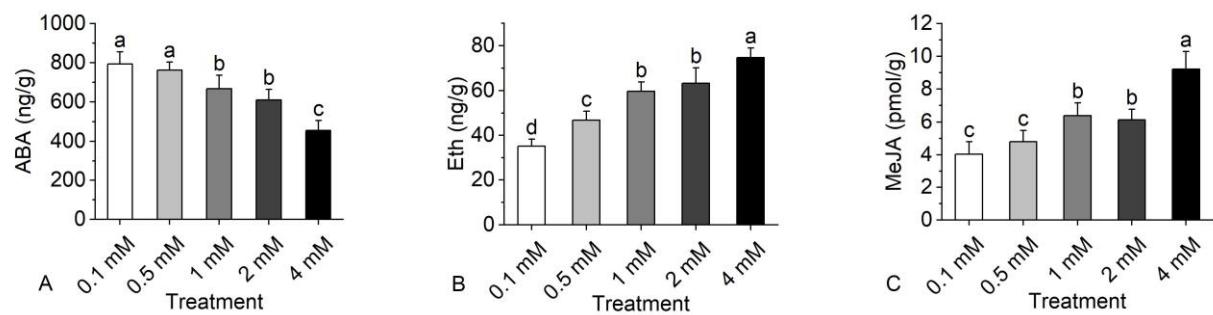


图3 不同钾浓度处理下烟草根系内源激素差异
(A) 根系内源脱落酸浓度。(B) 根系内源乙烯浓度。(C) 根系内源茉莉酸甲酯浓度。不同字母表示数值有显著差异($P<0.05$)。
Figure 3 Difference of tobacco root endogenous hormones under different potassium concentration

(A) Root endogenous abscisic acid concentration. (B) Root endogenous ethylene concentration. (C) Root endogenous methyl jasmonate concentration. Different letters indicate significant differences in the values ($P<0.05$).

2.4 不同钾浓度培养处理下烟草根内皮层木栓化发育纵向观察

FY 088 是木栓质专性荧光染料, 其荧光成像能充分表征木栓化发育状况。本研究中各处理纵向样本的荧光成像观察到类似于 Melino 等人(Melino et al., 2021)的结果, FY 088 荧光在根中逐步密集, 大致可区分三种分布状况(图 4), 即内皮层细胞间荧光印迹不明显的状态、荧光补丁状不连续分布状态以及荧光密集分布的状态。分别对应未发生木栓化发育、不完全的木栓化发育以及完全木栓化发育的状态。

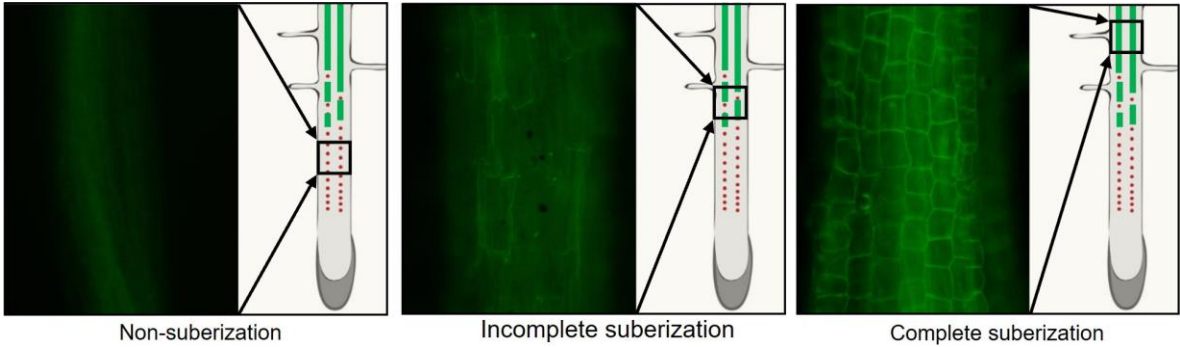


图4 三种木栓化发育状况的荧光成像及示意图
Figure 4 Imaging and schematic diagram of three types of suberin development stages.

通过判断三种木栓化发育状况的变换位点, 分别记录了三种木栓化状态的根区在整根中的绝对长度和相对长度(图 5A)。结果表明低钾胁迫在诱导根长增长的同时也诱导了内皮层木栓化的发育, 完全木栓化发育及不连续木栓化发育的起始点至根基的长度有所伸长, $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下荧光密集分布区域长度均值最大, 为 7.73 cm ; $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下完全木栓化区域长度最小, 为 3.80 cm ; 1 、 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理间无

显著差异, 而 0.1 、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理完全木栓化区域长度显著长于 1 、 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理。不连续木栓化发育起始位点距根基的长度同样表现为 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理为最大值 12.57 cm , $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理为最小 5.67 cm ; 0.5 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 间及 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 间无显著性差异。另外各处理间未发生木栓化区域的长度, 即根尖至不连续木栓化发育起始位点的绝对长度未见显著性差异。

统计各区域的相对长度可以发现, 低钾胁迫明显延长了完全木栓化区域的相对长度, 同时减少了未发生木栓化区域的相对长度(图 5B)。 0.1 、 0.5 、 1 、 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 完全木栓化区域的相对长度分别为 39.8% 、 38.4% 、 32.34% 、 30.2% 、 33.3% , 0.1 、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理间及 1 、 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理间无显著差异, 同时 0.1 、 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 完全木栓化区域相对长度均显著长于 1 、 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理。另一方面, 五处理中未发生木栓化发育的相对长度分别为 35.1% 、 40.5% 、 36.0% 、 44.9% 、 55.1% , 其中 0.1 、 0.5 、 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理相对长度显著短于 2 、 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理。

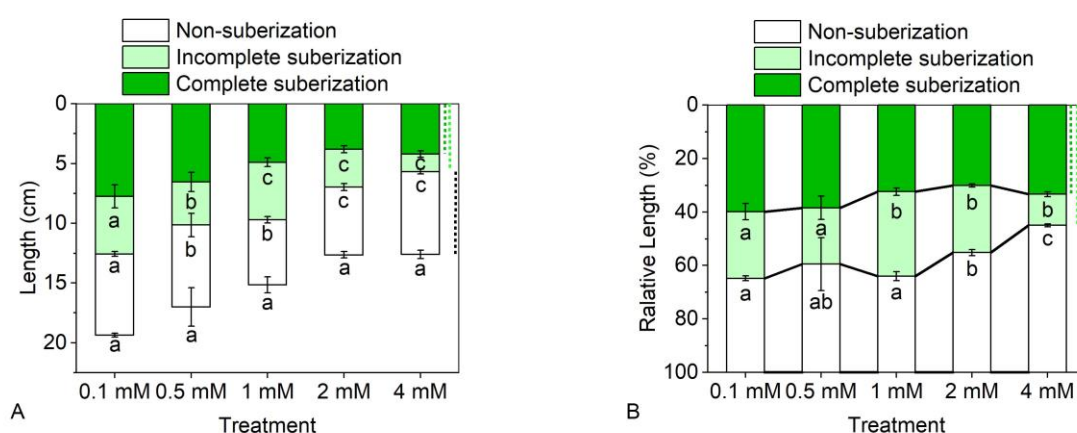


图 5 不同钾浓度处理下烟草根内皮层的三种木栓化发育状况

(A), 绝对长度。(B), 相对长度。不同字母表示数值有显著差异($p < 0.05$)。不同层字母自上而下分别代表: 根基(0 cm)至完全木栓化起始点的长度/相对长度差异、根基(0 cm)至不完全木栓化起始点的长度/相对长度差异、无木栓化区域的绝对长度差异。

Figure 5 The developmental status of three suberized regions in the endodermis of tobacco roots under different potassium concentration treatments

(A), Absolute lengths (B), Relative lengths. Different letters indicate significant differences in values ($p < 0.05$). The letters in different layers, from top to bottom, represent the differences in length/relative length from the root base (0 cm) to the starting point of complete suberization, from the root base (0 cm) to the starting point of partial suberization, and the absolute length differences in the non-suberized region, respectively.

2.5 不同钾浓度培养处理下烟草根内皮层木栓化发育横切观察

为进一步验证钾浓度对烟草根内皮层木栓化发育状况的影响, 对另外的 0.1 、 0.5 、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理根系制作横切片后进行荧光成像观察, 在根系内皮层细胞发现了明显的荧光印迹(图 5B)。结果证实了低钾浓度下木栓化发育被诱导。沿根基方向各处理内皮层木栓化荧光, 均自无明显印迹发展至零星补丁状荧光印迹, 再逐渐发展至严密(图 5A)。低钾胁迫下木栓化发育长度显著增长, 0.1 、 0.5 、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理内皮层荧光初次出现根段分别距根基 $10\text{--}12 \text{ cm}$ 、 $4\text{--}6 \text{ cm}$ 及 $2\text{--}4 \text{ cm}$, 分别在 $4\text{--}6 \text{ cm}$ 、 $0\text{--}2 \text{ cm}$ 、 $0\text{--}2 \text{ cm}$ 根段开始形成了成熟稳定的严密木栓化结构。

低钾胁迫极大延长了木栓化区域的相对长度(图 5C), 0.1 、 0.5 、 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的完全木栓化区域相对长度分别达到了 22.1% – 33.2% 、 $0\text{--}11.7\%$ 、 $0\text{--}15.0\%$; 若按木栓质初次出现计算木栓化发育相对长度(完全木栓化与不连续木栓化区域长度之和)分别为 55.3% – 66.4% 、 23.4% – 35.1% 、 15.0% – 30.0% , 差异均较为明

显。

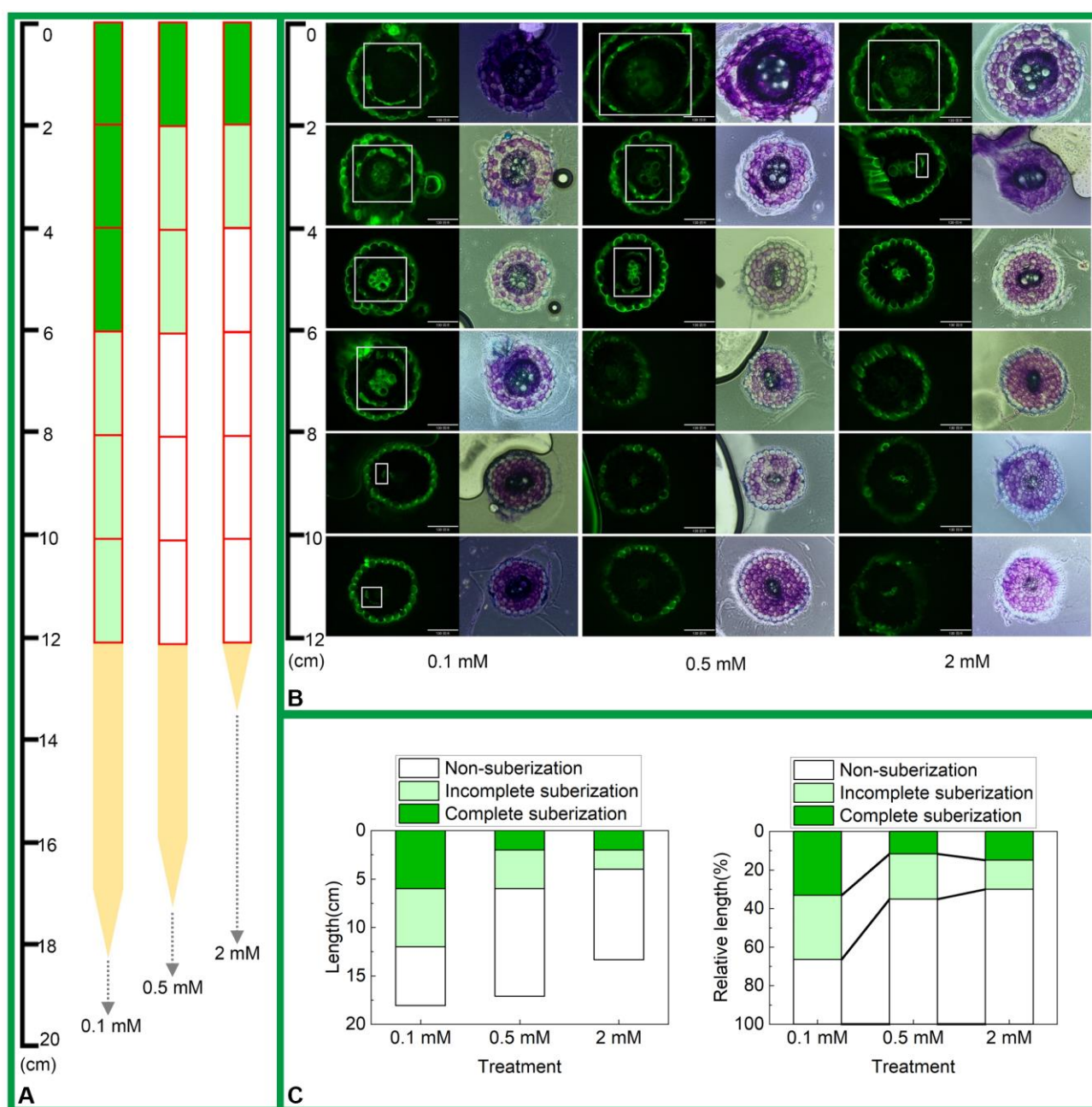


图 6 三种钾浓度处理下烟草根内皮层木栓化发育的横切片荧光成像

(A), 三种钾浓度下烟草根的根内皮层木栓化发育示意图。(B), 三种钾浓度下烟草不同根段横切片的 FY 088 荧光成像。(C), 三种钾浓度下烟草根内皮层木栓化发育的绝对长度和相对长度。

Figure 6 Fluorescence imaging of transverse sections of endodermis development in tobacco root under three potassium concentrations

(A) Schematic diagram of the three potassium concentrations development of suberization in the root endodermis of tobacco roots; (B) FY 088 fluorescence imaging of different root segment cross-sections of tobacco at three potassium concentrations; (C) Absolute length and relative length of suberin development in the endodermis of tobacco roots in three potassium concentrations.

2.6 低钾胁迫下的 RNA-Seq 分析

2.6.1 测序质量评估及差异表达基因分析

测序结果中所有样本的 Q20、Q30 和 GC 含量分别大于 98.75%、95.97%和 42.52%，碱基错误率均低于 0.012%，表明转录组的测序质量较好，符合数据分析要求。样本与参考基因组的比率均在 86.36%以上，比对结果正常，能够进行后续的基因功能注释和分析。

对 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的烟草根系组织进行差异表达基因分析，结果显示 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理相较 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理导致 1470 个基因差异表达，其中 855 个基因上调，615 个基因下调(图 7)。

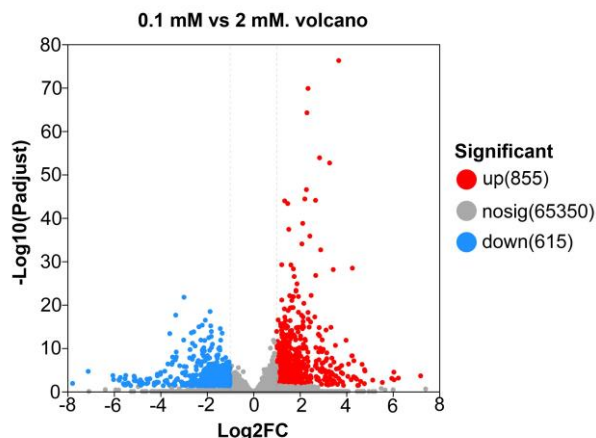


图 7 响应 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的差异表达基因数。

Figure 7 Different express genes number response to $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

2.6.2 差异表达基因的 KEGG 和 GO 富集分析

差异表达基因在 KEGG 数据库中注释到 88 条代谢通路(KEGG Pathway)上，筛选到富集上调的 10 条通路及富集下调的四条通路如图 8 所示。上调途径中苯丙烷类合成途径(map00940)产生芳香族木栓质合成前体；单萜类化合物合成途径(map00902)产生脱落酸前体；角质、木栓质和蜡质合成途径(map00073)中包含了部分内皮层木栓化关键基因；ABC 转运蛋白(map02010)及内吞作用(map04144)涉及到木栓质单体的运输；甘油酯代谢(map00561)可能参与木栓质大分子的结构调整和降解。此外分析结果显示谷胱甘肽代谢途径(map00480)富集度最高，玉米素合成(map00908)及 α -亚麻酸代谢(map00592)途径也明显上调。下调途径中富集程度较高的则包括内质网中的蛋白质加工(map04141)、植物的 MAPK 信号通路(map04016)、各种植物次生代谢产物的生物合成(map00999)以及植物-病原互作(map04626)。

利用 COG(Cluster of Orthologous Groups of proteins)数据库在生物过程、分子功能、细胞组分数据库分别注释到 260、20 和 213 个二级条目，分别筛选了 9、3、3 个富集条目(图 8)。同 KEGG 分析相一致，GO 富集分析发现谷胱甘肽代谢过程(GO:0006749)、谷胱甘肽转移酶转运活力(GO:0004364)、氧化应激响应(GO:0006979)及氧化还原酶活性(GO:0016684)的明显富集，这表明了 0.1 mM 处理下存在有效胁迫。木栓质生物合成(GO:0010345)、苯丙烷类合成过程(GO:0009699)涉及到内皮层木栓化发育，内皮层木栓质片层是夹在内皮层细胞壁中的多片层状结构，因此植物细胞壁合成(GO:0009832)、韧皮部及木质部(GO:0010087)、质外体发育(GO:0048046)等同样与木栓化发育高度相关。脱落酸合成调控及激素信号响应对应本文脱落酸含量的结果，同样出现了一定程度的富集。最后无机离子转运蛋白(GO:0098660)、跨膜转运蛋白活性(GO:0022857)及钾离子转运蛋白(GO:0006813)对应植株钾素吸收转运状况。

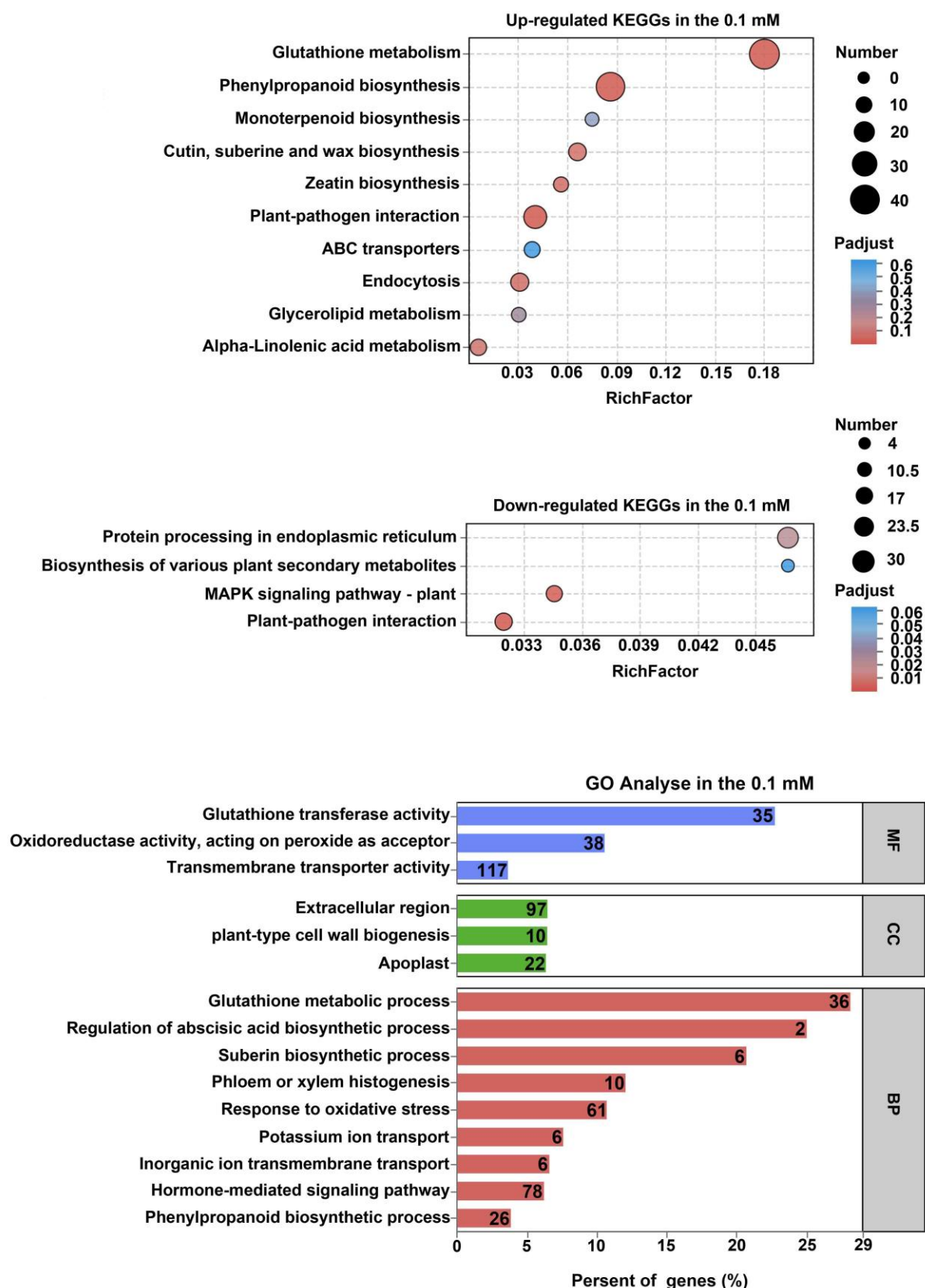


图 8 在 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下差异基因的 KEGG 富集分析及 GO 富集分析

Figure 8 KEGG and GO Enrichment Analyses of Differentially Expressed Genes (DEGs) under $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Treatment

2.6.3 调控内皮层木栓化发育及钾离子吸收转运的差异表达基因筛选

基于已有的了解结合 KEGG、GO 富集分析结果, 在差异表达基因中分别针对木栓化发育相关基因、调控木栓化发育基因表达的 MYBs 转录子以及钾离子吸收转运相关基因进行筛选, 在 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下的目的功能基因筛选中均未发现表达下调的基因。筛选到脂肪族木栓质单体合成关键基因 CYP86A1、CYP86B1、CYP94A1、CYP94A2、CYP94A5、FAR、KCS6、KCS20, 芳香族木栓质单体合成/大分子聚合 HHT1 同源基因、木栓质单体聚合基因 GPAT4、GPAT5, 木栓质单体及小分子聚合物转运 ABC 转运蛋白 G 家族 ABCG2、ABCG6、ABCG20, 上述基因在 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下均被诱导上调。MYBs 转录子家族是目前认识比较成熟的木栓化发育相关基因表达的上游调控因子, 筛选到木栓化正调控 MYB 转录因子 MYB36、MYB41、MYB92、MYB93 受 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理诱导表达上调, 在差异表达基因中未发现负调控 MYB 转录子。最后我们针对钾离子吸收转运途径进行了基因筛选, 分别筛选到一个钾离子通道蛋白(低亲和吸收)KAT3 和五个高亲和钾离子转运体 HAK5 的同源基因在 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下上调。

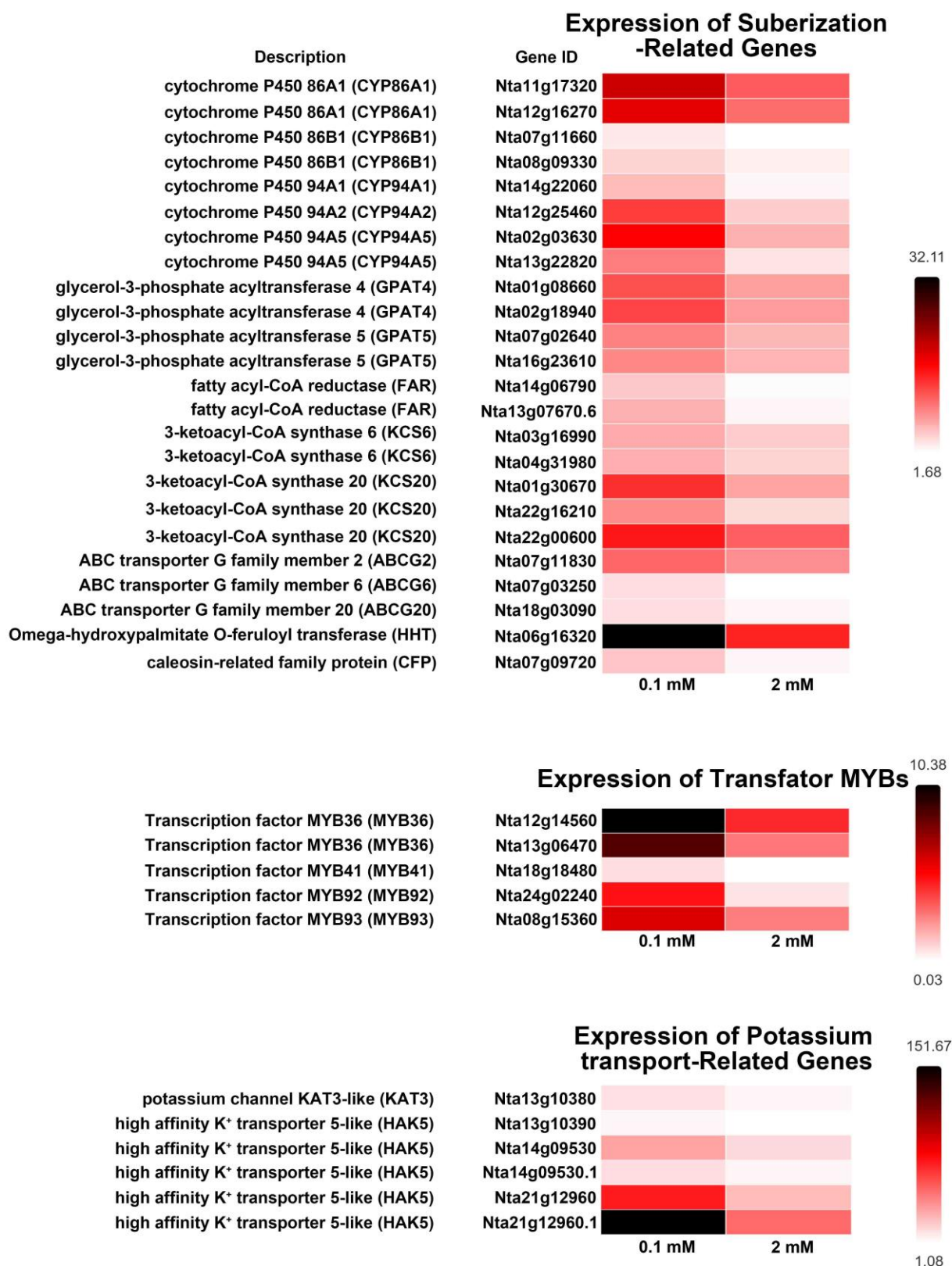


图 9 在 $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理下差异基因中内皮层木栓化相关基因、MYBs 转录因子及钾转运相关基因表达量
Figure 9 Expression levels of endodermal suberization-related genes, MYB transcription factors, and potassium transporter-related genes among differentially expressed genes under $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ treatment

3 讨论

3.1 钾供应与烟草根系生长发育

钾作为烟草最重要的“品质元素”，极大地影响烟草的产量和品质(闫慧峰等, 2013)。K⁺是涵盖光合反应链、蛋白质的合成与代谢、糖类合成与转运等过程几十种关键酶的活化剂，因此参与植物生长发育、干物质合成积累、逆境抵抗和叶片衰老的调节(王立梅等, 2015)。根系是烟草矿质养分和水分的主要吸收器官，其形态及内皮层屏障的发育是植物适应外部环境的重要机理。钾素供应水平会极大影响根系形态发育，促进根冠比的提高。在不同浓度钾水培烟草的研究(郭泽等, 2019)中发现，5 mmol·L⁻¹ K⁺水培相较于 0.15 mmol·L⁻¹ K⁺培养总根长、根表面积、根总体积、根尖数分别达到了 2.37、2.46、2.42、4.39 倍；在组培西番莲的研究中(罗海斌等, 2022)趋势相同，0.200 mol·L⁻¹ 钾浓度处理的总根长、根表面积、根总体积和根尖数均最高，分别是 0.004 mol·L⁻¹ 钾浓度处理的 2.84、5.17、11.27、3.85 倍。本研究结果与前人趋同，低钾培养下总根长、根表面积、根总体积和根尖数均显著低于对照，而根长则明显增长。这表明尽管低钾胁迫会诱导根系发育，提高根冠比。

3.2 钾供应与烟草内皮层木栓化发育

钾素不仅是重要的养分离子，还能作为信息递质发挥作用。Barberon 等(2016)为探讨养分供应状况与木栓化发育之间的关系进行了大量研究，发现钾素营养与拟南芥内皮层木栓化之间存在关联(Barberon et al., 2016, Barberon, 2017)。培养环境中 K⁺的缺乏能够显著诱导拟南芥木栓化发育，同时拟南芥 K⁺转运缺陷突变体 *SKOR* 相较于野生型也较早在内皮层发生了木栓化沉积。目前有关养分供应影响内皮层木栓化的报道较少，而本研究通过检测不同浓度 K⁺水平水培烟草植株的 FY 088 染色荧光成像，首次发现了在烟草中存在低钾胁迫诱导根内皮层木栓化发育的现象。

木栓质生物合成及转运相关基因的表达水平亦被用以衡量木栓化发育状况。木栓质的合成与沉积包括单体合成、小分子单体聚合、跨膜转运、定位沉积等多个复杂过程，受木桶理论限制，目前相关认识仍有不足。木栓化发育过程受多种酶调节(张标等, 2023)，目前已知长链酰基-CoA 合成酶(LACSs)和脂肪酸-CoA 连接酶(FACLs)调控长链脂肪酸的活化； β -酮酯酰-CoA 合酶(KCSs)则是脂肪酸链延长复合酶系中的关键酶；脂酰-CoA 还原酶(FARs)介导脂肪酸链发生还原反应得到醇类木栓质单体；负责调控氧化反应的细胞色素 P450s 加氧酶中的 CYP86、CYP94 家族则通过 ω -羟基化得到 ω -羟基酸及 α, ω -二酸这两种对木栓质结构影响最大的单体。甘油-3-磷酸酰基转移酶(GPATs)参与 3-磷酸甘油与酰基化脂肪酸聚合得到小分子聚合物的反应。最后木栓质单体及小分子聚合物的跨膜转运则多由 ATP-结合盒式转运蛋白的 G 亚家族(ABCG)承担。以往有研究者在硝酸根诱导木栓化发育的研究中对以上基因的表达量进行了表征(Melino et al., 2021, Chen et al., 2023, Zhang et al., 2024)。本研究也通过 RNA-Seq 对上述关键基因进行了表达量分析，在差异基因中筛选到 CYP86、CYP94、GPAT、FAR、KCS、ABCG、HHT、CFP 家族基因在 0.1 mM 处理中被诱导表达，与我们通过荧光染色观察到的木栓化发育状况相一致。

3.3 激素参与调控木栓质沉积

目前有广泛的证据指出脱落酸、乙烯和茉莉酸甲酯信号通路参与调控木栓质沉积。脱落酸被广泛接受为诱导木栓质片层形成的激素，对番茄(Leide et al., 2012)、马铃薯块茎(Lulai et al., 2008) 外源施用脱落酸后，其愈伤组织的液相色谱-质谱联用和荧光定量分析均发现木栓化发育增强；Barberon 等(2016)观察到外源脱落酸处理后三小时的 *GPAT5-GUS* 荧光明显增强；相较于正常植株，脱落酸合成突变体 *aba2*、*abi3*、*abi4*、*abi5* 的木栓化发育也表现缺陷。而乙烯则与木栓化发育拮抗。乙烯前体 1-氨基环丙烷羧酸(1-

Aminocyclopropanecarboxylic Acid, ACC)的施用会引起和乙烯合成/受体突变体 *etr1*、*ein3* 相同的效应: 拟南芥内皮层木栓化发育延迟, 已形成的连续木栓质片层疑似被降解, 加入乙烯抑制剂则能恢复表型 (Barberon et al., 2016); 另有研究发现 Cd 处理下内皮层木栓质屏障的沉积需要抑制乙烯的合成来实现 (Liu et al., 2021, Liu et al., 2022)。最近有研究发现茉莉酸甲酯能促进机械损伤后山药和猕猴桃愈伤组织的木栓质沉积 (Wei et al., 2023, Wei et al., 2024b, Wei et al., 2024a), 而尚未有茉莉酸甲酯对内皮层木栓化发育影响的相关报道。

目前有关激素调控内皮层木栓化的分子机制尚还处于起步阶段, 而 GRAS 转录因子 SHORT-ROOT 与下游 MYBs 转录子的特异性互作 (SHR/MYBs) 网络被认为是脱落酸调控内皮层木栓化发育的重要调控机制 (周月等, 2024)。MYBs 可根据对木栓化发育的调控功能分为正调控子和负调控子。正调控子中 MYB36 是研究最早, 最成熟的调控子; MYB39 是 SHR/MYB36 通路和 ABA 信号转导的共同下游调控子; MYB41、MYB53、MYB92 与 MYB93 具有较高的同源性, 因此存在功能冗余的情况; MYB68、MYB74 和 MYB84 直接结合下游功能基因的启动子, 并作为 ABA 信号转导和内皮层分化的相互作用枢纽, 此外 MYB107 和 MYB9 也参与木栓化发育的正向调控。MYB6、MYB122 和 MYB70 是木栓化的负调控因子, MYB6 通过抑制正调控因子 MYB52 和 MYB93 发挥作用; MYB122 则抑制 MYB9 和 MYB39; MYB70 负调控过氧化物酶编码基因和木栓质生物合成相关基因的表达减少木栓质的沉积。此外, 正调控因子网络中各调控因子通过调控木栓化发育过程中的某一个或几个环节发挥作用, 同时正调控因子间也存在复杂的互调控关系, 篇幅原因这里不再详细介绍。脱落酸信号通过下游关键信号成分 AHG3 (PP2CA 类蛋白) 与 MYB68 和 MYB74 产生互作 (Xu et al., 2022), 此外另一个脱落酸信号元件 SnRK3.15 也可直接与 MYB74 结合。脱落酸通过调控 MYB74 和 MYB68 进而影响整个 MYBs 调控网络, 进而调控木栓化发育各相关基因的表达, 这是目前的主流理解。然而由于木栓质大分子结构和单体的复杂多样性, 要透彻研究整个调控机制的各处细节仍是困难重重。

本研究检测了不同钾水平处理下烟草根系内源激素水平的差异, 结合木栓化发育的检测结果来看与此前的研究结果大致相同。低钾胁迫下内皮层木栓化发育的绝对长度与相对长度均显著增长, 根系内源脱落酸含量显著升高, 内源乙烯与茉莉酸甲酯含量则明显降低, 同时转录组分析筛选到 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下 MYBs 正向调控网络中的 MYB36、MYB41、MYB92、MYB93 表达上调, 侧面佐证了三种激素对内皮层木栓化发育的调控, 并首次在烟草中进行了相关研究。

3.4 内皮层木栓化发育对钾素养分的影响

在拟南芥的多项研究中发现根内皮层木栓化发育状况与钾素含量呈正相关。对凯氏带质外体功能缺陷同时木栓质异位沉积增强 (补偿木栓化) 的突变体 *ESB1-1* 养分检测发现 K^+ 含量提高了过三分之一 (Baxter et al., 2009); 后来的 *sgn3* 突变体在表现为木栓化缺陷的同时也发现 K^+ 含量降低 (Pfister et al., 2014)。为了进一步验证木栓质片层对养分吸收的影响, Barberon 等 (Barberon et al., 2016) 在三个不同的实验室, 三种不同的培养条件下分别鉴定了 *CDEF1* 过表达株系的养分情况。结果均表明在几乎不存在木栓质片层的 *CDEF1* 株系中 K^+ 含量显著低于野生型含量。因此 Doblas 等 (Doblas et al., 2017) 认为木栓质屏障通过阻止 K^+ 在内皮层处向外渗漏来发挥作用。对此 Vestenaa 等 (Vestenaa et al., 2024) 也持有相同的看法, 他们认为铯 (Cs) 离子具有与钾 (K) 离子相似的物理化学特性, 在根系吸收模式上具有一定的趋同性, 与此同时在水培根系中还具备低浓度的特性, 便于使用具有细胞分辨率的激光剥蚀电感耦合等离子体质谱 (Laser Ablation-inductively Coupled plasma-Mass Spectrometry, LA-ICP-MS) 显影观察; 以铯离子作为钾离子的显影示踪剂对大麦根系横切观察发现, 内皮层内部相较于外部具有更高的离子浓度。对拟南芥野生型 (WT)

和 *CDEF1* 突变体进行木栓化发育染色检查明确 *CDEF1* 内皮层木栓化发育缺陷,而后分别对 WT 与 *CDEF1* 外源施加铯离子培养并进行成像,发现 *CDEF1*(内皮层木栓化发育缺陷)相较于 WT(内皮层木栓化发育正常)在中柱内具有更低浓度的铯离子分布。对此作者预测大麦根段的钾泄漏随着木栓质沉积的增加而减少。

此外,我们知道金属离子的流动性依托于水溶性。而同样有研究表明内皮层木栓化阻碍水分的吸收,*ESB1-1* 拟南芥植株的蒸腾速率仅为 WT 的 15%,抗萎蔫性也明显增强(Baxter et al., 2009);拟南芥 *cyp86a1* 的木质部汁液中水力导电性相较 WT 增强了 44% (Wang et al., 2020),在我们的研究中同样发现木栓化增强(0.1 mmol·L⁻¹ 处理)后木质部汁液所得量明显下降(图 2B),同时木质部汁液具有很高的钾离子浓度(图 2D)。内皮层木栓化对水分的阻碍作用从侧面或可支持阻碍 K⁺ 渗漏的观点。

4 结论

低钾胁迫显著抑制了烟草的生长发育和物质积累,在植株生长受抑的基础上促进了根系发育;低钾胁迫降低了烟株地上地下部钾浓度和地上部钾积累量,降低了木质部汁液流量及钾浓度;低钾胁迫诱导了根系内源脱落酸含量的增高,内源乙烯、茉莉酸甲酯含量降低;低钾胁迫诱导了内皮层木栓化发育,提高了根内皮层木栓化区域的绝对长度和相对长度;低钾胁迫诱导内皮层木栓化发育相关 *CYP86*、*CYP94*、*GPAT*、*FAR*、*KCS*、*ABCG*、*HHT*、*CFP* 家族基因表达量的上调,诱导木栓化发育正调控 MYBs 转录子 *MYB36*、*MYB41*、*MYB92*、*MYB93* 的上调,诱导了五个高亲和钾吸收蛋白转运体 *HAK5* 同源基因和一个低亲和钾吸收离子通道蛋白 *KAT3* 同源基因的上调。

作者贡献声明

许耘祥: 实验数据采集与处理,撰写论文初稿;张莉汶、顾迎晨和朱莹莹: 协助实施部分试验;王朋: 转录组分析指导;张标: 分析部分数据,参与论文讨论;Madan Lal Kolhi: 协助分析部分转录组数据;刘海伟: 实验整体方案设计指导、实验理论技术指导及论文修改完善。

参考文献

- Andersen TG, Barberon M, Geldner N (2015). Suberization - the second life of an endodermal cell. *Curr Opin Plant Biol*, **28**, 9-15.
- Barberon M (2017). The endodermis as a checkpoint/ for nutrients. *New Phytol*, **213**, 1604-1610.
- Barberon M, Vermeer JE, De Bellis D, Wang P, Naseer S, Andersen TG, Humbel BM, Nawrath C, Takano J, Salt DE, Geldner N (2016). Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell*, **164**, 447-459.
- Baxter I, Hosmani PS, Rus A, Lahner B, Borevitz JO, Muthukumar B, Mickelbart MV, Schreiber L, Franke RB, Salt DE (2009). Root suberin forms an extracellular barrier that affects water relations and mineral nutrition in Arabidopsis. *PLoS Genet*, **5**, e1000492.
- Chen A, Liu T, Deng Y, Xiao R, Zhang T, Wang Y, Yang Y, Lakshmanan P, Shi X, Zhang F, Chen X (2023). Nitrate-dependent suberization regulates cadmium uptake and accumulation in maize. *Sci of The Total Envi*, **878**, 162848.
- Doblas VG, Geldner N, Barberon M (2017). The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr Opin Plant Biol*, **39**, 136-143.
- Guo Z, Li ZS, Dai XY, Wang YF (2019). Effects of auxin on tobacco root growth and potassium uptake under low potassium stress. *Plant Nutr Fert Sci*, **25**, 1173-1184. (in Chinese)
郭泽, 李子绅, 代晓燕, 王英锋 (2019). 低钾胁迫下外源生长素对烟草根系生长及钾吸收的影响. 植物营养与肥料学报, **25**, 1173-1184.
- Leide J, Hildebrandt U, Hartung W, Riederer M, Vogg G (2012). Abscissic acid mediates the formation of a suberized stem scar tissue in tomato fruits. *New Phyt*, **194**, 402-415.
- Liu, HW, Zhang Y, Wang HY, Zhang B, He Y, Wang HH, Zhu YY, Holm P. E, Shi Y (2023). Comparing cadmium uptake kinetics, xylem translocation, chemical forms, and subcellular distribution of two tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivars. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **254**, 114738
- Liu Y, Lu M, Persson DP, Luo J, Liang Y, Li T (2022). The involvement of nitric oxide and ethylene on the formation of endodermal barriers in response to Cd in hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Environ Pollut*, **307**, 119530.
- Liu Y, Tao Q, Li J, Guo X, Luo J, Jupa R, Liang Y, Li T (2021). Ethylene-mediated apoplastic barriers development involved in cadmium accumulation in root of hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *J Hazard Mater*, **403**, 123729.
- Lulai EC, Suttle JC, Pederson SM (2008). Regulatory involvement of abscissic acid in potato tuber wound-healing. *Journal of Experimental Botany*, **59**, 1175-1186.
- Luo HB, Huang CM, Cao HQ, Jiang SL, Wu XJ, Ye LP, Wei YW (2022). Effects of different potassium levels on root development and endogenous hormone content for passion fruit tissue cultured seedling. *J Fruit Sci*, **4**, 53-58. (in Chinese)
罗海斌, 黄诚梅, 曹辉庆, 蒋胜理, 吴兴剑, 叶丽萍, 魏源文 (2022). 不同浓度钾元素对西番莲组培苗根系生长和内源激素含量的影响. 中国果树, **4**, 53-58.
- Lux A, Morita S, Abe J, Ito K (2005). An improved method for clearing and staining free-hand sections and whole-mount samples. *Ann Bot*, **96**, 989-996.
- Melino VJ, Plett DC, Bendre P, Thomsen HC, Zeisler-Diehl VV, Schreiber L, Kronzucker HJ (2021). Nitrogen depletion enhances endodermal suberization without restricting transporter-mediated root NO₃(-) influx. *J Plant Physiol*, **257**, 153334.
- Naseer S, Lee Y, Lapierre C, Franke R, Nawrath C, Geldner N (2012). Casparian strip diffusion barrier in Arabidopsis is made of a lignin polymer without suberin. *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 10101-10106.
- Pfister A, Barberon M, Alassimone J, Kalmbach L, Lee Y, Vermeer J E, Yamazaki M, Li G, Maurel C, Takano J, Kamiya T, Salt D E, Roppolo D, Geldner N (2014). A receptor-like kinase mutant with

- absent endodermal diffusion barrier displays selective nutrient homeostasis defects. *eLife*, **3**, e03115.
- Tao Q, Jupa R, Liu Y, Luo J, Li J, Kovac J, Li B, Li Q, Wu K, Liang Y, Lux A, Wang C, Li T** (2019). Absciscic acid-mediated modifications of radial apoplastic transport pathway play a key role in cadmium uptake in hyperaccumulator *Sedum alfredii*. *Plant Cell Environ*, **42**, 1425-1440.
- Tao Q, Li M, Xu Q, Kovac J, Yuan S, Li B, Li Q, Huang R, Gao X, Wang C** (2022). Radial transport difference mediated by root endodermal barriers contributes to differential cadmium accumulation between japonica and indica subspecies of rice (*Oryza sativa* L.). *J Hazard Mater*, **425**, 128008.
- Vestenaa MW, Husted S, Minutello F, Persson DP** (2024). Endodermal suberin restricts root leakage of cesium: a suitable tracer for potassium. *Physiologia Plantarum*, **176**. e14393
- Wang J, Zhang Q, Tung J, Zhang X, Liu D, Deng Y, Tian Z, Chen H, Wang T, Yin W, Li B, Lai Z, Dinesh-Kumar S P, Baker B, Li F** (2024). High-quality assembled and annotated genomes of *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana benthamiana* reveal chromosome evolution and changes in defense arsenals. *Mol Plant*, **17**, 423-437.
- Wang LM, Liu YQ, Ruan YJ** (2015). The research progress of potassium to plant. *Chin Hort Abst*, **31**, 71+148. (in Chinese)
- 王立梅, 刘奕清, 阮玉娟 (2015). 植物钾素研究进展. 中国园艺文摘, **31**, 71+148.
- Wang P, Wang C-M, Gao L, Cui YN, Yang HL, de Silva N D G, Ma Q, Bao AK, Flowers TJ, Rowland O, Wang SM** (2020). Aliphatic suberin confers salt tolerance to *Arabidopsis* by limiting Na⁺ influx, K⁺ efflux and water backflow. *Plant and Soil*, **448**, 603-620.
- Wang Y, Xu J, He Z, Hu N, Luo W, Liu X, Shi X, Liu T, Jiang Q, An P, Liu L, Sun Y, Jetter R, Li C, Wang Z** (2021). BdFAR4, a root-specific fatty acyl-coenzyme A reductase, is involved in fatty alcohol synthesis of root suberin polyester in *Brachypodium distachyon*. *Plant J*, **106**, 1468-1483.
- Wei X, Liu L, Jin X, Xue J, Geng P, Xu Z, Zhang L, Wang X, Zong W, Zhang L, Mao L** (2024a). Exogenous methyl jasmonate promotes wound healing of Chinese yam tubers (*Dioscorea opposita*) through the deposition of suberin polyaliphatics at the wound sites. *Postharvest Biology and Technology*, **207**.112586
- Wei X, Liu L, Liu G, Geng P, Wei X, Yao X, Chen J, Gong W, Ge Z, Liu M, Mao L** (2024b.) Methyl jasmonate promotes suberin biosynthesis by stimulating transcriptional activation of AchMYC2 on AchFHT in wound healing of kiwifruit. *Postharvest Biology and Technology*, **210**.112741
- Wei X, Liu L, Xu Z, Xue J, Geng P, Ge Z, Wang X, Zhang L, Zong W, Mao L** (2023). Methyl jasmonate facilitates wound healing of Chinese yam tubers via positively regulating the biosynthesis and polymerization of suberin polyphenolics. *Scientia Horticulturae*, **312**.111840
- Xu H, Liu P, Wang C, Wu S, Dong C, Lin Q, Sun W, Huang B, Xu M, Tauqeer A, Wu S** (2019). Transcriptional networks regulating suberin and lignin in endodermis link development and ABA response. *Plant Phy*, **190**, 1165-1181.
- Yan HF, Shi Y, Li NH, Zhang YC** (2013). Progress in Tobacco Potassium Nutrition. *J Agr Sci Tec*, **15**, 123-129. (in Chinese)
- 闫慧峰, 石屹, 李乃会, 张永春 (2013). 烟草钾素营养研究进展. 中国农业科技导报, **15**, 123-129.
- Yang TZ, SHU HY, Zhao XZ** (2002). Current Status and Advances in Potassium Nutrition Research of Tobacco in China. *Tob Sci & Tec*, **7**, 39-43. (in Chinese)
- 杨铁钊, 舒海燕, 赵献章 (2002). 我国烟草钾素营养研究现状与进展. 烟草科技, **7**, 39-43.
- Zhang B, Wu J, Zhang Y, Dong XW, Han S, Gao X, Du CW, Li HY, Zhong XF, Zhu YY, Liu HW** (2023). Research Progress on Physiological Functions of Suberin lamellae in Water and Solutes Transport. *Chin Bull Bot*, **58**, 1008-1018. (in Chinese)
- 张标, 吴健, 张杨, 董小卫, 韩硕, 高昕, 杜从伍, 李慧英, 种学法, 朱莹莹, 刘海伟 (2023). 木栓层在

水和溶质运输中的生理功能研究进展. 植物学报, **58**, 1008-1018.

Zhang B, Xu Y, Zhang L, Yu S, Zhu Y, Liu C, Wang P, Shi Y, Li L, Liu H (2024). Root endodermal suberization induced by nitrate stress regulate apoplastic pathway rather than nitrate uptake in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, **216**, 109166.

Zhang B, Xu YX, Zhang LW, Zhu YY, Liu HW (2024). Mechanism of Low NO₃⁻ Stress Inhibiting Apoplastic Transport in Tobacco Roots. *Chin Tob Sci*, **45**, 25-34. (in Chinese)

张标, 许耘祥, 张莉汶, 朱莹莹, 刘海伟 (2024). 低 NO₃⁻胁迫抑制烟草根系质外体运输的机制研究. 中国烟草科学, **45**, 25-34.

Zhou Y, An YP, Ma Rong, Wang P (2024). Transcriptional regulation of suberin and its response to the environment. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, **44**, 1993-2006. (in Chinese)

周月, 安永平, 马蓉, 王沛 (2024). 木栓质的转录调控及其对环境的响应. 西北植物学报, **44**, 1993-2006.

Differences in adaptive development of suberin in tobacco root endothelial layer under different potassium levels

Yunxiang Xu^{1,2}, Liwen Zhang^{1,2}, Peng Wang¹, Yingchen Gu^{1,2}, Madan Lal Kolhi^{1,2}, Biao Zhang^{1,2}, Yingying Zhu¹, Haiwei Liu^{1*}

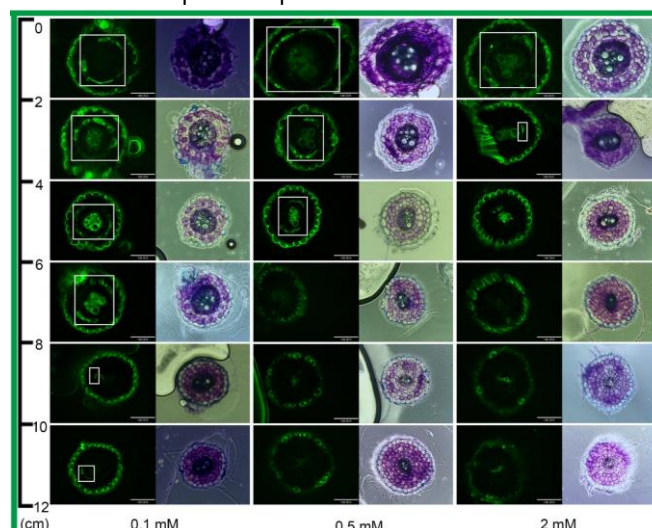
¹Institute of Tobacco Research of CAAS/Key Laboratory of Tobacco Biology and Processing, Ministry of Agriculture, Qingdao 266101, China; ²Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

INTRODUCTION: The apoplastic barriers differentiated from the root endodermis play an important role in plant stress resistance and nutrient uptake, and the development of suberin lamella has become a hot research topic in recent years.

RATIONALE: Hydroponic experiments with potassium concentration gradients ranging from 0.1 to 4.0 mmol·L⁻¹ were conducted, using the cultivated tobacco variety Zhongyan 100 as the experimental material, to explore the effect of different potassium supplies on the endodermal suberization and its physiological and molecular mechanisms.

RESULTS: It was found that low potassium stress (0.1 mmol·L⁻¹) significantly enhanced the endodermal suberization: the absolute length of the fully suberized region extended from 0–2 cm in the control to 4–6 cm, and the relative proportion increased from 0–15.0% to 33.2–44.3%. This indicates that suberization is one of the key morphological adaptation mechanisms in tobacco under low potassium stress. Phenotypic analysis showed that under low potassium stress, root elongation increased while plant biomass decreased, and potassium ion content and accumulation in both the aboveground and root parts were reduced. Additionally, the flow rate and potassium ion concentration in the xylem sap decreased, indicating reduced transport efficiency. Endogenous hormone analysis revealed that low potassium stress increased abscisic acid (ABA) content in roots while suppressing ethylene and methyl jasmonate levels, forming a specific hormonal regulatory network. Transcriptome data further supported the molecular basis of suberization development, showing significant upregulation of genes related to suberin synthesis and transport (e.g., *CYP86*, *GPAT*, *ABCG*) and their upstream positive regulatory factors (*MYB36*, *MYB41*, *MYB92*, *MYB93*).

CONCLUSION: This study is the first to elucidate that low potassium stress regulates the suberization developmental program of tobacco root through ABA-mediated hormonal signaling reprogramming, providing a novel perspective for understanding the adaptation mechanisms of plants to potassium stress.



Fluorescence imaging of transverse sections of endodermis development in tobacco root under three potassium concentrations

Key words suberization, potassium, root endodermis, hormone

Xu YX, Zhang LW, Wang P, Gu YC, Kolhi ML, Zhang B, Zhu YY, Liu HW (2025). Differences in adaptive development of suberin in tobacco root endothelial layer under different potassium levels. *Chin Bull Bot* DOI: 10.11983/CBB24191.

*Author for correspondence. E-mail: heaveyliu@163.com

通讯作者简介

刘海伟, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 青年学术带头人。主要从事营养元素迁移转化规律和施肥技术的研究工作。主持中央级公益性科研院所基本科研业务费、山东省自然科学基金面上项目、国家烟草专卖局创新平台经费专项、山东省烟草公司、山东中烟工业有限公司等项目, 参与国家重点研发计划、国家公益性行业(农业)科研专项、国家烟草专卖局重大专项、上海烟草集团、山东中烟及贵州、四川、湖南、江西、山东省烟草公司项目等, 第一或通讯作者在 *Science of the Total Environment*、*Chemosphere*、*Journal of Hazardous Materials*、植物学报、中国烟草科学等期刊发表论文 30 余篇, 第一发明人授权国家发明专利 6 项, 主编著作 3 部, 获神农中华农业科技三等奖、中国烟草总公司科技进步二等奖等省部级成果奖励。