



多组学分析磷胁迫下大豆根瘤碳氮代谢途径

姚玉波

(黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 为解析磷胁迫对大豆根瘤固氮作用的影响, 对磷胁迫处理 15 d 的大豆根瘤进行代谢组学和蛋白质组学检测, 分析根瘤中差异代谢物质和差异蛋白及参与的代谢通路。结果表明: 大豆根瘤中代谢物质和蛋白上调和下调以响应磷胁迫, 参与 11 个碳代谢途径和 19 个氮代谢途径, 糖类物质下调, 参与糖酵解、果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢等碳代谢途径, 导致根瘤中能量供应不足, 进而影响根瘤固氮作用; 氨基酸和酶以上调为主, 富集在氨基酸代谢、氮代谢、氨酰 tRNA 生物合成及嘌呤代谢通路, 是大豆根瘤响应磷胁迫的重要氮代谢途径; 氨基酸上调为 TCA 循环中间产物提供碳骨架, 碳氮代谢协同作用响应磷胁迫对大豆根瘤固氮作用的影响。研究结果为解析磷胁迫影响大豆根瘤固氮作用的生理机制提供理论参考。

关键词: 大豆; 根瘤; 磷胁迫; 代谢组学; 蛋白质组学; 代谢途径

Multi-omics Analysis of Carbon and Nitrogen Metabolism Pathways in Soybean Nodules under Phosphorus Stress

YAO Yubo

(Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to analyze the effect of phosphorus (P) stress on nodule nitrogen fixation in soybean. In this study, soybean nodules treated with P stress for 15 days as the experimental materials, metabolomics and proteomics were conducted to analyze the differential metabolites, differential proteins, and metabolic pathways. The results indicated that: differential metabolites and proteins were up-regulated and down-regulated in response to the P stress, participating in 11 carbon metabolism pathways and 19 nitrogen metabolism pathways. Sugar substances were down-regulated and participated in carbon metabolism pathways including glycolysis, fructose and mannose metabolism, galactose metabolism, starch and sucrose metabolism, leading to insufficient energy in nodules, which affected nodule nitrogen fixation. Amino acids and enzymes were mainly up-regulated, enriched in amino acid metabolism, nitrogen metabolism, aminoacyl-tRNA biosynthesis, and purine metabolism pathways, which are the important nitrogen metabolism pathways in soybean nodules in response to P stress. The up-regulation of amino acids provided the carbon backbone for TCA cycle intermediates, and the synergistic effect of carbon and nitrogen metabolism responded to the effect of P stress on nodule nitrogen fixation in soybean. The results provide theoretical basis for analyzing the physiological mechanism of nodule nitrogen fixation under P stress.

Keywords: soybean; nodule; phosphorus stress; metabolome; proteome; metabolic pathway

磷是植物必需的三大元素之一, 参与细胞活动, 如与能量相关的光合作用、呼吸作用、DNA 转录和翻译、养分吸收等生物过程, 对作物的生长发育和代谢活动必不可少, 从而影响产量和品质^[1-2]。磷胁迫会减少大豆光合产物向根瘤中运输^[3], 造成根瘤数量减少和干重下降、根瘤固氮酶活性和豆血红蛋白含量下降^[4], 从而抑制大豆根瘤固氮作用^[5-6]。

植物通过多种机制适应磷胁迫, 如基因和蛋白质表达模式的变化^[7-8]。随着组学技术的快速发展, 其越来越多地应用到磷胁迫研究领域^[2, 8-11]。前期通过代谢组学和蛋白组学对磷胁迫下大豆根瘤研究发现, 根瘤中氨基酸及其衍生物的数量增加以响应磷胁迫, 类胡萝卜素的生物合成、甘油磷脂代

谢和糖代谢与磷胁迫下大豆根瘤固氮作用相关^[12]。磷胁迫导致核糖体蛋白结构发生变化, 根瘤中过氧化物酶、紫色酸性磷酸酶和磷转运蛋白表达量均增加^[13]。

碳、氮代谢是植物体内重要的代谢过程, 既相对独立又互相作用, 碳代谢为氮代谢提供能量和氨基酸合成所必需的碳骨架, 而氮代谢过程会竞争光合作用产生的还原力, 从而影响碳代谢^[14]。光照条件^[15-16], CO₂ 浓度^[17-18] 和氮素营养^[19-20] 都会影响植物碳氮代谢过程。磷素作为参与碳氮代谢的重要营养元素, 参与光合作用、蔗糖和淀粉合成等多个碳代谢过程^[21-22], 在蛋白质代谢与碳水化合物间的相互转化中发挥着重要作用^[23-24]。而磷胁迫下对大豆根瘤碳氮代谢响应机制的深入研究较少, 因

此,本研究结合代谢组学和蛋白质组学技术,从碳氮代谢角度分析磷胁迫下大豆根瘤中差异代谢物质和差异蛋白所富集的相关代谢通路,为解析磷胁迫抑制大豆根瘤固氮作用的生理机制提供理论依据,为指导大豆生产合理施用磷肥,达到以磷促氮的目的提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试大豆品种为绥农 14,来自黑龙江省农业科学院绥化分院。

1.2 试验设计

采用砂培方法,用直径 30 cm,高 28 cm,底部钻 1 cm 直径孔的塑料桶,装砂量 20 kg,装盆前先将江砂用自来水洗净,每盆保苗 4 株。

设置 3 个磷素浓度,分别是 P1(极低磷胁迫)、P11(低磷胁迫)和 P31(正常磷浓度)。营养液组成和浓度如下:(NH₄)₂SO₄,235.80 mg·L⁻¹;MgSO₄,240.00 mg·L⁻¹;CaCl₂,220.00 mg·L⁻¹;Na₂MoO₄·H₂O,0.03 mg·L⁻¹;CuSO₄·5H₂O,0.08 mg·L⁻¹;ZnSO₄·7H₂O,0.22 mg·L⁻¹;MnCl₂·4H₂O,4.90 mg·L⁻¹;H₃BO₃,2.86 mg·L⁻¹;FeSO₄·7H₂O,5.57 mg·L⁻¹;Na₂EDTA,7.45 mg·L⁻¹。各处理 P 浓度:P1-KH₂PO₄,4.39 mg·L⁻¹,K₂SO₄,42.00 mg·L⁻¹,KCl,36.00 mg·L⁻¹;P11-KH₂PO₄,48.26 mg·L⁻¹,K₂SO₄,28.00 mg·L⁻¹,KCl,24.00 mg·L⁻¹;P31-KH₂PO₄,136.00 mg·L⁻¹。

从播种至大豆幼苗对生真叶完全展开前每日淋浇 1 次蒸馏水,每盆 500 mL;对生真叶展开至 V3 期,每日淋浇磷素浓度为 31 mg·L⁻¹ 的营养液,V3 开始进行磷胁迫处理,15 d 后取根瘤。

根瘤菌接种:在大豆对生真叶完全展开时,进行根瘤菌接种,取上一年冷冻保存的田间大豆根瘤,以 5 g·L⁻¹ 的浓度加入到营养液中,连续接种 5 d。

取样:取出大豆完整根系,用蒸馏水冲洗干净,将根瘤摘下后立即用锡纸包裹严实,液氮冷冻后保存于 -80 ℃ 冰箱中待检测用。

1.3 方法

1.3.1 代谢组学检测和分析 代谢物提取:根瘤冷冻干燥处理后研磨(45 Hz,30 s),称取 50 mg 样品,加入 1 mL 提取液(体积比,甲醇:水=3:1,含内标),涡旋 30 s,35 Hz 研磨 4 min,冰水浴超声 15 min;在混匀仪上 4 ℃ 过夜;将样品 4 ℃,12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min;取上清经 0.22 μm 微孔滤膜过滤;提取液稀释上清液 10 倍,涡旋 30 s,每个样本各取 30 μL 混

合成 QC 样本上机检测。

UHPLC-MS 分析:使用 EXION LC System (SCIEX)超高效液相色谱仪,通过液相色谱柱对目标化合物进行色谱分离。液相色谱 A 相为含 0.1% 甲酸水溶液,B 相为乙腈。柱温箱温度 40 ℃,自动进样器温度 4 ℃,进样体积 2 μL。使用装备 IonDrive Turbo V ESI 离子源的 SCIEX 6500 QTRAP + 三重四极杆质谱仪,以多反应监测(MRM)模式进行质谱分析。

1.3.2 蛋白质组学检测和分析 样品制备:0.5 g 左右样品加入酚抽提液和蛋白酶抑制剂,低温研磨 5 min;加入等体积 Tris(pH8.0)平衡酚饱和溶液,收集酚上层;加入预冷的 0.1 mol·L⁻¹ 醋酸铵-甲醇溶液,用丙酮充分去除甲醇后,收集沉淀;将干燥后粉末加入裂解液,超声 5 min 后离心取上清。采用 BCA 定量方法计算样品的蛋白浓度。每个样品取 100 μg 总蛋白,丙酮沉淀,加入蛋白复溶液溶解蛋白沉淀,加入 DTT 还原二硫键,再加入 IAA 烷基化已还原的二硫键。用 Resuspension buffer 溶解 Trypsin 至 0.5 μg·μL⁻¹,按 Trypsin:蛋白=1:50 的比例将 Trypsin 与样品充分混匀,37 ℃ 震荡孵育过夜。离心后取等量蛋白至新 EP 管中。使用 Thermo 公司 TMT(Tandem Mass Tag)标记试剂盒进行标记,等量混合各组标记样品。去除 SDC,获得标记的多肽样品脱盐,真空干燥。冻干后的标记多肽样品进行 High-pH 分级,循环收集 12 个组分,真空干燥待检测。

nanoLC-MS/MS 检测:每个样品取 1 μg 总肽,经 nanoUPLC 液相系统 EASY nLC1200 进行分离后联用配备纳升离子源的质谱仪(Q Exactive HFX)进行数据采集。色谱分离利用 100 μm ID×15 cm 反相色谱柱,流动相为乙腈-水-甲酸体系。质谱分析使用数据依赖性采集模式,总分析时长为 90 min,采取正离子检测模式。一级扫描范围 350~1 600 m·z⁻¹,分辨率 120 k,自动增益控制 3×10⁶,最大离子注入时间 30 ms,强度最高的 20 个离子经四级筛选后使用高能碰撞解离裂解后进行碎片离子扫描。二级扫描固定最小为 110 m·z⁻¹,分辨率 45 k。

1.3.3 组学联合分析 对代谢组学检测结果进行数据预处理^[25]和差异代谢物筛选^[26];对蛋白质组学检测结果进行数据预处理^[27]和差异表达蛋白筛选^[28]。

根据京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)进行通路的富集分析^[29-30],分析差异代谢物质和差异蛋白上调和下调表达情况。

2 结果与分析

2.1 磷胁迫下大豆根瘤差异代谢物质和差异蛋白分析

代谢组学共检测出 1 267 种代谢物质,包括生物碱、类黄酮、酚类、萜类、氨基酸及其衍生物、类固醇及其衍生物、苯丙素、脂肪酰基、香豆素、有机氧化合物、木脂素、核苷酸及其衍生物、植物激素等。以 VIP > 1.0 和 $P < 0.5$ 为筛选条件,与 P31 处理相比,P1 处理筛选出 200 种差异代谢物质,其中 110 个上调(55.00%),90 个下调(45.00%),P11 处理筛选出 199 种差异代谢物质,其中 100 个上调(50.25%),99 个下调(49.75%)(图 1)。

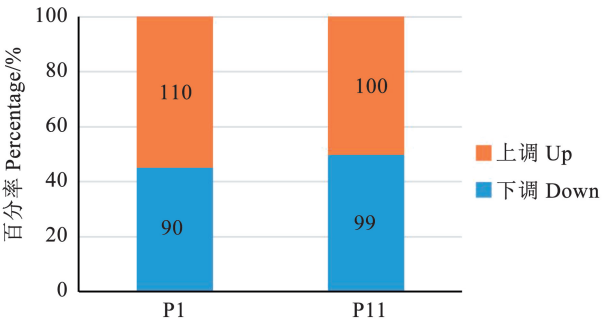


图 1 磷胁迫下大豆根瘤差异代谢物质变化
Fig.1 Changes of differential metabolites in soybean nodules under P stress

蛋白质组学共检测出 8 016 个蛋白,以 unique peptide ≥ 1.0 , Foldchange ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 和 $P < 0.5$ 为筛选条件,与 P31 处理相比,P1 处理筛选出 1 113 个差异蛋白,其中 485 个上调(43.58%),628 个下调(56.42%),P11 处理筛选出 618 个差异蛋白,其中 253 个上调(40.94%),365 个下调(59.06%)(图 2)。这些差异代谢物质和差异蛋白在根瘤中共同参与响应磷胁迫,进一步进行两组学联合分析,解析磷胁迫下大豆根瘤中差异代谢物质和差异蛋白参与的代谢途径。

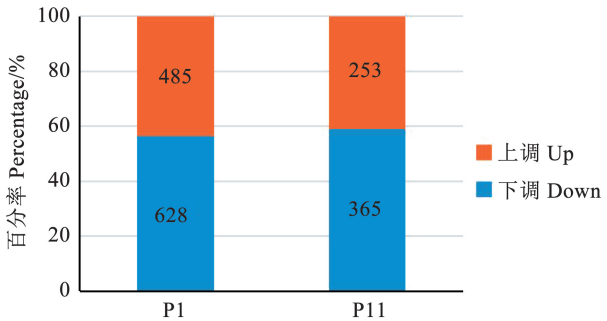


图 2 磷胁迫下大豆根瘤差异蛋白变化
Fig.2 Changes of differential proteins in soybean nodules under P stress

2.2 代谢组和蛋白质组学联合分析磷胁迫下相关代谢通路

代谢组和蛋白质组学联合分析发现,P1 和 P11 处理筛选出的差异代谢物质和差异蛋白分别参与了 105 和 98 个代谢通路,包括糖代谢、脂肪酸代谢、氨基酸代谢、异黄酮生物合成及次级代谢产物生物合成等。对两种胁迫条件下差异代谢物质和差异蛋白均参与的代谢通路做进一步分析,以与根瘤固氮作用密切相关的碳代谢和氮代谢途径作为分析方向。

2.3 磷胁迫下碳代谢相关代谢通路

如表 1 所示,两种胁迫条件下差异代谢物质和差异蛋白富集的碳代谢通路共 11 个,主要与糖代谢相关,不同代谢通路中涉及的差异代谢物质和差异蛋白存在差异。

其中,P1 和 P11 处理中大豆根瘤中甘油醛-3-磷酸脱氢酶、磷酸丙酮酸水合酶、磷酸葡萄糖变位酶、转酮酶、磷酸核糖异构酶分别上调 1.72 和 1.58 倍、1.92 和 1.79 倍、2.12 和 1.93 倍、5.36 和 4.70 倍、1.58 和 1.61 倍,葡萄糖分别下调 0.59 和 0.65 倍,P1 处理焦磷酸果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶下调 0.58 倍,参与糖酵解(gmx00010)、戊糖磷酸途径(gmx00030)及果糖和甘露糖代谢(gmx00051)。cis-乌头酸分别上调 4.11 和 1.92 倍,ATP 柠檬酸合成酶分别下调 0.49 和 0.56 倍,参与 TCA 循环(gmx00020)。UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶分别上调 1.78 和 1.80 倍,UDPG 脱氢酶、UDP-葡萄糖分别下调 0.42 和 0.59 倍、0.06 和 0.07 倍,参与戊糖和葡萄糖醛酸相互转化(gmx00040)途径。UTP-葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶、 α -半乳糖苷酶、磷酸葡萄糖变位酶分别上调 1.78 和 1.80 倍、2.24 和 1.91 倍、2.12 和 1.93 倍, β -呋喃果糖苷酶、1-磷酸半乳糖、UDP-半乳糖、葡萄糖、UDP-葡萄糖分别下调 0.55 和 0.66 倍、0.18 和 0.19 倍、0.06 和 0.07 倍、0.59 和 0.65 倍、0.06 和 0.07 倍,参与乳糖代谢(gmx00052)途径。UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶、磷酸葡萄糖变位酶分别上调 1.78 和 1.80 倍、2.12 和 1.93 倍,葡萄糖、1-磷酸半乳糖、UDP-葡萄糖、UDP-半乳糖、UDPG 脱氢酶、葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶分别下调 0.59 和 0.65 倍、0.18 和 0.19 倍、0.06 和 0.07 倍、0.06 和 0.07 倍、0.42 和 0.59 倍、0.55 和 0.67 倍,参与氨基糖和核苷酸糖代谢(gmx00520)途径。UDP-葡萄糖、UDPG 脱氢酶分别下调 0.06 和 0.07 倍、0.42 和 0.59 倍,参与抗坏血酸代谢(gmx00053)途径。UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶、蔗糖合成酶、蔗糖磷酸酶、磷酸葡萄糖变位酶分别上调 1.78 和 1.80 倍、2.47 和 2.07 倍、2.01 和 2.35 倍、2.12 和 1.93 倍,葡萄糖-1-磷酸腺

苷酸转移酶、 β -呋喃果糖苷酶、葡萄糖-6-磷酸、UDP-葡萄糖、麦芽糖分别下调 0.55 和 0.67 倍、0.55 和 0.66 倍、0.11 和 0.14 倍、0.06 和 0.07 倍、0.76 和 0.85 倍,参与淀粉和蔗糖代谢(gmx00500)途径。反式玉米素核苷分别上调 2.82 和 3.34 倍,UDP-葡萄糖分别下调 0.06 和 0.07 倍,参与玉米素生物合成(gmx00908)途径。P1 处理乳酸脱氢酶上调 2.37 倍,P1 和 P11 处理磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶分别上调 2.12 和 2.09 倍,P1 处理苹果酸合成酶下调 0.60 倍,参与丙酮酸代谢(gmx00620)途径。

表 1 磷胁迫下碳代谢相关差异代谢物质和差异蛋白及富集代谢通路

Table 1 Differential metabolites, proteins, and metabolic pathways related to carbon metabolism under P stress			
途径编号 Pathways ID	代谢通路 Description	上调 Up-regulated	下调 Down-regulated
gmx00010	糖酵解	甘油醛-3-磷酸脱氢酶;磷酸丙酮酸水合酶;磷酸葡萄糖变位酶	葡萄糖;焦磷酸果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶
gmx00030	戊糖磷酸途径	转酮酶;磷酸核糖异构酶;磷酸葡萄糖变位酶	焦磷酸果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶
gmx00020	TCA 循环	cis-乌头酸	ATP 柠檬酸合成酶
gmx00040	戊糖和葡萄糖醛酸相互转化	UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶	UDPG 脱氢酶;UDP-葡萄糖
gmx00051	果糖和甘露糖代谢	-	葡萄糖;焦磷酸果糖-6-磷酸-1-磷酸转移酶
gmx00052	半乳糖代谢	UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶; α -半乳糖苷酶;磷酸葡萄糖变位酶	β -呋喃果糖苷酶;1-磷酸半乳糖;UDP-半乳糖;葡萄糖;UDP-葡萄糖
gmx00520	氨基糖和核苷酸糖代谢	UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶;磷酸葡萄糖变位酶	葡萄糖;1-磷酸半乳糖;UDP-葡萄糖;UDP-半乳糖;UDPG 脱氢酶;葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶
gmx00053	抗坏血酸代谢	-	UDP-葡萄糖;UDPG 脱氢酶
gmx00500	淀粉和蔗糖代谢	UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷基转移酶;蔗糖合成酶;蔗糖磷酸酶;磷酸葡萄糖变位酶	葡萄糖-1-磷酸腺苷酸转移酶; β -呋喃果糖苷酶;葡萄糖-6-磷酸;UDP-葡萄糖;麦芽糖
gmx00908	玉米素生物合成	反式玉米素核苷	UDP-葡萄糖
gmx00620	丙酮酸代谢	乳酸脱氢酶;磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶	苹果酸合成酶

2.4 磷胁迫下氮代谢相关代谢通路

如表 2 所示,两种胁迫条件下差异代谢物质和差异蛋白富集的氮代谢相关通路共 19 个,主要与氨基酸代谢相关,差异代谢物质和差异蛋白的种类、数量和上调/下调情况存在差异。

磷胁迫下差异代谢物质参与的氨基酸代谢相关通路共 16 个,涉及氨基酸代谢、合成和降解。其中,氨基酸代谢途径 11 个,P1 和 P11 处理中吡啶、色氨酸、犬尿氨酸、甲氧基吡啶乙酸分别上调 1.71 和 1.33 倍、4.11 和 2.54 倍、7.81 和 7.20 倍、3.68 和 2.26 倍,参与色氨酸代谢(gmx00380)途径;酪氨酸、苯酚、4-羟基-3-甲氧基扁桃酸分别上调 3.30 和 3.15 倍、3.65 和 3.65 倍、1.35 和 1.36 倍,参与酪氨酸代谢(gmx00350)途径;天冬氨酸、组氨酸分别上调 1.44 和 2.03 倍、8.00 和 5.90 倍,参与组氨酸代谢(gmx00340)途径;精氨酸、鸟氨酸、5-氨基戊酸分别上调 29.49 和 25.94 倍、6.53 和 5.84 倍、1.86 和 1.71 倍,4-氨基丁酸、脯氨酸羟化酶分别下调 0.48 和 0.64 倍、0.58 和 0.67 倍,参与精氨酸和脯氨酸代谢(gmx00330)途径;天冬氨酸、组氨酸分别

上调 1.44 和 2.03 倍、8.00 和 5.90 倍,尿嘧啶、丙氨酸、4-氨基丁酸分别下调 0.61 和 0.65 倍、0.69 和 0.80 倍、0.48 和 0.64 倍,参与 β -丙氨酸代谢(gmx00410)途径;天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺合成酶分别上调 1.44 和 2.03 倍、8.82 和 7.25 倍、2.37 和 1.68 倍,天冬酰胺合成酶、丙氨酸分别下调 0.51 和 0.50 倍、0.69 和 0.80 倍,参与丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(gmx00250)途径;谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽转移酶、鸟氨酸分别上调 1.90 和 1.66 倍、5.16 和 3.62 倍、6.53 和 5.84 倍,半胱氨酰甘氨酸、谷胱甘肽分别下调 0.29 和 0.48 倍、0.12 和 0.44 倍,参与谷胱甘肽代谢(gmx00480)途径;酪氨酸、缬氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺分别上调 3.30 和 3.15 倍、1.60 和 1.64 倍、1.44 和 2.03 倍、8.82 和 7.25 倍,丙氨酸下调 0.69 和 0.80 倍,参与氰基氨基酸代谢(gmx00460)途径;天冬氨酸、苏氨酸、色氨酸、丝氨酸分别上调 1.44 和 2.03 倍、1.52 和 1.49 倍、4.11 和 2.54 倍、1.52 和 1.49 倍,参与甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢(gmx00260)途径;天冬氨酸、丝氨酸分别上调 1.44 和 2.03 倍、1.52 和 1.49 倍,

谷胱甘肽、丙氨酸、甲硫氨酸 γ 裂解酶分别下调 0.12 和 0.44 倍、0.69 和 0.80 倍、0.66 和 0.58 倍,参与半胱氨酸和蛋氨酸代谢 (gmx00270) 途径;酪氨酸、苯乙胺分别上调 3.30 和 3.15 倍、1.26 和 1.33 倍,参与苯丙氨酸代谢 (gmx00360) 途径。

氨基酸合成途径 4 个,P1 和 P11 处理中吡啶、色氨酸、酪氨酸分别上调 1.71 和 1.33 倍、4.11 和 2.54 倍、3.30 和 3.15 倍,参与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 (gmx00400) 途径;谷氨酰胺合成酶、天冬氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸、精氨酸分别上调 2.37 和 1.68 倍、1.44 和 2.03 倍、4.00 和 4.50 倍、6.53 和 5.84 倍、29.49 和 25.94 倍,参与精氨酸生物合成 (gmx00220) 途径;天冬氨酸、丝氨酸分别上调 1.44 和 2.03 倍、1.52 和 1.49 倍,参与赖氨酸生物合成 (gmx00300) 途径;苏氨酸、缬氨酸分别上调 1.52 和 1.49 倍、1.60 和 1.64 倍,异丙基苹果酸合成酶下调 0.56 倍,参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸

生物合成 (gmx00290) 途径。
氨基酸降解途径 1 个,P1 和 P11 处理中缬氨酸上调 1.60 和 1.64 倍,参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 (gmx00280) 途径。
此外,P1 和 P11 处理中磷酸葡萄糖变位酶、硫酸盐腺苷酸转移酶、尿囊素酶分别上调 2.12 和 1.93 倍、2.35 和 1.87 倍、1.71 和 1.56 倍、5'-核苷酸酶、鸟嘌呤分别下调 0.51 和 0.61 倍、0.67 和 0.79 倍,参与嘌呤代谢 (gmx00230) 途径;天冬氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、缬氨酸、精氨酸、组氨酸、酪氨酸和色氨酸分别上调 1.44 和 2.03 倍、8.82 和 7.25 倍、1.52 和 1.49 倍、1.60 和 1.64 倍、29.49 和 25.94 倍、8.00 和 5.90 倍、3.30 和 3.15 倍、4.11 和 2.54 倍,丙氨酸下调 0.69 和 0.80 倍,参与氨酰 tRNA 生物合成 (gmx00970) 途径;碳酸酐酶和谷氨酰胺合成酶分别上调 2.59 和 2.05 倍、2.37 和 1.68 倍,参与氮代谢 (gmx00910) 途径。

表 2 磷胁迫下氮代谢相关差异代谢物质和差异蛋白及富集代谢通路

Table 2 Differential metabolites, proteins, and metabolic pathways related to nitrogen metabolism under P stress			
途径编号	代谢通路	上调	下调
Pathways ID	Description	Up-regulated	Down-regulated
gmx00380	色氨酸代谢	吡啶;色氨酸;犬尿氨酸;甲氧基吡啶乙酸	-
gmx00350	酪氨酸代谢	酪氨酸;苯酚;4-羟基-3-甲氧基扁桃酸	-
gmx00340	组氨酸代谢	天冬氨酸;组氨酸	-
gmx00330	精氨酸和脯氨酸代谢	精氨酸;鸟氨酸;5-氨基戊酸	4-氨基丁酸;脯氨酸羟化酶
gmx00410	β -丙氨酸代谢	组氨酸;天冬氨酸	尿嘧啶;丙氨酸;4-氨基丁酸
gmx00250	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢	天冬氨酸;天冬酰胺;谷氨酰胺合成酶	天冬酰胺合成酶;丙氨酸
gmx00230	嘌呤代谢	磷酸葡萄糖变位酶;硫酸盐腺苷酸转移酶;尿囊素酶	5'-核苷酸酶;鸟嘌呤
gmx00400	苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成	吡啶;色氨酸;酪氨酸	-
gmx00480	谷胱甘肽代谢	谷胱甘肽过氧化物酶;谷胱甘肽转移酶;鸟氨酸	半胱氨酰甘氨酸;谷胱甘肽
gmx00460	氨基酸代谢	酪氨酸;缬氨酸;天冬氨酸;天冬酰胺	丙氨酸
gmx00260	甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢	天冬氨酸;苏氨酸;色氨酸;丝氨酸	-
gmx00970	氨酰 tRNA 生物合成	天冬氨酸;天冬酰胺;苏氨酸;缬氨酸;精氨酸;组氨酸;酪氨酸;色氨酸	丙氨酸
gmx00270	半胱氨酸和蛋氨酸代谢	天冬氨酸;丝氨酸	谷胱甘肽;丙氨酸;甲硫氨酸 γ 裂解酶
gmx00220	精氨酸生物合成	谷氨酰胺合成酶;天冬氨酸;瓜氨酸;鸟氨酸;精氨酸	-
gmx00300	赖氨酸生物合成	天冬氨酸;丝氨酸	-
gmx00910	氮代谢	碳酸酐酶;谷氨酰胺合成酶	-
gmx00280	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解	缬氨酸	-
gmx00290	缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成	苏氨酸;缬氨酸	异丙基苹果酸合成酶
gmx00360	苯丙氨酸代谢	酪氨酸;苯乙胺	-

3 讨论

碳、氮代谢是植物生长发育过程及形态建成的重要代谢途径,碳、氮代谢水平直接反映植株生长

发育状态。碳、氮代谢之间是紧密联系的,氮代谢需要碳代谢提供碳源和能量,碳代谢需要氮代谢提供酶和光合色素^[31-32]。磷胁迫会对大豆碳水化合物和蛋白质的合成、运输等碳氮代谢过程产生影

磷胁迫下大豆根瘤中代谢物质和酶上调和下调,参与 11 个碳代谢途径和 19 个氮代谢途径。葡萄糖、半乳糖、麦芽糖等差异代谢物质下调,参与糖

酵解、果糖和甘露糖代谢、半乳糖代谢、淀粉和蔗糖代谢等碳代谢途径,导致根瘤中能量供应不足,进而影响根瘤固氮作用;氨基酸和酶主要上调表达,富集在氨基酸代谢、氮代谢、氨酰 tRNA 生物合成、嘌呤代谢通路,是大豆根瘤响应磷胁迫的重要氮代谢途径;氨基酸上调为 TCA 循环中间产物提供碳骨架,碳氮代谢协同作用响应磷胁迫对大豆根瘤固氮作用的影响。

参考文献

[1] CORDELL D, WHITE S. Life's bottleneck: Sustaining the world's phosphorus for a food secure future [J]. Annual Review of Environment and Resources, 2014, 39: 161-188.

[2] YANG A, KONG L, WANG H, et al. Response of soybean root to phosphorus deficiency under sucrose feeding: Insight from morphological and metabolome characterizations [J]. BioMed Research International, 2020(1): 2148032.

[3] TSVETKOVA G, GEORGIEV G, POPOV M. Effect of phosphorus nutrition on the nodulation, nitrogen fixation and nutrient-use efficiency of *Bradyrhizobium japonicum* - soybean (*Glycine max* L. merr.) symbiosis [J]. Bulgarian Journal of Plant Physiology. special issue, 2003: 331-335.

[4] 王树起, 韩晓增, 乔云发, 等. 缺磷胁迫对大豆根瘤生长和结瘤固氮的影响[J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 1000-1003. (WANG S Q, HAN X Z, QIAO Y F, et al. Nodule growth, nodulation and nitrogen fixation in soybean (*Glycine max* L.) as affected by p deficiency stress[J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 1000-1003.)

[5] 姚玉波, 吴冬婷, 龚振平, 等. 磷素水平对大豆氮素积累及产量的影响[J]. 核农学报, 2012, 26(6): 947-951. (YAO Y B, WU D T, GONG Z P, et al. Effect of phosphorus level on nitrogen accumulation and yield in soybean [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2012, 26(6): 947-951.)

[6] ISRAEL D W. Symbiotic dinitrogen fixation and host-plant growth during development of and recovery from phosphorus deficiency [J]. Physiologia Plantarum, 1993, 88(2): 294-300.

[7] O'ROURKE J A, MCCABE C E, GRAHAM M A. Dynamic gene expression changes in response to micronutrient, macronutrient, and multiple stress exposures in soybean [J]. Functional & Integrative Genomics, 2020, 20(3): 321-341.

[8] ZHAO H, YANG A, KONG L, et al. Proteome characterization of two contrasting soybean genotypes in response to different phosphorus treatments[J]. AoB Plants, 2021, 13(3): plab019.

[9] HERNÁNDEZ G, RAMÍREZ M, VALDÉS-LÓPEZ O, et al. Phosphorus stress in common bean: Root transcript and metabolic responses[J]. Plant Physiology, 2007, 144(2): 752-767.

[10] HERNÁNDEZ G, VALDÉS-LÓPEZ O, RAMÍREZ M, et al. Global changes in the transcript and metabolic profiles during symbiotic nitrogen fixation in phosphorus-stressed common bean plants[J]. Plant Physiology, 2009, 151(3): 1221-1238.

[11] TAWARAYA K, HORIE R, SAITO S, et al. Metabolite profiling of root exudates of common bean under phosphorus deficiency[J].

Metabolites, 2014, 4(3): 599-611.

[12] YAO Y, YUAN H, WU G, et al. Nitrogen fixation capacity and metabolite responses to phosphorus in soybean nodules [J]. Symbiosis, 2022, 88(1): 21-35.

[13] YAO Y, YUAN H, WU G, et al. Proteome analysis of the soybean nodule phosphorus response mechanism and characterization of stress-induced ribosome structural and protein expression changes[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 908889.

[14] 丁怡梦, 陈慕琪, 丁文锐, 等. 谷类作物碳氮代谢互作机制的研究进展[J]. 植物生理学报, 2024, 60(5): 753-761. (DING Y M, CHEN M Q, DING W R, et al. Research advances on the carbon-nitrogen metabolic interaction mechanisms in cereal crops[J]. Plant Physiology Journal, 2024, 60(5): 753-761.

[15] 张玉春, 刘添, 李亚静, 等. 施氮量和花后弱光对冬小麦氮代谢影响的研究进展[J]. 河北科技师范学院学报, 2018, 32(2): 51-56. (ZHANG Y C, LIU T, LI Y J, et al. Effects of nitrogen application and weak light on nitrogen metabolism in winter wheat[J]. Journal of Hebei Normal University of Science & Technology, 2018, 32(2): 51-56.)

[16] 陈心怡, 朱盈, 马中涛, 等. 光强和氮肥互作对南方软米梗稻灌浆结实期碳氮代谢影响及其与产量品质间关系[J]. 作物学报, 2023, 49(11): 3042-3062. (CHEN X Y, ZHU Y, MA Z T, et al. Effects of light intensity and nitrogen fertilizer interaction on carbon and nitrogen metabolism at grain-filling stage and its relationship with yield and quality of southern soft Japonica rice [J]. Acta Agronomica Sinica, 2023, 49(11): 3042-3062.)

[17] 李明, 李迎春, 牛晓光, 等. 大气 CO₂ 浓度升高与氮肥互作对玉米花后碳氮代谢及产量的影响[J]. 中国农业科学, 2021, 54(17): 3647-3665. (LI M, LI Y C, NIU X G, et al. Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration and nitrogen fertilizer on the yield of summer maize and carbon and nitrogen metabolism after flowering[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(17): 3647-3665.)

[18] VICENTE R, PÉREZ P, MARTÍNEZ-CARRASCO R, et al. Quantitative RT-PCR platform to measure transcript levels of C and N metabolism-related genes in durum wheat: Transcript profiles in elevated [CO₂] and high temperature at different levels of N supply [J]. Plant & Cell Physiology, 2015, 56(8): 1556-1573.

[19] 吴雅薇, 赵波, 杜伦静, 等. 低氮胁迫对不同氮效率玉米品种苗期叶片碳氮代谢的影响[J]. 玉米科学, 2019, 27(6): 74-83. (WU Y W, ZHAO B, DU L J, et al. Effects of low nitrogen stress on carbon-nitrogen metabolites and related enzyme activities in leaves of maize varieties with contrasting nitrogen efficiency at seedling stage[J]. Journal of Maize Sciences, 2019, 27(6): 74-83.)

[20] 刘海坤, 刘小宁, 黄玉芳, 等. 不同氮水平下小麦植株的碳氮代谢及碳代谢与赤霉病的关系[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(7): 782-789. (LIU H K, LIU X N, HUANG Y F, et al. Effect of nitrogen application on carbon and nitrogen metabolisms and relationship between carbon metabolism and wheat scab[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2014, 22(7): 782-789.)

[21] CIERESZKO I, JOHANSSON H, HURRY V, et al. Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho

mutants of *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2001, 212(4): 598-605.

[22] 廖红, 严小龙. 高级植物营养学[M]. 北京: 科学出版社, 2003. (LIAO H, YAN X L. Advanced plant nutrition[M]. Beijing: Science Press, 2003.)

[23] 吴明才, 肖昌珍, 郑普英. 大豆磷素营养研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3): 59-65. (WU M C, XIAO C Z, ZHENG P Y. Study on the physiological function of phosphorus to soybean[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(3): 59-65.)

[24] 丁洪, 李生秀. 磷素营养与大豆生长和共生固氮的关系[J]. 西北农业大学学报, 1998, 26(5): 67-70. (DING H, LI S X. Relationship between phosphorus nutrition and soybean growth and symbiotic nitrogen fixation[J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 1998, 26(5): 67-70.)

[25] DUNN W B, BROADHURST D, BEGLEY P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *Nature Protocols*, 2011, 6: 1060-1083.

[26] SACCENTI E, HOEFSLOOT H C J, SMILDE A K, et al. Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data[J]. *Metabolomics*, 2014, 10(3): 361-374.

[27] PLUBELL D L, WILMARTH P A, ZHAO Y, et al. Extended multiplexing of tandem mass tags (TMT) labeling reveals age and high fat diet specific proteome changes in mouse epididymal adipose tissue[J]. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 2017, 16(5): 873-890.

[28] LIU X, WANG J, GAO L, et al. iTRAQ-based proteomic analysis of neonatal kidney from offspring of protein restricted rats reveals abnormalities in intraflagellar transport proteins[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 2017, 44(1): 185-199.

[29] OGATA H, GOTO S, SATO K, et al. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1): 29-34.

[30] KANEHISA M, SATO Y, KAWASHIMA M, et al. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(D1): D457-D462.

[31] 史宏志, 韩锦峰. 烤烟碳氮代谢几个问题的探讨[J]. 烟草科技, 1998(2): 34-36. (SHI H Z, HAN J F. Discussion on several issues of carbon and nitrogen metabolism in tobacco leaves[J]. *Tobacco Science & Technology*, 1998(2): 34-36.)

[32] 黄树永, 陈良存. 烟草碳氮代谢研究进展[J]. 河南农业科学, 2005, 34(4): 8-11. (HUANG S Y, CHEN L C. Research advance on carbon and nitrogen metabolism in tobacco[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2005, 34(4): 8-11.)

[33] 王一琳. 油菜生长发育进程中碳氮代谢变化规律研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013. (WANG Y L. Changes of carbon and nitrogen metabolism during rape growth and development [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013.)

[34] 杨艳婷. 扁蓿豆的碳氮代谢规律及其对低温胁迫的响应[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2022. (YANG Y T. Carbon and nitrogen metabolism of alfalfa and its response to low temperature stress [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2022.)

[35] 李宏宇. 磷素水平对大豆结瘤固氮及相关代谢途径的调控研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2022. (LI H Y. Regulation of phosphorus level on nodulation, nitrogen fixation and related metabolic pathways in soybean [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2022.)

[36] 赵薇, 陈荣智, 何光存. 水稻尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶异构体的研究[C]//湖北省遗传学会、江西省遗传学会 2006 年学术年会暨学术讨论会论文摘要集. 九江, 2006: 87.

[37] SEKI M, NARUSAKA M, ISHIDA J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray[J]. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 2002, 31(3): 279-292.

[38] EGLI B, KÖLLING K, KÖHLER C, et al. Loss of cytosolic phosphoglucomutase compromises gametophyte development in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2010, 154(4): 1659-1671.

[39] HILDEBRANDT T M, NUNES NESI A, ARAÚJO W L, et al. Amino acid catabolism in plants[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8(11): 1563-1579.

[40] PIRES M V, PEREIRA JÚNIOR A A, MEDEIROS D B, et al. The influence of alternative pathways of respiration that utilize branched-chain amino acids following water shortage in *Arabidopsis* [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39(6): 1304-1319.

[41] MAEDA H, DUDAREVA N. The shikimate pathway and aromatic amino Acid biosynthesis in plants[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2012, 63: 73-105.

[42] ISMAIL G. Roles of hydrogen sulfide and cysteine in alleviation of nickel-induced oxidative damages in wheat seedling[J]. *The Egyptian Journal of Experimental Biology*, 2013, 9: 105-114.

[43] LUNDBERG P, LUNDQUIST P O. Primary metabolism in N2-fixing *Alnus incana* - *Frankia symbiotic* root nodules studied with 15N and 31P nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Planta*, 2004, 219(4): 661-672.

[44] 王联结. 生物化学与分子生物学原理[M]. 北京: 科学出版社, 2002. (WANG L J. Principles of biochemistry and molecular biology[M]. Beijing: Science Press, 2002.)

[45] 宋建民, 田纪春, 赵世杰. 植物光合碳和氮代谢之间的关系及其调节[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(3): 230-238. (SONG J M, TIAN J C, ZHAO S J. Relationship between photosynthetic carbon and nitrogen metabolism in plants and its regulation[J]. *Plant Physiology Communications*, 1998, 34(3): 230-238.)