DOI：10. 16853/j. cnki. 1009-3575. 2026. 06. 005

基于蛋白质组和代谢组解析兴安落叶松针叶衰老调控

单金园，张旭婷，王瑞刚，李国婧*
（内蒙古农业大学生命科学学院/内蒙古自治区旱寒区植物逆境适应与遗传修饰改良重点实验室，呼和浩特 010011）

摘要：兴安落叶松（*Larix gmelinii*）作为典型的针叶落叶乔木，是大兴安岭地区既经济又益于生态的重要树种，其针叶的衰老在生长发育过程中有着重要的意义，因此，破译其衰老的分子机制，为落叶乔木植物冬季休眠机制研究提供参考数据，对筛选和培育优良落叶松品系有指导意义。本研究运用蛋白质组和代谢组联合分析技术，探究秋季兴安落叶松10月份针叶的黄色（早衰型，Y）与绿色（晚衰型，G）两种不同衰老表型的分子机制。共鉴定出784种DEPs和578种DAMs，生物信息学分析发现，早衰型落叶松的DEPs在光合作用、氨酰-tRNA生物合成、精氨酸生物合成等通路显著富集；DAMs则主要富集在代谢途径、ABC转运体、氨基酸生物合成、氨酰-tRNA生物合成及类黄酮生物合成等通路中。联合分析明确了蛋白质与代谢物之间的关联，并共同富集在氨酰-tRNA生物合成通路上。以晚衰型为对照组，其中，DAMs中的Pro、Tyr、Met等代谢物呈现上调趋势，而Asp、Glu、Phe等呈现下调趋势；在DEPs中仅有TyrRS呈现上调趋势。以上规律同乙酰化修饰组的分析结果基本一致。上述结果为深入解析叶片衰老以及树木季节性生长背后的分子机制，提供了全新的视角与理论依据。

关键词：兴安落叶松；叶片衰老；蛋白质组；代谢组；联合分析
中图分类号：Q945. 48 **文献标志码**：A **文章编号**：1009-3575（2026）06-0030-11

Analysis of Aging Regulation of *Larix gmelinii* Needle Based on Combined Proteome and Metabolome Analysis techniques

SHAN Jinyuan，ZHANG Xuting，WANG Ruigang，LI Guojing*
（*College of Life Sciences*，*Inner Mongolia Agricultural University*，*Inner Mongolia Key Laboratory of Plant Adversity Adaption and Genetic Improvment in Cold and Arid Regions*，*Hohhot* 010011，*China*）

Abstract：*Larix gmelinii*，as a typical coniferous and deciduous tree，is an important tree species in the Greater Khingan Range region，providing both economic and ecological benefits. The aging of its needles plays a crucial role in its growth and development process. Therefore，deciphering the molecular mechanism of needle aging can provide reference data for the study of winter dormancy mechanism of deciduous trees，and has guiding significance for screening and cultivating excellent germplasm of *L. gmelinii*. This study employed a combination of proteomics and metabolomics analysis to explore the molecular mechanisms underlying the two different aging phenotypes，i. e.，yellow（early senescence type）and green（late senescence type）needles of *L. gmelinii* in autumn. Totally 784 types of DEPs and 578 types of DAMs were identified. Bioinformatics analysis revealed that DEPs in the early senescence genotype were significantly enriched in pathways such as photosynthesis，aminoacyl-tRNA biosynthesis，and arginine biosynthesis；DAMs were mainly enriched in metabolic pathways，ABC transporters，amino acid biosynthesis，aminoacyl-tRNA biosynthesis，and flavonoid biosynthesis pathways. The joint analysis clarified the association between proteins and metabolites，and enriched them together in the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway. Compared to the needles in the late senescence type，Pro，Tyr，Met and other metabolites in DAMs showed an upregulation trend，while Asp，Glu，Phe and other metabolites showed a downregulation trend in the early senescence type. Only TyrRS showed an increase in DEPs. These results were basically consistent with that of acetylation analysis. The above results provided a new perspective and theoretical basis for in-depth analysis of the molecular mechanisms behind leaf aging and seasonal growth of trees.

Key words：*Larix gmelinii*；Leaf senescence；Proteome；Metabolome；Joint analysis

植物的衰老是指植物在生命周期中，植物的个体或其器官在生理和形态等方面随时间推移逐渐出现退行性变化，最终功能衰退直至植物死亡的过程[1]。对于多年生木本植物来说，其叶片、花、果实等器官会在特定的季节或生长阶段发生衰老并脱落，但枝干和根系仍能保持活力，在不利的季节进入休眠状态，减少能量消耗和环境胁迫对自身的影响，增强植物的生存能力和适应性，使植株存活多

收稿日期：2025-04-30
基金项目：呼和浩特市重大科技专项项目（2022-社-重-1-3）；杭锦旗科技计划项目（2024HJGJ03）；内蒙古科技创新团队项目（BR22-13-05，NMGIRT2222）
作者简介：单金园（1999—），女，硕士研究生，主要从事兴安落叶松衰老方面的研究，E-mail：shanjinyuan2@126. com；*为通信作者，李国婧（1972—），女，教授，博士，主要从事植物逆境生物学及林木新种质创制等方面的研究，E-mail：liguojing@imau. edu. cn

年[2]。其中，叶片是多年生植物衰老过程中最明显的部位之一，其衰老是植物提高养分利用效率，将养分回收再利用，实现营养同化到营养转运的重要手段之一[3]。植物叶的衰老是叶片发育的最后阶段，叶片在衰老时，细胞内的蛋白质、核酸等大分子物质分解、转运到植物的茎、根、芽等部位进行储存，为植株来年的生长提供必要的营养以维持植物的生存和繁衍[4-5]。

近年来，随着组学技术的迅猛发展，蛋白质组学和代谢组学为深入解析生物过程的分子机制提供了有力工具[6]。Lihavainen 等[7]通过对蛋白组和代谢组研究发现，杨树早期衰老过程中脱落酸（abscisic acid，ABA）、乙烯（ethylene，ET）反应相关的 AP2/ERF 转录因子上调，参与 ET 信号传导、衰老和光周期途径调节的 RAV 转录因子也发生变化。同时，水杨酸（salicylic acid，SA）通路受系统获得性抗性缺陷 1（SARD1）蛋白和钙调蛋白结合蛋白 60B（CBP60B）调控，且 SA 分解产物水平在代谢层面与代谢反应之间存在联系，综合蛋白组和代谢组研究揭示了杨树生理过程中蛋白与代谢产物间的关联及对生理反应的调控。Han 等[8]通过蛋白质组与代谢组学联合研究，发现糖基转移酶 Slr1064 缺失时，碳代谢关键酶 GAP2 周转速率受抑制，黑暗条件下 PRK/GAPDH/CP12 复合物装配被破坏；与此同时，代谢组学结果表明 Slr1064 缺失引起的代谢物 UDP-GlcNAc 水平变化，揭示了代谢物水平与蛋白质功能状态在碳代谢调控中的协同变化关系。Li 等[9]在苜蓿的盐胁迫研究中发现，植物通过蛋白质组与代谢组的协同调控，实现了对能量供应与抗氧化防御的优先保障。其中，抗氧化系统相关蛋白的显著上调与三羧酸（tricarboxylic acid，TCA）循环代谢通路激活呈现协同关系，共同增强植物抗氧化与渗透调节能力；与此同时，卡尔文循环和光呼吸途径相关蛋白表达抑制，与对应代谢通路活性同步降低。蛋白质作为生命活动的直接执行者，其表达水平和修饰状态的变化能够直观反映细胞内的生理生化进程；而代谢物作为细胞代谢活动的终产物，其种类和含量的改变则是细胞代谢网络对内外环境刺激做出响应的最终体现。

落叶松隶属松科（Pinaceae）落叶松属（*Larix*），是一种针形叶落叶乔木，是典型的裸子植物，广泛分布于欧亚大陆[10]。我国北方和西部高山地区亦广泛分布着落叶松[11]，其中，我国东北林区中面积最大的大兴安岭针叶林的主要建群树种为兴安落叶松（*Larix gmelinii*）[12]。兴安落叶松的生长寿命长，其优良的耐旱性和耐盐碱性，能适应多种气候和环境，早期速生、易成活，具有宝贵的林业生态价值[13]。落叶松的木材重而坚实，有抗压、抗弯曲、耐腐朽等特点，是建筑、桥梁、枕木、家具等用途的优良用材[14]，因其木材纤维长，也是造纸和人造纤维的良好原料[15]。同时，落叶松还广泛应用于化工、医药等行业[16-17]，因此有着很高的经济价值[18]。落叶松树干通直，树形美观，尤其是到了秋季，树叶变为金黄色，常被用于城市绿化、园林景观设计以及森林公园的建设中，具有较高的观赏价值[19]。

本研究运用蛋白质组和代谢组联合分析技术，鉴定关键的差异表达蛋白质和代谢物，探讨其参与的代谢途径和调控网络，解析落叶松针叶衰老过程中蛋白质和代谢物的变化规律，为深入揭示落叶松针叶衰老机制提供新的见解和理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

本次试验材料中的兴安落叶松检测样品采集于内蒙古自治区呼和浩特市武川县的落叶松林，从大青山绿化造林的落叶松林地中，挑选树龄和生长环境相同、冠型相似的个体，但秋季衰老期（10 月初）个体针叶叶片颜色表型差异明显的两棵落叶松（图 1），分别标记为黄色叶片样本（Y：早衰型落叶松针叶）和绿色叶片样本（G：晚衰型落叶松针叶），采样地坐标为北纬 41°1′36″，东经 111°48′25″。

样品取自落叶松树冠中部二年生枝条上的叶

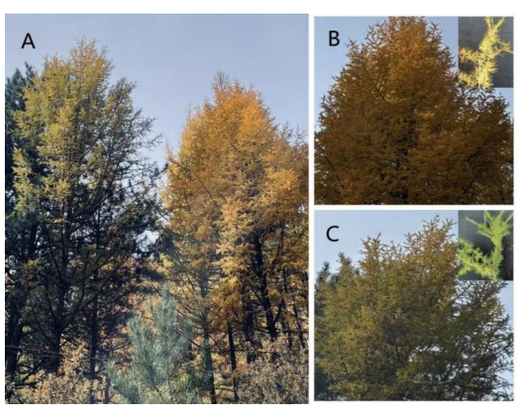


图 A 右侧和图 B 是早衰型落叶松（Y），其针叶为黄色表型；
图 A 左侧和图 C 是晚衰型落叶松（G），其针叶为绿色表型。

图 1　兴安落叶松 10 月份针叶衰老表型

Fig. 1　Needle senescence phenotype of *L. gmelinii* in October

片，所有样品采集后迅速冻于液氮中，于-80 ℃冰箱中保存并用于后续研究。

1.2 实验仪器

本研究主要使用的仪器见表1。

表1 本研究所使用主要仪器

Table 1 The main instruments used in this study

实验仪器	仪器型号
研磨	中国 KEFEI KF-96TG
低温离心机、常温离心机	德国 Eppendorf（5810R、5804）
水浴锅	中国 一恒（DK-8D）
超微量紫外分光光度计	美国 Quawell（Q5000）
紫外可见光分光光度计	美国 Thermo（GEN10S UV-Vis）

1.3 实验方法

1.3.1 生理指标测定

1.3.1.1 叶绿素含量的测定

用10 mL体积比为1∶1的无水乙醇和丙酮混合提取液从10 mg落叶松针叶样品中提取叶绿素，室温条件下浸泡，黑暗放置处理24 h至叶片完全变白。根据上海优选生物科技有限公司叶绿素含量测定试剂盒使用说明用超微量紫外分光光度计分别测定OD_{663}和OD_{645}处吸光值，3次重复取平均值。根据公式总叶绿素含量（mg/dm^2）=（8.02×OD_{663}+20.2×OD_{645}）×V/（1 000×w），计算叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素含量。公式中：V为提取液的总体积，mL；w为样品的重量，g。

1.3.1.2 其他生理指标测定

使用上海优选生物科技有限公司试剂盒（YX-W-A401，YX-W-A501，YX-C-A500）对早衰和晚衰型落叶松针叶样品进行丙二醛（MDA）、过氧化氢酶（CAT）和超氧化物歧化酶（SOD）活性指标测定，每种指标测定3次取平均值。

1.3.2 蛋白质组检测方法

将早衰型和晚衰型落叶松针叶样品从-80 ℃冰箱取出，于液氮预冷的研钵中充分研磨至粉末，注意样品应保持冷冻状态不能融化，每个样品包括3次样本重复。委托杭州景杰生物科技股份有限公司通过蛋白提取、胰蛋白酶消化、液相色谱-质谱串联分析（NanoElute）、数据库检索等步骤完成样本全蛋白质组检测。

1.3.3 蛋白功能注释

使用常用的功能数据库，如GO、KEGG、InterPro、COG和STRING数据库，对鉴定出的蛋白质进行注释。之后进行主成分分析（principal component analysis，PCA），将原本鉴定到的所有蛋白重新进行线性组合，形成一组新的综合变量，同时根据所分析的问题从中选取几个综合变量，使它们尽可能多地反映原有变量的信息，从而达到降维的目的。最后，按照调整后P值小于0.05且折叠变化大于或等于2的标准，筛选出差异表达蛋白（differentially expressed protein，DEPs）进行后续分析。

1.3.4 非靶标代谢组检测方法

代谢组检测所用样品与蛋白组检测样品来源于同一批兴安落叶松样品，选取早衰型和晚衰型落叶松针叶样品粉末进行代谢组学分析，每个样品包括3次样本重复。委托上海中科新生命公司通过样品制备与提取、色谱-质谱分析（Agilent 1290 Infinity LC）、代谢物定性定量等步骤完成非靶标代谢组检测。

1.3.5 代谢产物的鉴定

本实验利用中科新生命本地自建标准品数据库，通过匹配代谢物的保留时间、分子质量（误差<25×10^{-6}）、二级碎裂谱图及碰撞能，鉴定生物样本中代谢物结构。采用PCA分析代谢物，观察样本组间和组内的变异与分布差异。借助OPLS-DA模型获取VIP值，结合$P<0.05$，筛选VIP>1的差异代谢物（differentially accumulated metabolites，DAMs）用于后续研究。

1.3.6 所用相关软件及网站

本研究所用相关软件及网站见表2。

表2 本研究所用软件及网站

Table 2 Software and websites used in this research

分析用途	软件名称	软件网址
GO/Domain注释	InterProScan	http://www.ebi.ac.uk/interpro/
KEGG注释	KAAS	http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main
亚细胞定位注释	Wolfpsort	http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html
蛋白互作及网络可视化	STRING	https://www.string-db.org/

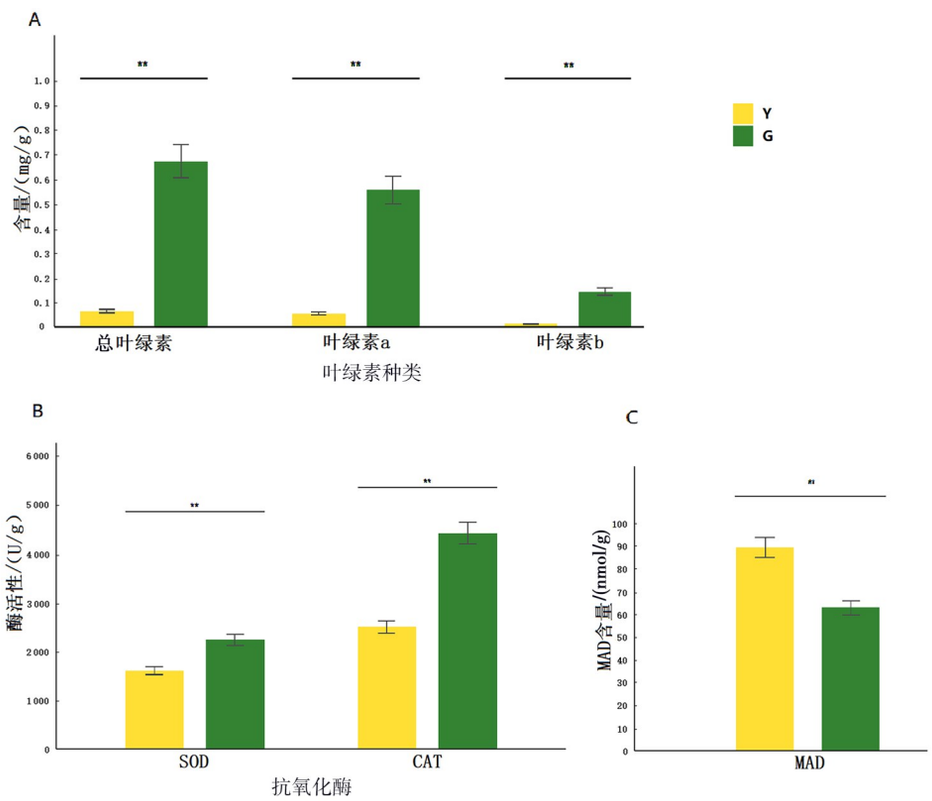
2 结果与分析

2.1 生理指标分析

随季节周期性变化进入深秋，兴安落叶松针叶发生明显衰老变化，肉眼可见针叶逐渐黄化直至最终脱落。研究发现，在10月份早衰型和晚衰型落叶松针叶不仅呈现出叶片变黄程度不同的现象（图1），其生理指标变化也有所不同：两种样本中变化最明

显的是叶绿素的降解，包括叶绿素 a 和叶绿素 b，总体来看，早衰型针叶的叶绿素 a、叶绿素 b 以及总叶绿素含量都显著低于晚衰型（图 2）。在植物的衰老过程中，作为细胞膜脂过氧化作用产物之一的丙二醛（malondialdehyde，MDA），其高含量会加剧细胞膜损伤从而加速衰老进程。而早衰型针叶 MDA 含量高于晚衰型针叶，表明其植物细胞中脂质过氧化程度也高于晚衰型。抗氧化酶包括超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）和过氧化氢酶（catalase，CAT），其活性检测结果显示：早衰型明显低于晚衰型，说明早衰型对活性氧（reactive oxygen species，ROS）的清除能力减弱了。因此，早衰型比晚衰型更早引发细胞氧化应激反应，发生细胞膜脂质过氧化、蛋白质变性、DNA 损伤等一系列细胞凋亡或坏死的现象。

以上结果表明，两种类型兴安落叶松秋季落叶前针叶颜色的不同是针叶细胞衰老进程处于不同时期造成的。



Y 和 G 分别为早衰型针叶（黄色）和晚衰型针叶（绿色）。A、B、C 分别为叶绿素含量、抗氧化酶活性、MDA 含量。**，$P < 0.01$，Student's t-test。

图 2　两种不同衰老进程的兴安落叶松针叶的生理指标检测

Fig. 2　Physiological indices of needles of two genotypes in *L. gmelinii* with different aging processes

2.2　蛋白质组分析

2.2.1　蛋白质组功能注释

为研究兴安落叶松针叶衰老的机理，对衰老表型不同的两种落叶松（Y 和 G）的针叶进行了蛋白质组分析。从检测到的 30 213 条肽段中鉴定出 28 498 条（94.32%）特异性肽段；对特异性肽段进行解析和定量发现，本次共检测到 5 022 个蛋白质，定量到 3 082 个蛋白质（表 3）。

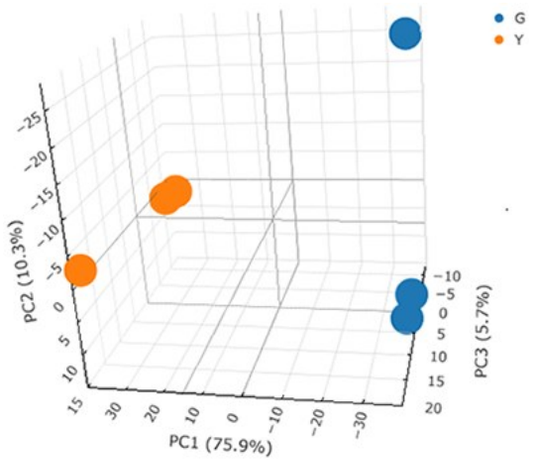
对兴安落叶松样本的定量蛋白质的三维主成分分析（图 3），图中的重复样本之间聚集程度较高，说明定量重复性较好，表明样本采集有效。其中，

表 3　兴安落叶松针叶的蛋白质组的蛋白质鉴定

Table 3　Protein identification from the proteome of needles in *L. gmelinii*

项目	数量
总谱图数	879 259
有效谱图数	134 112
总肽段数	30 213
特异肽段数	28 498
鉴定蛋白数	5 022
定量蛋白数	3 082

注：在谱图、肽段、蛋白三个层面的鉴定准确性 FDR 均设定为 1%，且鉴定蛋白至少需要包含一个特异性肽段。

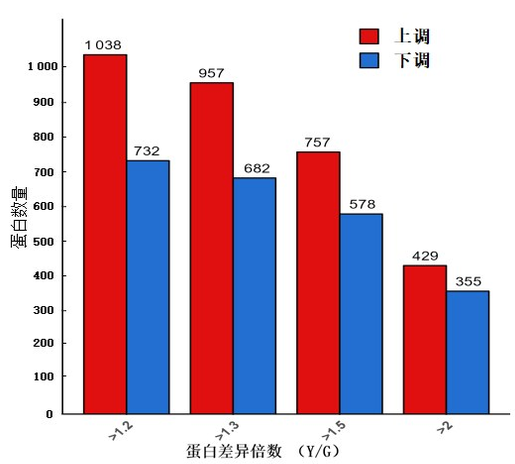


Y表示早衰型样本，G表示晚衰型样本。

图3 衰老蛋白质组的总体样本三维主成分分析（PCA）得分图

Fig. 3 The overall sample three-dimensional principal component analysis (PCA) score plot of the aging proteome

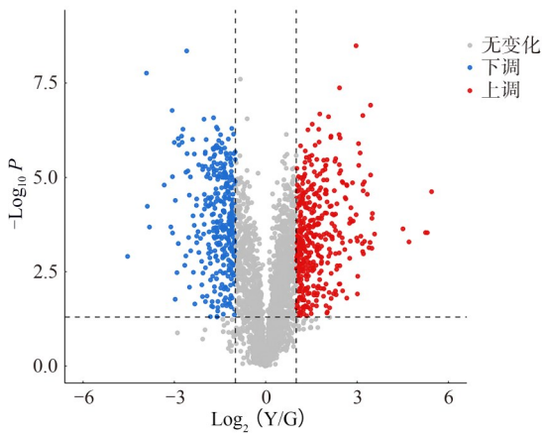
两种类型样本之间互相不聚集即存在显著差异，同时PCA1、PCA2和PCA3解释了约91.9%的总方差（图3）。以P≤0.05为标准，设定不同倍数界值来确定上调或下调的蛋白质（图4）：1.2倍时，可鉴定到共1 770个DEPs；1.3倍时，有957个上调，682个下调，共1 639个DEPs被鉴定出；1.5倍时，可鉴定到共1 335个DEPs，其中757个上调，578个下调。这些分析结果表明，秋季衰老表现为早衰型和晚衰型的兴安落叶松的蛋白质水平之间确实存在表达差异。本研究后续对差异表达倍数为2倍及以上的784个DEPs进行分析（图5），具体包含429个上调、355个下调DEPs。



Y/G表示YvsG的比对结果，G为对照组。

图4 衰老蛋白质组不同倍数DEPs数目统计

Fig. 4 Statistical analysis of differentially expressed proteins at different magnifications in the aging proteome



Y/G表示YvsG的比对结果，G为对照组。

图5 差异表达倍数2倍以上的蛋白火山图

Fig. 5 Volcano plots with differentially expressed proteins of 2 times or more

2.2.2 DEPs功能富集分析

2.2.2.1 GO分析

基因本体论（gene ontology，GO）可用来表述基因和基因产物的各个属性。我们对从早衰型和晚衰型中定量到的所有DEPs进行GO富集度统计学分类，从不同角度阐释蛋白的生物学作用。结果如图6所示：有1131个DEPs主要集中在细胞代谢过程、有机物质代谢过程、初级代谢过程和含氮化合物代谢过程等生物过程（图6-A）中；在细胞组成成分（图6-B）中，有1 244个DEPs主要集中在细胞内、细胞质和细胞器中；在分子功能（图6-C）中，112个DEPs主要集中在水解酶活性方面。

对DEPs进行亚细胞预测定位，结果表明：这些DEPs有44.9%分布在叶绿体中，22.7%分布在细胞质中，在细胞核和线粒体中则各占比13.27%和5.87%（图7）。本次亚细胞定位到784个DEPs，各部位具体分布数量如图7所示。

2.2.2.2 KEGG通路富集

KEGG（kyoto encyclopedia of genes and genomes）通路富集分析用于确定在已知的生物通路中DEPs是否存在显著富集的现象，从而揭示这些蛋白可能参与的主要生物学过程和信号通路。

研究运用Fisher's exact test进行KEGG通路富集分析，并通过气泡图可视化展示分析结果（图8）。如图8所示，DEPs主要富集的代谢通路有光合作用（map00195）、氨酰-tRNA生物合成（map00970）、精氨酸生物合成（map00220）和光合作用-天线蛋白（map00196）等。以上结果表明，在早衰落叶松中这些通路中的DEPs发生了显著性变化。

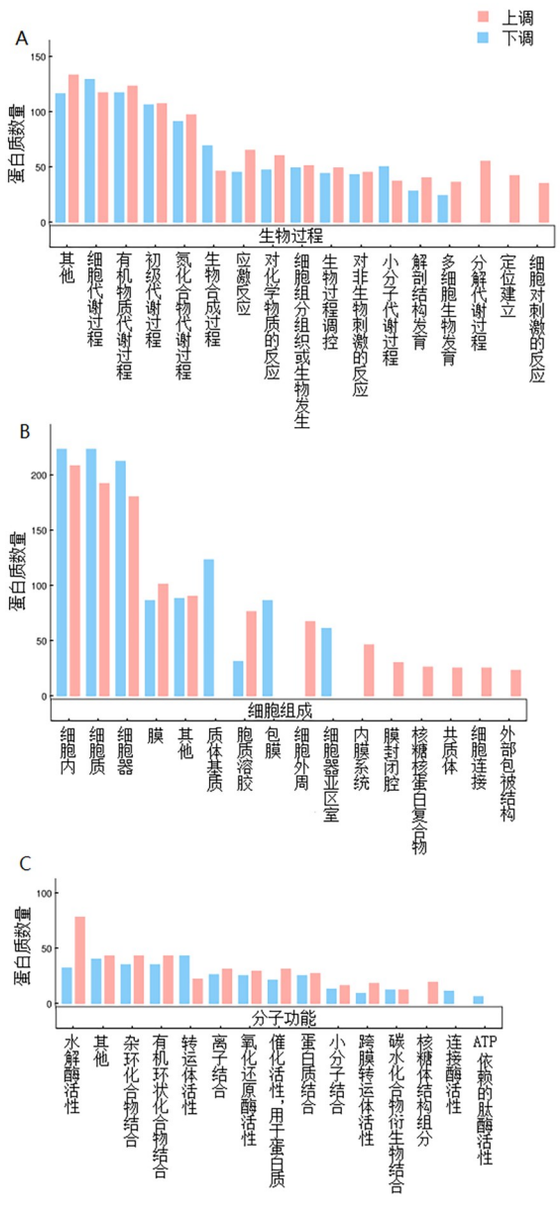


图 6　衰老蛋白质组的 DEPs GO 分析

Fig. 6　GO terms analysis of differentially expressed proteins in the aging proteome

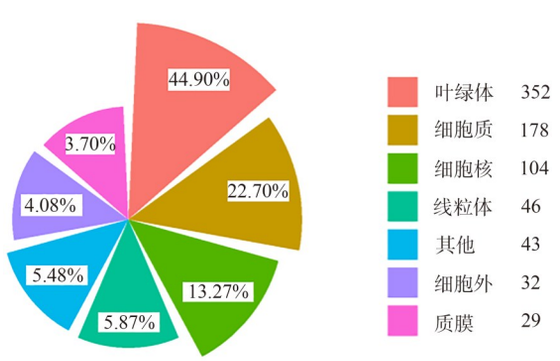


图 7　衰老蛋白质组的 DEPs 亚细胞定位

Fig. 7　Subcellular localization of differentially expressed proteins in the aging proteome

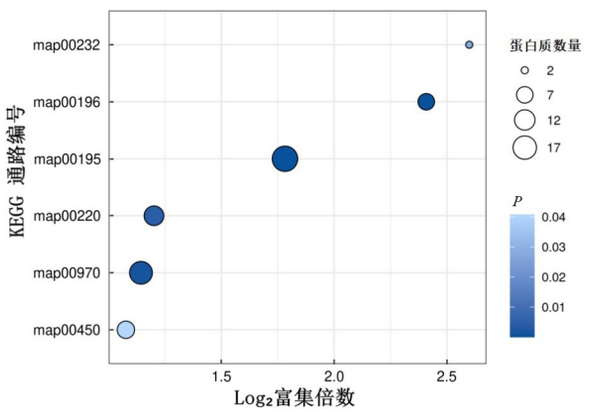


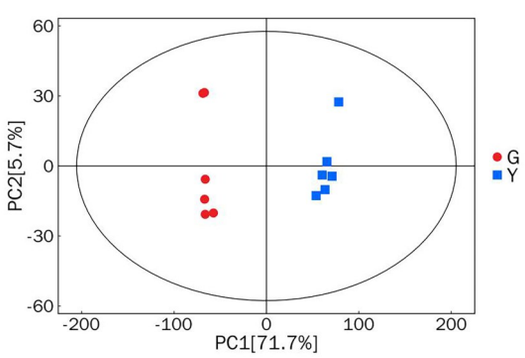
图 8　衰老蛋白质组的 DEPs 的 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 8　Bubble plot analysis of KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins in the aging proteome

2.3　代谢组分析

2.3.1　代谢组学数据质量评估

在非靶向代谢组学检测中，PCA 分析结果如图 9 所示，不同针叶样品在代谢水平存在明显差异，不同重复样本之间聚集程度高，且分布在不同区域，表明样品定量重复性较好。



Y 表示早衰型样本，G 表示晚衰型样本。

图 9　兴安落叶松针叶衰老代谢组 PCA 分析图

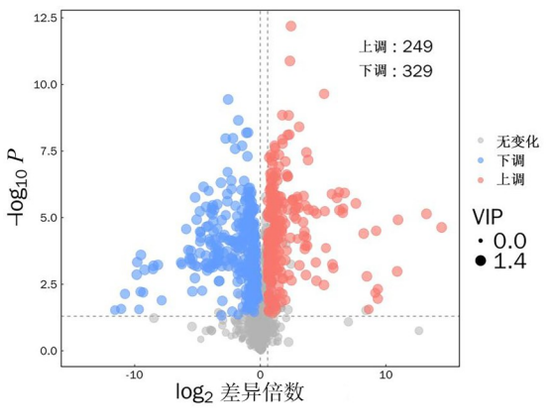
Fig. 9　PCA analysis of aging metabolome of *L. gmelinii* needles

2.3.2　差异代谢物分析

差异筛选条件设为 $P<0.05$，VIP>1 作为判定标准，FC>1.5 或 FC<1 来明确代谢物的上调或下调情况。如图 10 所示，从 19 060 种代谢物中鉴定出共计 578 个 DAMs，其中 249 个代谢上调，329 个代谢下调。

2.3.2.1　DAMs 层次聚类分析

为了阐明这些 DAMs 的差异，对其进行了层次聚类分析（图 11）：早衰型基因样本 Y 与晚衰型基因样本 G 的不同代谢物呈现出不同热度值，说明两组间确实存在代谢物表达水平差异。热图左侧对代



红色点代表上调表达的蛋白，蓝色点代表下调表达的蛋白，灰色点代表无明显差异的蛋白。

图10 差异倍数>1.5或差异倍数<1的代谢产物火山图

Fig. 10 Volcanic diagram of metabolites with FC>1.5 or FC<1

谢物基于表达模式进行了树形聚类，显示了表达模式相似的代谢物聚集在一起，说明这些代谢物在两组样本中的表达变化趋势具有相似性。

2.3.2.2 KEGG通路分析

对DAMs进行KEGG通路富集分析，如图12所示，DAMs主要富集在了代谢途径(map01100)、ABC转运体(map02010)、氨基酸生物合成(map01230)、氨酰-tRNA生物合成(map00970)及类黄酮生物合成(map00941)等通路中。而在ABC转运体(map02010)、氨酰-tRNA生物合成(map00970)、氨基酸生物合成(map01230)、黄酮生物合成(map00941)、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢(map00250)、亚油酸代谢(map00591)中富集最显著。以上结果表明，在早衰针叶中这些通路的DAMs发生了显著变化。

2.4 蛋白质组和代谢组联合分析

综合蛋白质组与代谢组学分析，共富集到1条共享的KEGG信号通路(图13)，为氨酰-tRNA生物合成通路(map00970)。该通路是细胞将氨基酸与tRNA连接，生成氨酰-tRNA的过程，是蛋白质合成起始的关键步骤。其中，脯氨酸(proline，Pro)、缬氨酸、苏氨酸、赖氨酸、天冬酰胺、酪氨酸(tyrosine，Tyr)、丝氨酸、甲硫氨酸(methionine，Met)等DAMs呈现上调趋势，而天冬氨酸(aspartic acid，Asp)、谷氨酸(glutamic acid，Glu)、苯丙氨酸(phenylalanine，Phe)等代谢物则呈现下调趋势。在蛋白质组中仅有酪氨酰-tRNA合成酶(TyrRS)呈现上调趋势，甘氨酰-tRNA合成酶、谷氨酰胺-tRNA合成酶、天冬酰胺-tRNA合成酶、丝氨酰-tRNA合成酶、赖氨酰-tRNA合成酶、组氨酰-tRNA合成酶、苯丙氨酰-tRNA合成酶、甲硫氨酰-tRNA合成酶、异亮氨酰-tRNA合成酶、丙氨酰-tRNA合成酶、色氨酰-tRNA合成酶和缬氨酰-tRNA合成酶均呈现下调趋势(图14)。

3 讨论

本研究针对兴安落叶松针叶衰老过程的其蛋白质组和代谢组展开了深入分析。研究期间，共鉴定出5 022种蛋白质和19 060种代谢物。进一步研究后，发现了784种DEPs和578种DAMs。这表明在兴安落叶松针叶衰老的调控过程中，蛋白质翻译



Y表示早衰型样本，G表示晚衰型样本。

图11 DAMs的层次聚类分析热图

Fig. 11 Hierarchical clustering analysis heatmap of DAMs

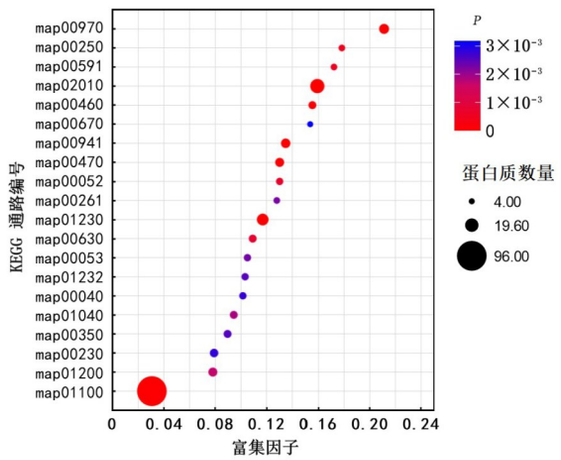


图 12　DAMs 的 KEGG 通路富集分析气泡图

Fig. 12　Bubble plot of DAMs by KEGG pathway enrichment analysis

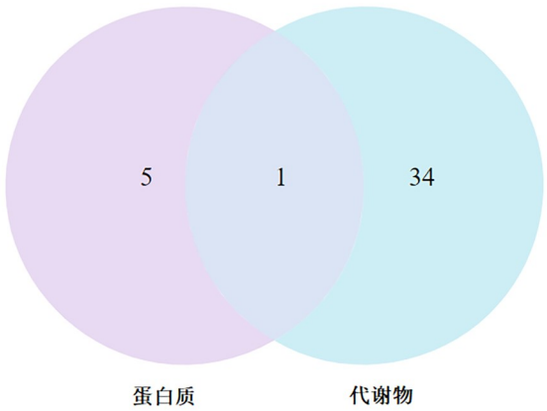
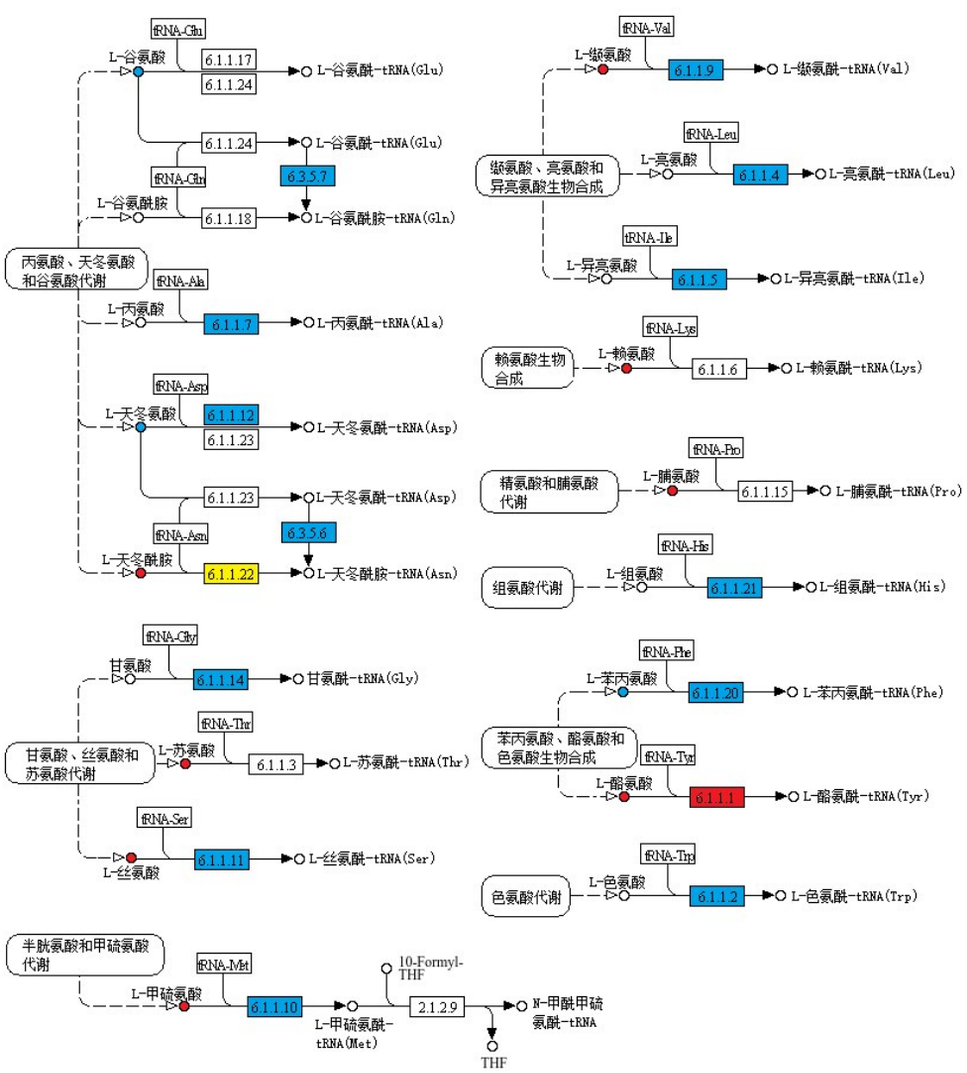


图 13　DEPs 和 DAMs 的 KEGG 信号通路韦恩图

Fig. 13　Venn diagram of KEGG signaling pathway of DEPs and DAMs



红色表示上调,蓝色表示下调,黄色表示这类酶既表达上调又表达下调。

图 14　氨酰-tRNA 生物合成的调控通路图

Fig. 14　Regulatory pathway of aminoacyl-tRNA biosynthesis

与代谢物水平确实存在显著差异。

我们选取的两棵落叶松地理位置相邻，生长环境相同，可排除光照、温度、土壤、湿度、气体等外界因素导致的针叶表型不同；早衰的黄色针叶中叶绿素a、叶绿素b和总叶绿素的含量显著低于晚衰落叶松的绿色针叶的含量，说明两棵落叶松处于不同的生理状态；同时，鉴定到早衰黄色针叶与晚衰绿色针叶中存在DEPs和DAMs。以上结果均能说明研究对象在落叶前针叶颜色的不同是两种类型落叶松处于衰老进程的不同时期造成的，说明这两棵兴安落叶松的针叶是研究裸子植物落叶乔木衰老的理想材料。

KEGG通路富集分析结果显示，DEPs主要富集在氨酰-tRNA生物合成、精氨酸生物合成以及光合作用相关通路上，而DAMs除了在代谢途径、ABC转运体通路富集外，同DEPs一样，在氨基酸生物合成、氨酰-tRNA生物合成等通路中显著富集。其中的氨酰-tRNA生物合成通路是蛋白质合成的关键环节[20]，其活跃程度直接影响蛋白质的合成效率和准确性。蛋白质组和代谢组分析同时指向该通路，则表明早衰落叶松针叶细胞中蛋白质合成相关生理活动有显著变化。图14展示了兴安落叶松针叶衰老进程的氨酰-tRNA生物合成的调控通路中的上调下调情况。其中，Asp[21]和Glu[22]是参与三羧酸循环和氮代谢的重要氨基酸，其下调反映了细胞能量代谢或氮代谢的变化。在衰老过程中，植物的代谢活动逐渐减弱，对氮源和碳源的需求减少[23]，因此参与相关代谢途径的Asp和Glu的合成可能受到抑制，导致其含量下调。Met表达上调可能与基因表达调控和蛋白质修饰的甲基化有关[24]；Pro在植物中与渗透调节、抗氧化防御等生理过程相关，其上调有助于植物在衰老过程中维持细胞的正常生理功能，增强植物对逆境的耐受性[25]。Phe是合成木质素[26]、黄酮类[27]等次生代谢物质的重要原料。黄酮类化合物通过清除活性氧缓解氧化损伤来应对逆境胁迫[28]。

蛋白组和代谢组的KEGG通路交集仅有一条通路，可能受以下多种因素影响。首先，许多蛋白质并不是直接作用于代谢途径中的酶，而是作为转录因子、信号转导分子等间接影响代谢过程[29]。因此，即使某些蛋白质的表达发生了变化，也不会立即导致相应代谢物水平发生明显变化。其次，蛋白质的功能和丰度会受到翻译后修饰等过程的影响[30]，而代谢物的产生受到酶活性、底物浓度、代谢途径的反馈调节等多种因素的制约[31]。并且，生物体内的代谢过程和蛋白质表达是一个动态变化的过程，在不同的生理状态、发育阶段以及环境因素的影响下，代谢组和蛋白组都会发生相应的变化[32]。因此，调控机制复杂性和生物系统动态性是导致在某一时间点检测的代谢组和蛋白组KEGG通路交集较少的原因。

值得注意的是，DAMs中Tyr含量呈现上调趋势，结合TyrRS同样呈现的上调，说明细胞对Tyr需求量升高的同时，还提高了含有Tyr的蛋白质的合成。有研究表明，植物在衰老过程中蛋白质的Tyr硝化作用加剧，且Tyr硝化后酶的活性受到抑制，揭示了蛋白质Tyr硝化与植物衰老过程中碳氮代谢、氧化还原调节以及氧化应激反应有关[33]。Zhu等[34]研究还发现了Tyr含量在拟南芥黑暗诱导衰老过程中呈动态变化，在黑暗处理后期，Tyr有能通过降解途径为TCA循环提供底物，并为线粒体电子传递链提供电子等重要作用。结合蛋白质组和乙酰修饰组的分析结果来看[35]，本研究中的Tyr含量升高可能与早衰落叶松TCA循环作用加强是有关联的。

综上所述，本研究证明了落叶松针叶衰老中蛋白组和代谢组发生着显著变化，丰富了关于植物叶片衰老的蛋白质组学数据，为兴安落叶松的潜在育种价值和经济效益提供指导依据。

4 结论

本研究共鉴定出784种DEPs和578种DAMs。DEPs主要富集在光合作用、氨酰-tRNA生物合成、精氨酸生物合成等通路。DAMs主要富集在代谢途径、ABC转运体、氨基酸生物合成、氨酰-tRNA生物合成及类黄酮生物合成等通路中。综合蛋白质组与代谢组学分析结果，共同富集通路为氨酰-tRNA生物合成通路。以G为对照组，其中，DAMs中的Pro、Tyr、Met等呈现上调，而Asp、Glu、Phe等代谢物呈现下调。在DEPs中仅有TyrRS呈现上调趋势。以上规律同乙酰修饰组的分析结果基本一致。

参考文献：

[1] 李合生，王学奎. 现代植物生理学[M]. 4版. 北京：高等教育出版社，2019.

[2] DING J H，WANG K J，PANDEY S，et al. Molecular advances in bud dormancy in trees [J]. Journal of Experi-

mental Botany,2024,75(19):6063-6075.

[3] 李中海,郭永峰,任国栋,等. 叶片衰老研究进展[J]. 植物生理学报,2023,59(9):1627-1656.

[4] LIU P,ZHANG S B,ZHOU B,et al. The histone H3K4 demethylase JMJ16represses leaf senescence in Arabidopsis[J]. The Plant Cell,2019,31(2):430-443.

[5] YANG B,TAN Z D,YAN J Y,et al. Phospholipase-mediated phosphate recycling during plant leaf senescence[J]. Genome Biology,2024,25(1):199.

[6] FORTUIN S, SOARES N C. The integration of proteomics and metabolomics datapaving the way for a better understanding of the mechanisms underlying microbial acquireddrug resistance[J]. Frontiers in Medicine,2022,9:849838.

[7] LIHAVAINEN J,ŠIMURA J,BAG P,et al. Salicylic acid metabolism and signalling coordinate senescence initiation in aspen in nature[J]. Nature Communications,2023,14:4288.

[8] HAN Y L,GE H T,XU C Z,et al. Glycosyltransferase Slr1064 regulates carbon metabolism by modulating the levels of UDP-GlcNAc in *Synechocystis* sp. PCC 6803[J]. New Phytologist,2024,243(3):936-950.

[9] LI J K,ESSEMINE J,SHANG C,et al. Combined proteomics and metabolismanalysis unravels prominent roles of antioxidant system in the prevention of alfalfa (*Medicago sativa* L.) against salt stress[J]. International Journal of MolecularSciences,2020,21(3):909.

[10] 张学科,毛子军,宋　红,等. 五种落叶松遗传关系的等位酶分析[J]. 植物研究,2002,22(2):224-230.

[11] 陈光华. 落叶松扦插育苗技术研究进展[J]. 辽宁林业科技,2022(3):68-70.

[12] 石　亮,舒　洋,张　波,等. 不同龄组兴安落叶松林枯落物的水文效应[J]. 水土保持通报,2016,36(5):91-95.

[13] MEN L N,YAN S C,LIU G J. *De novo* characterization of *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr. transcriptome and analysis of its gene expression induced by jasmonates[J]. BMC Genomics,2013,14:548.

[14] 王泽儒,马　超,丁紫妍,等. 热处理对华北落叶松人工林木材力学性能和颜色的影响研究[J]. 林业与生态科学,2022,37(4):403-407+417.

[15] 赵立志. 长白落叶松和杂种落叶松木材干缩性、湿胀性研究[J]. 林业科技,2023,48(4):60-62.

[16] 余梦洁,杨永福,王天龙,等. 微爆破预处理对落叶松干燥脱脂效果的影响[J]. 木材加工机械,2011(6):11-14.

[17] 杨　帆,霍志伟,朱　雯,等. 超高压辅助胶束法提取落叶松中二氢槲皮素的工艺优化[J]. 食品工业科技,2023,44(23):175-183.

[18] 刘化亭,刘宝伦,孙茂川,等. 落叶松工业原料林经济效益分析[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报,2008,21(5):82-83.

[19] 陈风杰. 松柏类植物景观调查研究[D]. 杭州:浙江农林大学,2017.

[20] CRAMER F,ENGLISCH U,FREIST W,et al. Aminoacylation of tRNAs as critical step of protein biosynthesis[J]. Biochimie,1991,73(7/8):1027-1035.

[21] KIRMA M, ARAÚJO W L, FERNIE A R, et al. The multifaceted role of aspartate-family amino acids in plant metabolism[J]. Journal of Experimental Botany,2012,63(14):4995-5001.

[22] LIAO H S, CHUNG Y H, HSIEH M H. Glutamate: a multifunctional amino acid in plants[J]. Plant Science,2022,318:111238.

[23] TEJERA M, BOERSMA N N, ARCHONTOULIS S V, et al. Photosynthetic decline in aging perennial grass is not fully explained by leaf nitrogen[J]. Journal of Experimental Botany,2022,73(22):7582-7595.

[24] SZEGŐ D, KÓSA E, HORVÁTH E. Role of S-methylmethionine in the plant metabolism[J]. Acta Agronomica Hungarica,2007,55(4):491-508.

[25] 谢　虹,杨　兰,李忠光. 腩氨酸在植物非生物胁迫耐性形成中的作用[J]. 生物技术通报,2011,27(2):23-27+60.

[26] FEDURAEV P, SKRYPNIK L, RIABOVA A, et al. Phenylalanine and tyrosine as exogenous precursors of wheat (*Triticum aestivum* L.) secondary metabolism through PAL-associated pathways[J]. Plants, 2020,9(4):476.

[27] YANG L, LI W C, FU F L, et al. Characterization of phenylalanine ammonia-lyase genes facilitating flavonoid biosynthesis from two species of medicinal plant *Anoectochilus*[J]. PeerJ,2022,10:e13614.

[28] SCHULZ E, TOHGE T, ZUTHER E, et al. Flavonoids are determinants of freezing tolerance and cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*[J]. Scientific Reports,2016,6:34027.

[29] LIU H Q, CHEN X, WANG H L, et al. ZBTB17/MIZ1 promotes peroxisome biogenesis by transcriptional regulation of PEX13[J]. The Journal of Cell Biology,2025,224(6):e202407198.

[30] HUANG F,LUO X,OU Y,et al. Control of histone de-

methylation by nuclear-localized α-ketoglutarate dehydrogenase[J]. Science,2023,381(6654):eadf8822.

[31] 李洁琼,郑世学,喻子牛,等. 乙酰辅酶A羧化酶:脂肪酸代谢的关键酶及其基因克隆研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2011,17(5):753-758.

[32] LIANG H P,XU Y,SAHU S K,et al. Chromosome-level genomes of two Bracteacoccaceae highlight adaptations to biocrusts[J]. Nature Communications,2025,16:1492.

[33] BEGARA-MORALES J C,CHAKI M,SÁNCHEZ-CALVO B,et al. Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence[J]. Journal of Experimental Botany,2013,64(4):1121-1134.

[34] ZHU F,ALSEEKH S,KOPER K,et al. Genome-wide association of the metabolic shifts underpinning dark-induced senescence in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell,2022,34(1):557-578.

[35] ZHANG X T,SHAN J Y,WANG J X,et al. Comprehensive proteome andacetylome analysis of needle senescence in Larix gmelinii[J]. International Journal of Molecular Sciences,2024,25(13):6824.

(上接第14页)

[13] 胡 洁,石凤翎,高翠萍. 紫羊茅空间诱变SP_1代单株材料田间农艺性状的变异分析[J]. 中国草地学报,2022,44(8):46-51.

[14] 郎 红,赵云昊,姜明亮. 航天诱变育种在园艺作物中的应用进展[J]. 北方园艺,2024(14):135-141.

[15] 匡 倩,宗亚倩,杨 文,等. 空间诱变对'德钦'紫花苜蓿农艺性状和营养品质的影响[J]. 草地学报,2024,32(6):1962-1967.

[16] 耿 慧,刘 建,于博洋,等. 航天诱变紫花苜蓿新品系比较试验研究[J]. 东北农业科学,2024,49(3):53-57.

[17] 胡继丹,董丽华,朱卫丰,等. 航天诱变葛麻姆SP1代群体遗传变异分析[J]. 中国中药杂志,2024,49(14):3736-3748.

[18] 胡 冰,陈朝黎,陈天笑,等. 航天诱变对四种木本花卉容器苗生长与生理特性的影响[J]. 核农学报,2023,37(11):2107-2116.

[19] 尹 琼,陈 超,吴佳海,等. 航天诱变黔草1号高羊茅分子多样性研究[J]. 种子,2023,42(10):99-104.

[20] 徐宗昌,鲁雪莉,魏云冲,等. 航天诱变野大豆SP1群体苗期耐盐性鉴定与评价[J]. 草业学报,2023,32(11):168-178.

[21] 孟长军,惠 姗,刘小雨,等. 第4代航天诱变鸡冠花种子特性与萌发[J]. 广西林业科学,2024,53(2):231-235.

[22] 王 芬,石凤翎,张雨桐,等. 太空搭载对扁蓿豆种子萌发及植株生长的影响[J]. 草原与草业,2021,33(2):15-20.

[23] 吉克呷呷,杨德琪,谢三作,等. 航天搭载小麦株高突变体研究初探[J]. 农业科技通讯,2021(1):54-55+61.

[24] 李梦达,李向东,牛洪斌,等. 小麦品种抗旱性与深根性和深层根系活性的关系[J]. 麦类作物学报,2017,37(5):666-672.

[25] 蔡 璐,舒健虹,吴佳海,等. 高羊茅航天诱变种质SSR分析[J]. 贵州农业科学,2015,43(10):33-38.

[26] 王建丽,申忠宝,潘多锋,等. 航天搭载紫羊茅SP2代农艺性状诱变效应研究[J]. 北方园艺,2015(1):63-67.