论文

酸化茶园茶树根际土壤微生物蛋白质代谢
图谱构建王海斌^{1,2†}, 王裕华^{1†}, 张奇^{2,3}, 林舜贤^{1,2}, 张清旭^{1,2}, 叶江华^{2,3}, 丁力¹, 林生², 何海斌^{2*}

1. 龙岩学院生命科学学院, 龙岩 364012;

2. 福建农林大学生命科学学院/农业生态研究所, 福建省农业生态过程与安全监控重点实验室(福建农林大学), 福州 350002;

3. 武夷学院茶与食品学院, 武夷山 354300

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: alexhbb@163.com

收稿日期: 2020-03-23; 接受日期: 2020-05-12; 网络版发表日期: 2020-06-02

中国博士后科学基金(批准号: 2016M600493)、国家重点研发计划专项(批准号: 2017YFE0121800)、农业部948项目(批准号: 2014-Z36)、闽台作物特色种质创制与绿色栽培协同创新中心(闽教科(2015)75号)、福建省自然科学基金青年基金(批准号: 2017J05057)、福建省杰出科研人才培育计划项目和龙岩学院拔尖人才培育计划项目(批准号: 2019JZ19)资助

摘要 土壤是茶树生长的载体, 在我国茶园普遍存在土壤酸化现象, 但是土壤微生物如何响应土壤酸化以及如何影响茶树生长还鲜有报道. 本研究以不同酸度的铁观音茶树种植土壤为材料, 分别提取茶树根际土壤微生物蛋白质, 采用数据依赖采集(data dependent acquisition, DDA)技术建立茶树根际土壤微生物蛋白质数据库, 并采用数据非依赖采集(data independent acquisition, DIA)技术定量分析土壤微生物蛋白质, 获得不同酸度茶树根际土壤丰度降低的蛋白质并对其进行功能分析, 构建了茶树根际土壤蛋白质组代谢调控图谱. 结果表明, 茶树根际土壤共检测到微生物蛋白质2741种, 分子量主要分布在2.64~338.33 kD之间, pI主要分布在3.78~12.15之间. 蛋白质定量分析结果表明, 不同酸度茶树根际土壤中共有54种微生物蛋白质丰度下降, 按其功能主要可分为遗传信号蛋白、能量代谢信号蛋白、土壤抗氧化信号蛋白、土壤养分循环信号蛋白. 基于此结果构建的土壤微生物蛋白质组代谢调控图谱表明, 随着茶园土壤酸化加剧, 土壤微生物为了生存, 释放群体感应蛋白质, 激发信号蛋白质的表达; 在信号通路蛋白质的调控下, 信号蛋白质激发不同代谢途径的特定信号蛋白质表达, 进而调控不同代谢途径中的蛋白质表达, 而这种表达是下调式的; 最终导致微生物能量代谢循环能力下降, 繁殖能力降低, 数量减少. 微生物数量及功能的变化导致土壤养分循环能力减弱, 茶树在养分吸收上受阻, 进而引起茶树生长受阻, 以及茶叶产量和品质下降.

关键词 茶树, 土壤酸化, 土壤微生物蛋白质, 代谢调控

我国茶园土壤普遍存在酸化现象, 近年来酸化程度逐渐加剧^[1~3]. 2012年江苏茶园土壤pH低于4.0的占

42.8%, pH在4.0~4.5的占38.1%^[4]; 2012年浙江茶园表层土壤pH最低在4.0, 并有明显的深层化趋势^[5]; 2016

引用格式: 王海斌, 王裕华, 张奇, 等. 酸化茶园茶树根际土壤微生物蛋白质代谢图谱构建. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 849–865
Wang H B, Wang Y H, Zhang Q, et al. Construction of the microbial protein metabolism map of tea rhizosphere soil in acidified plantations (in Chinese).
Sci Sin Vitae, 2020, 50: 849–865, doi: 10.1360/SSV-2020-0008

年, 江西203个茶园土壤pH平均为4.65, 最低3.51, 其中低于4.5的土壤占43%^[6].

福建省泉州市安溪县拥有茶园面积4万余公顷, 已连续7年蝉联中国茶叶流通协会统计公布的100个全国重点产茶县第一位, 是全国最大的产茶县. 2010年, 福建107个茶园, 土壤pH值在4.5以下的占86.9%, 其中pH值低于4.0的占28%^[7]. 前期研究表明, 安溪县茶园土壤酸化严重, 酸化导致茶叶的产量和品质呈下降趋势. 这种现象的形成与茶树根际土壤酸化导致的根际土壤微生物区系数量变化、微生物种类、结构及功能变化等存在密切关系^[8-15]. 然而, 茶园土壤酸化后, 酸化是如何调控土壤微生物变化, 土壤微生物又是如何响应; 微生物之间是如何实现通信, 进而改变土壤的生态结构, 影响茶树的生长, 均未明晰.

蛋白质是生命功能的体现者, 利用土壤宏蛋白质组学技术可以研究任何与微生物代谢相关的土壤现象, 如土壤结构形成, 土壤污染等导致的土壤退化, 以及有机质降解等相关的碳、氮等生态元素循环等. 环境变化通常会导致土壤内生物体功能作出反应, 可通过检测土壤蛋白质组分的变化, 寻找与环境变化相关的蛋白点, 并以此为生物标志物, 监测土壤质量的变化^[16,17]. 然而, 鉴于土壤蛋白质提取的难度较大, 目前尚未有学者利用土壤宏蛋白质组学对茶园土壤进行研究. 为了进一步了解土壤微生物如何感知与应对茶园土壤酸化的模式, 本文在前期研究基础上^[8-15], 选择同一区域不同酸度的铁观音茶园茶树根际土壤为材料, 采用数据依赖采集(data dependent acquisition, DDA)技术构建茶树根际土壤微生物蛋白质数据库, 采用数据非依赖采集(data independent acquisition, DIA)技术定量分析土壤微生物蛋白质表达量变化, 获得了差异土壤微生物蛋白质并获得其功能, 意在构建酸化茶园的土壤微生物蛋白质组代谢调控图谱, 明晰茶园退化、

茶树生长的负调控机制, 为进一步开展退化茶园的生态修复提供研究基础.

1 材料与方法

1.1 实验材料

在前期研究的基础上^[8], 选择福建省泉州市安溪县龙涓乡珠塔村华祥苑茶庄园(东经117°93', 北纬24°97')为研究地. 2016年定点标号S1(未种植茶树)、S2(已种植茶树4年)、S3(已种植茶树9年)、S4(已种植茶树30年)的茶园为研究点, 均为平地茶园, 面积均为500 m². 移除种植的茶树, 将土层深度0~50 cm的土壤重新翻耕混匀使其土壤基本较为一致, 以每10 m²为一个取样点进行土壤pH值测定, 取样土层深度0~50 cm, 获得不同样点的土壤pH值分别为: S1样点5.62、S2样点5.46、S3样点4.56、S4样点3.39. 土壤的基本理化指标见表1.

2016年4月重新种植1年生茶树, 种植设计见图1, 具体为, 每个茶园面积500 m²(长25 m×宽20 m), 分成6行, 每行长25 m, 宽2 m. 2016年4月, 种植1年生铁观音茶苗, 每行4排, 每排100株, 共400株, 每个样地种植2400株茶苗. 于2018年5月收集不同酸度土壤样点的茶树根际土壤, 用于土壤蛋白质的提取. 土壤取样采用对角线5点取样法, 具体为, 选择合适的茶树, 去除表层落叶, 轻挖整棵茶树, 除去茶树根周边附着土壤, 抖落离茶树根系的土壤, 去除茶树根际, 过筛后即根际土壤, 各样品的取样量约为200 g, 三个重复.

1.2 土壤微生物蛋白质提取

参考Wang等人^[18]的方法, 提取不同酸度样点茶树根际土壤蛋白质. 简述为: 土壤样品1 g, 加5 mL的SDS-蛋白提取液(含1.25%的SDS; 0.1 mol/L的Tris-HCl; pH

表 1 不同酸度土壤的基本理化指标

Table 1 Basic physicochemical indices of soils with different acidity

标号	pH值	总氮(g/kg)	总磷(g/kg)	总钾(g/kg)	有效氮(mg/kg)	有效磷(mg/kg)	有效钾(mg/kg)
S1	3.39±0.05d	2.58±0.06a	1.29±0.15a	1.64±0.15a	28.35±0.32a	54.29±1.69a	272.38±3.21a
S2	4.56±0.11c	2.53±0.09a	1.25±0.13a	1.68±0.12a	27.68±0.46a	53.48±1.37a	269.24±4.56a
S3	5.46±0.03b	2.52±0.12a	1.31±0.12a	1.71±0.14a	28.14±0.38a	55.23±1.28a	273.51±3.29a
S4	5.62±0.04a	2.57±0.14a	1.28±0.13a	1.66±0.09a	27.93±0.47a	54.37±1.35a	270.32±4.15a

a,b,c,d分别表示不同标号土壤的测量值采用最小显著差异法比较后, 在P<0.05水平上的显著差异

图 1 茶树种植示意图

Figure 1 Diagram of planting tea tree

6.8, 20 mmol/L的DTT), 漩涡振荡1 h. 混合液4℃下13400×g离心25 min, 取上清过0.45 μm的滤膜, 滤液中加入2 mL Tris-平衡酚(pH 8.0), 漩涡振荡30 min(期间冰上静置10 min). 4℃下13400×g离心25 min, 取上层水相于一新的离心管中保存.

取土壤样品1 g, 加5 mL的柠檬酸-蛋白提取液(含0.25 mol/L柠檬酸钠, pH 8.0), 漩涡振荡3 h. 混合液4℃下13400×g离心25 min, 取上清过0.45 μm的滤膜, 滤液中加入2 mL Tris-平衡酚(pH 8.0), 漩涡振荡30 min(期间冰上静置10 min). 4℃下13400×g离心25 min, 取上层水相于一新的离心管中保存.

将经柠檬酸-蛋白提取液及SDS-蛋白提取液提取的蛋白溶液混合, 加入6倍体积的0.1 mol/L预冷的甲醇-醋酸铵(3.8542 g乙酸铵, 500 mL甲醇)溶液, 置于-20℃静置过夜. 离心分离析出的蛋白质, 用预冷的甲醇和丙酮溶液依次洗涤, 真空干燥成干粉, 于-20℃保存备用.

1.3 土壤微生物蛋白质的DDA数据采集

各取100 μg蛋白样本使用FASP法^[19]进行蛋白质酶解, 将酶解后获得的多肽样本各自取出部分样本混匀后使用DDA技术进行数据采集, 采集结果作为构建数据库使用.

采用高效液相色谱分离法分离土壤微生物蛋白质并构建数据库. 具体操作如下, 高效液相色谱仪(Thermo Fisher Scientific, 美国), 色谱柱(C18, 3 μm, 100 Å, 75 μm×15 cm), 上样量9 μL. 流动相A为0.1% 甲酸水溶液; B为0.1%甲酸+80%乙腈水溶液, 时间90 min. 色谱

梯度为: 0~16 min, 95%A:5%B; 16~66 min, 90%A:10%B; 66~82 min, 70%A:30%B; 82~83 min, 55%A:45%B; 83~90 min, 5%A:95%B. 流速600 nL/min.

质谱参数为: 质谱仪(Thermo Fisher Scientific), 喷雾电压(2.2 kV), 毛细管温度(320℃), S-lens RF Level (60), 分辨率设置(一级120000@m/z 200, 二级30000@m/z 200), 母离子扫描范围(m/z 400~1200), 子离子扫描范围(start from m/z 100), MS1 AGC(3e6)、离子注入时间(20 ms), MS2 AGC(1e6)、离子注入时间(50 ms), 离子筛选窗口(2.0 m/z), 碎裂模式为高能碰撞解离, 碰撞能量27, 数据依赖质谱检测器(Top 20), 动态排除时间(20 s).

1.4 土壤微生物蛋白质定量的DIA数据采集

不同样品各取100 μg蛋白样本使用FASP法^[19]进行蛋白质酶解(同上). 分别采用DIA进行数据采集, 采集的数据结合数据库用于定量分析. 为了进一步准确地对各个样本中的蛋白质进行定量分析, 排除液相二级质谱系统带来的定量误差, 各个样本中均掺入了等量的11条人工合成的多肽, 这些多肽是天然中不存在的, 理论上各个样本中这11条多肽的色谱保留时间以及质谱信号响应是完全一致的, 因而可以利用这11条多肽的信息对定量结果进行归一化处理, 以达到提高定量准确性的目的^[20].

液相色谱的具体参数同上, 质谱参数为: 质谱仪(Thermo Fisher Scientific), 喷雾电压(2.2 kV), 毛细管温度(320℃), S-lens RF Level(60), 分辨率设置(一级60000@m/z 200, 二级30000@m/z 200), 母离子扫描范

围(m/z 400~1200), 子离子扫描范围(start from m/z 100), MS1 AGC($3e6$)、离子注入时间(20 ms), MS2 AGC($1e6$)、离子注入时间(45 ms), 离子筛选窗口数目 29个(表2), 碎裂模式为高能碰撞解离, 碰撞能量为30.

1.5 数据分析与处理

使用国际通用的蛋白质组学分析软件Proteome Discoverer2.1对DDA采集的数据进行蛋白质鉴定分

表 2 离子筛选窗口

Table 2 Ion screening window

初始质荷比 (m/z)	终止质荷比 (m/z)	隔离窗口质荷比 (m/z)
400	420	20
420	440	20
440	460	20
460	480	20
480	500	20
500	520	20
520	540	20
540	560	20
560	580	20
580	600	20
600	620	20
620	640	20
640	660	20
660	680	20
680	700	20
700	720	20
720	740	20
740	760	20
760	780	20
780	800	20
800	840	40
840	880	40
880	920	40
920	960	40
960	1000	40
1000	1050	50
1050	1100	50
1100	1150	50
1150	1200	50

析, 鉴定结果作为DIA定量数据库, 检索数据库采用uniprot网站下载的Fungus和Bacteria数据库(Fungus为Swissprot与Trembl全库, Bacteria为Swissprot库, 数据库中加入了11条人工合成多肽的氨基酸序列信息), 搜索引擎使用Sequest HT, 同时为了去除假阳性结果, 数据检索采用正反库检索策略, 检索结果在多肽层次以及蛋白层次均采用了 $FDR \leq 1\%$ 的筛选条件. 数据库检索参数如表3.

使用目前通用的Spectronaut软件将上述DDA采集的数据构建为定量数据库, 然后将采集的四个样本的DIA原始数据与该定量数据库进行比对, 抽提各个蛋白质的Unique peptide的定量色谱峰面积, 以此作为蛋白质的相对丰度表征, 并对各个样本中的蛋白质丰度进行比较, 筛选差异表达蛋白. 文中其余数据的方差分析采用DPS数据处理系统.

2 结果与分析

2.1 土壤微生物蛋白质全谱扫描

如图2所示, DDA与DIA数据采集的总离子流色谱图(total ions chromatograph, TIC)的光谱处于整个梯度和全谱峰, 基峰有许多色谱峰, 分布均匀; Base Peak色谱峰众多, 分布均匀, 色谱分离效果较高, 且样本组成较为复杂, 主要色谱峰保留时间比较一致. 说明色谱分离效率高, 样品组成复杂, 主色谱峰的保留时间相对一致, 可以保证鉴定结果的准确性. 茶树根际土壤蛋白质鉴定结果表明, 茶树根际土壤共鉴定到2741种蛋白质, 分子量主要分布在2.64~338.33 kD之间, pI主要分布在3.78~12.15之间(见网络版附表S1).

表 3 数据库检索参数

Table 3 The retrieval parameters of database

项目	参数值
Enzyme	Trypsin
Miss Cleavages	2
Variable modifications	Oxidation (M), Deamidated (N, Q)
Fixed modifications	Carbamidomethyl (C)
Peptide Mass Tolerance	± 10 ppm
Fragment Mass Tolerance	± 0.02 Da
Peptide FDR	Less than 1%
Protein FDR	Less than 1%

图 2 茶树根际土壤微生物蛋白质数据库构建与定量图谱(网络版彩图)
Figure 2 Establishment and quantitative mapping of database of tea rhizosphere soil microbial proteins (color online)

2.2 土壤微生物蛋白质鉴定与分析

土壤微生物蛋白质采用DIA进行全谱定量分析(图3), 不同酸度土壤微生物蛋白质定量数据的聚类分析结果表明(表4), S1(pH 5.62)和S2(pH 5.46)样点的蛋白质丰度与种类最为相似, 其次为(pH 4.56), 最后为S4(pH 3.39), 可见不同酸度土壤的微生物蛋白质丰度与种类发生了变化。不同酸度茶树根际土壤共鉴定到与酸度呈正相关微生物蛋白质54种。其中, 54种蛋白质在S1、S2样点土壤中均被检测到, 在S3土壤样点中检测到45种蛋白质, 在S4样点土壤中检测到43种蛋白质。可见, 随着茶树种植土壤酸度的加剧, 茶树根际土壤微生物蛋白质表达量发生了一定的变化。

2.3 土壤微生物蛋白质的功能分析

与土壤酸度呈正相关的54种微生物蛋白质功能分析结果表明(表5), 54种蛋白质分别参与不同的代谢途径且蛋白质丰度呈下降趋势。具体的蛋白质及其功能为: 参与TCA循环的蛋白质3种(V5G1W3, L0M580, P74582), 参与磷酸戊糖途径的蛋白质3种(A0A0L0H3J9, L0M6T6, B5XY03), 参与糖酵解途径的蛋白质2种(L0M0Z0, L0MJP7), 参与遗传物质代谢的蛋白质3种(Q5PLR9, P0AFL8, Q8X8H6), 参与遗传转录的蛋白质1种(P0AGJ6), 参与细胞信号转导传递蛋白质6种(A0A0L0H0U9, P0AAF9, A0A0L0GMV2, A0A0L0GXG9, L0MPT6, A0A0L0GVF2), 参与细胞信号通路调控蛋白质1种(L0MC90), 参与群体感应、信号激发的蛋白质3种(Q9L8R8, P0A958, Q8ZBU3), 参与N素代谢蛋白质9种(P95544, A0A0L0GX17, B5XUB2, A0A0L0GZL3, P0AE21, B5XY99, Q8ZB39, A0A0L0GZK3, A0A0L0GYH9), 参与P素代谢蛋白质4种(A0A0L0H2U0, P00634, L0MBC1, A0A0L0H1U7), 参与C素代谢蛋白质4种(L0M970, P0AEX6, Q81TG2, L0M4R6), 参与S素代谢蛋白质1种(A0A0L0H0F3), 参与维生素代谢蛋白质1种(Q8ZPM9), 参与各种代谢调控蛋白质2种(L0LWR6, A0A0L6JAV9), 参与土壤质地改善蛋白质5种(B5XXP0, P77258, P0A2F5, A0A0L0H2X6, P42599), 其次还有部分参与磷酸化传感器激酶活性的蛋白质(L0M0U9), 参与需铁酶的合成催化蛋白质(Q8FE19), 参与催化蛋白质电子传递的蛋白质(S8EE36), 参与细菌细胞壁形成的蛋白质

(P11880, L0M877), 参与抵抗病原菌、病毒的蛋白质(P08395)。可见, 随着土壤酸度的加剧, 茶树根际土壤不同功能的蛋白质丰度发生了显著的变化。

3 讨论

茶树是喜酸作物, 土壤是茶树的生长载体。根据众多学者的研究及农业部的“茶叶产地环境技术条件”(NY/T853-2004)标准, $4.5 \leq \text{pH} \leq 5.5$ 为适中的土壤酸度, $\text{pH} < 4.5$ 和 $\text{pH} > 5.5$ 为不适宜种植土壤的土壤酸度^[74,75]。本团队研究并分析了安溪县9个主要产茶乡镇363个茶园的土壤酸度及其对茶叶产量和品质的影响发现, 37.67%的土壤已经酸化, 不适宜茶树种植; 其次, 茶树根际土壤pH值随着茶树树龄的增加呈下降趋势, 茶叶产量及茶叶品质随着茶树根际土壤pH值的降低呈下降趋势^[8]。进一步分析发现, 随着茶树根际土壤pH值降低, 茶树根际土壤微生物数量总体呈下降趋势, 但其中细菌数量下降, 真菌数量上升^[10]。土壤酸度改变了茶树根际土壤微生物数量的同时也导致微生物群落结构发生变化。随着土壤pH值降低, 茶树根际土壤中好酸性微生物数量上升, 而其他微生物则基本呈下降趋势^[11]。其次, 微生物的功能在土壤pH值的变化下也发生了改变, 表现为病原菌种类与数量随着茶树根际土壤pH值的降低呈显著上升趋势, 而与土壤质地改善及土壤养分循环相关的微生物则呈显著下降趋势^[12]。可见, 土壤酸度改变了土壤微生物的数量、微生物群落结构及微生物的功能多样性。同时, 微生物的变化改变了土壤中的酶活性。研究发现, 随着茶树根际土壤pH值的降低, 土壤中养分循环相关酶——磷酸酶、蛋白酶、脲酶、蔗糖酶活性呈下降趋势, 土壤抗氧化性相关酶——过氧化氢酶活性呈下降趋势, 而纤维素酶及土壤质地相关酶——多酚氧化酶活性呈上升趋势^[11]。土壤中残留的茶树枯枝落叶较多, 而茶树叶片本身含有大量的多酚聚合体, 纤维素酶活性升高加快了茶叶中酚类物质的释放, 多酚氧化酶活性升高加速了土壤中酚类物质氧化成醌, 而醌对植物生长具有较强的抑制作用, 进而导致茶树根际土壤自毒作用加剧。可见, 随着土壤酸度的加剧, 土壤养分循环能力降低, 土壤质地变劣, 土壤自毒潜力加剧。在此基础上, 本团队进一步分析不同酸度茶树根际土壤的养分含量变化发现, 随着土壤pH值的降低, 茶树根际土壤中的全

图 3 不同酸度茶树根际土壤微生物蛋白质定量分析
Figure 3 Quantitative analyses of microbial proteins of tea rhizosphere soil with different acidity

表 4 与土壤酸度呈正相关的茶树根际土壤微生物蛋白质及其丰度

Table 4 Soil microbial proteins and their abundance in rhizosphere of tea tree were positively correlated with soil acidity

编号	蛋白质登录号	蛋白质名称	不同样品(pH值)的蛋白丰度			
			S1 (5.62)	S2 (5.46)	S3 (4.56)	S4 (3.39)
1	V5G1W3	3-酮辅酶A转移酶	8236±106	7766±114	5894±125	2083±96
2	L0M0U9	ABC型糖运输系统	3983652±1387	3106343±2348	2281083±2624	1526774±1876
3	L0MJP7	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶	74741±286	400±32	0	0
4	Q8FE19	Fe(2+)转运蛋白质	90313±689	62433±734	35304±1825	28871±1487
5	L0LWR6	HAD超家族水解酶	110082±2348	76331±2097	65853±1654	31855±2749
6	B5XXP0	NAD(P)H脱氢酶	233615±1983	141679±1396	108805±1054	46405±1785
7	P95544	NAD(P)特异-谷氨酸脱氢酶	6042±295	572±89	0	0
8	S8EE36	NAD结合蛋白	61739±1984	51078±1487	33268±2136	16980±1265
9	Q9L8R8	N-酰基高丝氨酸内酯酶	70724±1052	25861±1687	7677±836	0
10	P77258	N-乙酰马来酰亚胺还原酶	147042±1054	12448±2598	0	0
11	Q8ZBU3	S-核糖体同型半胱氨酸溶解酶	2818543±2983	27951±2457	0	0
12	P0AGJ6	非特征性tRNA/rRNA甲基转移酶	110501±1285	77366±1874	37638±1582	25194±1083
13	A0A0L0GX17	氨基酸转运体	58494±895	8307±784	0	0
14	B5XUB2	鲱精胺酶	172715±1843	143539±2035	100433±1964	45905±2038
15	Q8ZPM9	吡哆醇5'-磷酸盐氧化酶	4799±168	4147±106	1380±72	1243±53
16	P11880	丙氨酸连接酶	25399±1175	20761±1682	11973±1236	5596±81
17	L0M877	丙氨酸羧肽酶	82997±1824	62725±2395	51325±1847	23573±1046
18	P0A2F5	超氧化物歧化酶	102951±2035	27440±2217	14769±965	6989±349
19	P08395	蛋白酶	12431±1762	9658±1048	0	0
20	P0A958	二磷酸果糖酶	91744±1893	48355±1359	38576±1458	34887±679
21	L0M580	二氢脂基赖氨酸-残基琥珀酰基转移酶	4482±108	3129±125	0	0
22	A0A0L0H0U9	甘露糖转运子	284938±2362	162512±1984	124605±1692	104018±1107
23	A0A0L0H3J9	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	1821225±2845	1269024±2893	395587±2038	267747±1352
24	A0A0L0H1U7	甘油-3-磷酸盐输出ATP结合蛋白	82454±1729	75175±1625	41173±3654	23355±1489
25	A0A0L0GZL3	谷氨酸合成酶	192294±1942	189462±1024	136587±5238	70063±1368
26	L0M0Z0	果糖-1,6-二磷酸醛缩酶	2235361±2345	1361418±1897	1080479±1765	575586±1692
27	A0A0L0H2U0	核黄素-1-甲基磷酸酯-5-磷酸盐C-P裂解酶	640514±3846	627468±2546	301307±1387	230853±1583
28	P0AE21	甲硫氨酸氨基肽酶	178590±1627	127979±1487	107077±1008	41883±1475
29	L0M970	甲酸盐脱氢酶	95727±2075	50550±1948	45187±1654	19527±1238
30	P00634	碱性磷酸酶	4230667±4328	2120684±2453	996625±1389	761967±1842
31	A0A0L0GYH9	精氨酸ABC转运蛋白	130228±2654	48182±1599	45454±687	21339±476
32	P0AAF9	精氨酸转运ATP结合蛋白	12525±1876	7010±1587	5571±85	0
33	A0A0L0H2X6	抗氧化蛋白	1721162±3799	640293±2605	300001±1369	255981±1257
34	A0A0L0GMV2	磷酸ABC转运蛋白	170527±2108	138354±1872	66936±1542	29570±1945
35	Q5PLR9	磷酸咪唑核苷酸-琥珀酰基合成酶	94264±2678	69644±2005	51209±1684	27725±1124
36	P0AEX6	磷酸核酮糖激酶	44825±2834	43490±1894	18707±1763	12030±1083
37	L0MC90	磷酸结合蛋白	31869532±3542	31469718±1573	23545826±2985	14298711±4935
38	A0A0L0H0F3	硫酸盐ABC转运蛋白	34493±3895	19026±1082	16884±1049	4127±81
39	L0M6T6	膜结合的PQQ依赖型脱氢酶	125329±1873	90910±2265	48340±1536	9844±65

(续表4)

编号	蛋白质登录号	蛋白质名称	不同样品(pH值)的蛋白丰度			
			S1 (5.62)	S2 (5.46)	S3 (4.56)	S4 (3.39)
40	B5XY03	葡萄糖-6-磷酸异构酶	91172±2057	68672±1845	45181±1742	18760±732
41	A0A0L0GXG9	青霉素结合蛋白激活剂	99539±1865	4450±236	0	0
42	A0A0L6JAV9	醛脱氢酶	42477±2308	39754±958	31914±538	8934±84
43	Q81TG2	乳酸盐利用蛋白	30568±1972	10814±1348	0	0
44	L0MBC1	三磷酸核胆碱酯水解酶	81689±2051	77651±1854	22915±1056	17256±985
45	B5XY99	丝氨酸-RNA连接酶	203931±3458	167358±2947	77498±1324	49188±1087
46	P74582	酸化水解酶	67498±2605	41393±1593	28511±1067	8087±362
47	L0MPT6	磷酸盐特异转运系统	132200±3402	123761±1867	91760±1894	41104±1237
48	Q8ZB39	天冬氨酸氨基酰转移酶	39380±3781	17836±2406	17276±872	2945±458
49	P0AFL8	外聚磷酸酶	27979±1163	25524±2385	9887±568	6175±327
50	P42599	氧化还原酶	29585±1846	18397±1072	6433±453	6107±279
51	Q8X8H6	胸苷酸激酶	6047±98	4414±102	2523±86	0
52	A0A0L0GVF2	延伸因子	915184±1763	793192±2342	337177±3584	228930±2394
53	L0M4R6	氧化还原酶-芳醇脱氢酶	67134±1058	62925±832	30830±1845	19560±1683
54	A0A0L0GZK3	转氨酶	940283±2467	405900±1581	193988±3579	154316±2698

氮、全磷、全钾、速效氮、速效磷、速效钾含量呈下降趋势^[76]。该结果证实,土壤酸化下降导致土壤养分循环相关微生物种类数量下降、土壤中养分循环酶活性降低,进而导致土壤中养分含量降低。这种变化是否会导致茶树生长及产量受到影响?本团队深入分析土壤酸化对茶树自毒潜力、抗性生理、光合生理及产量和品质的影响发现,随着茶树根际土壤pH值的降低,茶树根际土壤的自毒潜力加剧^[11];茶树叶片的超氧化物歧化酶、过氧化物酶、过氧化氢酶活性及可溶性糖、可溶性蛋白含量呈显著下降趋势,而丙二醛含量呈显著上升趋势,茶树的生理抗性能力降低^[14];茶树叶片的光合速率、气孔导度、胞间CO₂浓度、蒸腾速率、叶绿素含量等均呈显著下降趋势,茶树的光合作用能力降低^[14]。其次,茶树春茶、秋茶的茶叶产量及茶叶品质均呈显著下降趋势^[8]。可见,土壤酸化加剧会使茶树根际土壤自毒潜力增强、茶树抗性下降、光合作用能力降低,最终导致茶叶的产量和品质下降。在前述研究的基础上,本团队构建了酸化对茶树根际土壤微生物的调控机制及其对茶树生长影响的模拟图(图4)。

前述研究说明,土壤酸化可改变土壤微生物的数量、群落结构及功能进而影响土壤的质地与养分循

环,最终导致茶树的生长、茶叶产量及品质下降。但土壤酸化是如何调控微生物的数量及功能发生改变,微生物的内在机制是如何变化并未阐明。据此,本团队进一步运用土壤微生物宏蛋白质组学的方法分析了酸化如何调控土壤微生物的代谢机制并反作用于茶树生长。

本研究发现,随着茶树根际土壤酸化加剧,参与土壤质地改善或降解有害物质的5种蛋白质及抵抗土壤病原菌的蛋白酶表达丰度下降,可见,酸化可导致土壤质地变劣,该结论也验证了前述的结果。据报道,土壤酸化,土壤中的H⁺浓度不断上升,伴随着植物根际土壤微生物数量和种类组成发生改变^[77]。Wilkinson和Davies^[78]研究发现,酸性物质能以被动运输的形式进入微生物细胞内部,降低细胞内部的pH值,进而杀死细胞,抑制微生物的生长繁殖。本研究发现,茶树根际土壤酸化后,参与细菌细胞壁形成的丙氨酸连接酶、丙氨酸羧肽酶丰度降低,细菌细胞壁的形成能力降低,导致酸性物质更容易进入微生物细胞中,进而促使土壤微生物细胞内的能量代谢信号调控蛋白质丰度降低,微生物体内的TCA循环、磷酸戊糖代谢途径、糖酵解途径的蛋白质丰度降低,微生物的代谢能力下降,生长延缓;更为重要的是,土壤酸化后,微生物细胞内核酸代谢中

表 5 与土壤酸度呈正相关的土壤微生物蛋白质功能分析^{a)}Table 5 Function analyses of soil microbial proteins that are positively correlated with soil acidity^{a)}

蛋白质登录号	蛋白质名称	功能
V5G1W3	3-酮酸辅酶A转移酶	参与TCA循环 ^[21]
L0M580	二氢脂基赖氨酸-残基琥珀酰基转移酶	参与TCA循环 ^[22]
P74582	酸化水解酶	参与TCA循环 ^[23]
A0A0L0H3J9	甘油醛-3-磷酸脱氢酶	参与磷酸戊糖途径 ^[24]
L0M6T6	膜结合的PQQ依赖型脱氢酶	参与磷酸戊糖途径 ^[25]
B5XY03	葡萄糖-6-磷酸异构酶	参与磷酸戊糖途径 ^[26]
L0M0Z0	果糖-1,6-二磷酸醛糖酶	参与糖酵解途径 ^[27]
L0MJP7	果糖-1,6二磷酸醛缩酶	参与糖酵解途径 ^[27]
Q5PLR9	磷酸咪唑核苷酸-琥珀酰胺基合成酶	参与嘌呤核苷酸代谢 ^[28]
P0AFL8	外聚磷酸酶	参与嘌呤核苷酸代谢 ^[29]
Q8X8H6	胸苷酸激酶	参与嘧啶核苷酸代谢 ^[30]
P0AGJ6	非特征性tRNA/rRNA甲基转移酶	遗传信息转录 ^[31]
A0A0L0H0U9	甘露糖转运子	参与细胞信号传递 ^[32]
P0AAF9	精氨酸转运ATP结合蛋白	参与细胞信号传递 ^[33]
A0A0L0GMV2	磷酸ABC转运蛋白	参与细胞信号传递 ^[34]
A0A0L0GXG9	青霉素结合蛋白激活剂	参与细胞信号传递 ^[35]
L0MPT6	磷酸盐特异转运系统	参与细胞信号传递 ^[36]
A0A0L0GVF2	延伸因子	参与细胞信号传递 ^[37]
L0MC90	磷酸结合蛋白	参与细胞信号通路调控 ^[38]
Q9L8R8	N-酰基高丝氨酸内酯酶	群体感应, 信号激发 ^[39]
P0A958	二磷酸果糖酶	群体感应, 信号激发 ^[40]
Q8ZBU3	S-核糖体同型半胱氨酸溶解酶	群体感应, 信号激发 ^[41]
P95544	NAD(P)特异-谷氨酸脱氢酶	参与N代谢 ^[42]
A0A0L0GX17	氨基酸转运体	参与N代谢 ^[43]
B5XUB2	鲱精胺酶	参与N代谢 ^[44]
A0A0L0GZL3	谷氨酸合成酶	参与N代谢 ^[45]
P0AE21	甲硫氨酸氨基肽酶	参与N代谢 ^[46]
B5XY99	丝氨酸-RNA连接酶	参与N代谢 ^[47]
Q8ZB39	天冬氨酸氨基酰转移酶	参与N代谢 ^[48]
A0A0L0GZK3	转氨酶	参与N代谢 ^[49]
A0A0L0GYH9	精氨酸ABC转运蛋白	参与N代谢 ^[50]
A0A0L0H2U0	核黄素-1-甲基磷酸酯-5-磷酸盐C-P裂解酶	参与P代谢 ^[51]
P00634	碱性磷酸酶	参与P代谢 ^[52]
L0MBC1	三磷酸核胆碱酯水解酶	参与P代谢 ^[53]
A0A0L0H1U7	甘油-3-磷酸盐输出ATP结合蛋白	参与P代谢 ^[54]
L0M970	甲酸盐脱氢酶	参与C代谢 ^[55]
P0AEX6	磷酸核酮糖激酶	参与C代谢 ^[56]
Q81TG2	乳酸盐利用蛋白	参与C代谢 ^[57]
L0M4R6	氧化还原酶-芳醇脱氢酶	参与C代谢 ^[58]
A0A0L0H0F3	硫酸盐ABC转运蛋白	参与S代谢 ^[59]
Q8ZPM9	吡哆醇S'-磷酸盐氧化酶	参与维生素代谢 ^[60]

(续表5)

蛋白质登录号	蛋白质名称	功能
L0LWR6	HAD超家族水解酶	参与各种代谢调控 ^[61]
A0A0L6JAV9	醛脱氢酶	参与各种代谢调控 ^[62]
B5XXP0	NAD(P)H脱氢酶	参与土壤质地改善 ^[63]
P77258	N-乙基马来酰亚胺还原酶	参与土壤质地改善 ^[64]
P0A2F5	超氧化物歧化酶	参与土壤质地改善 ^[65]
A0A0L0H2X6	抗氧化蛋白	参与土壤质地改善 ^[66]
P42599	氧化还原酶	参与土壤质地改善 ^[67]
L0M0U9	ABC型糖运输系统	磷酸化传感器激酶活性 ^[68]
Q8FE19	Fe(2+)转运蛋白	参与需铁酶合成催化 ^[69]
S8EE36	NAD结合蛋白	催化蛋白质电子传递 ^[70]
P11880	丙氨酸连接酶	参与细菌细胞壁形成 ^[71]
L0M877	丙氨酸羧肽酶	参与细菌细胞壁形成 ^[72]
P08395	蛋白酶	抵抗病原菌、病毒 ^[73]

a): 蛋白质功能分析, 以搜索来自<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>网站的结果与参考文献共同确认

图 4 酸化对茶树根际土壤微生物的调控机制及其对茶树生长影响

Figure 4 The regulation of rhizosphere soil microorganisms of tea trees by acidification and effects of acidification on the growth of tea trees

的嘧啶代谢与嘌呤代谢蛋白质丰度降低, 导致生物繁殖能力下降. 可见, 土壤酸化后土壤质地变劣, 微生物

细胞壁形成减缓, 酸性物质更容易进入微生物细胞内部, 促使能量代谢能力下降、微生物生长能力降低、

遗传代谢繁殖能力降低、微生物生长延缓甚至被杀死、微生物的种类与数量下降。该结果揭示了前述中酸化为何可导致土壤微生物种类和数量下降的机制。

土壤微生物是土壤肥力形成和持续发展的核心动力,微生物对土壤养分循环的影响改变了土壤养分有效性,从而间接影响植物对养分的吸收^[79-81]。从植物本身考虑,种植土壤中有有机质的分解需要微生物的参与,土壤养分的释放与循环在很大程度上需要依靠微生物来承担,微生物的平衡影响着土壤养分的健康循环和植物的吸收^[82-84]。从微生物本身考虑,微生物参与土壤养分循环的目的并不是为了给植物提供养分,甚至是与植物竞争养分,二者既相互依存又相互影响^[85]。土壤pH值降低极易导致土壤中与养分循环相关的土壤酶活性下降,例如,pH值降低抑制了土壤N、P、K等元素循环相关酶的活性^[86-88],这种现象导致土

壤中可利用的营养元素含量降低,土壤肥力下降,植物可利用营养元素下降^[89,90]。本研究发现,茶树根际土壤酸化可导致土壤抗氧化信号蛋白质丰度降低,降解土壤有害物质的蛋白质丰度降低,土壤中抑制病原菌、病毒的蛋白质丰度降低,进而导致土壤质地变劣;同时,土壤酸化后,土壤养分循环信号蛋白质丰度降低,导致土壤中N、P、C、S元素代谢相关蛋白质丰度下降,土壤养分循环能力下降,土壤中可吸收的养分含量降低。该结果从土壤微生物内部机制的变化证实了前述中土壤养分元素含量变化的机制。

基于前期及本研究结果,本团队构建了茶树根际土壤微生物蛋白质组代谢调控图谱(图5)。图5表明,随着茶园土壤酸度加剧、土壤质地变劣,酸性物质进入土壤微生物内部,破坏微生物细胞壁,抑制微生物能量代谢和核酸代谢,进而降低微生物获取能量的能力

图5 茶树根际土壤微生物蛋白质组代谢图谱

Figure 5 Metabolic map of microbial proteome in the rhizosphere soil of tea trees

及繁殖能力, 导致微生物数量下降. 微生物感知酸性物质的影响并释放群体感应蛋白质激发信号, 信号蛋白质在信号通路蛋白质的调控下, 激发并调控不同代谢途径的特定信号蛋白质丰度下降(负调控), 导致微生物释放到土壤中的养分循环蛋白质丰度降低, 连带引起土壤养分(C、N、P、S等)循环转化和利用能力减

弱, 进而反作用于茶树, 降低茶树对养分的吸收与利用, 导致茶叶产量和品质下降. 茶树根际土壤微生物蛋白质组代谢调控机制的揭示, 为进一步认识土壤营养元素循环, 指导茶树栽培管理中合理施肥以调控修复酸化茶园土壤, 进而提高茶叶产量和品质, 提供了科学的指导策略^[9].

参考文献

- 1 Hu X F, Chen F S, Wine M L, et al. Increasing acidity of rain in subtropical tea plantation alters aluminum and nutrient distributions at the root-soil interface and in plant tissues. *Plant Soil*, 2017, 417: 261–274
- 2 Karak T, Sonar I, Paul R K, et al. Aluminium dynamics from soil to tea plant (*Camellia sinensis* L.): Is it enhanced by municipal solid waste compost application? *Chemosphere*, 2015, 119: 917–926
- 3 Wang L, Butterly C R, Chen Q, et al. Surface amendments can ameliorate subsoil acidity in tea garden soils of high-rainfall environments. *Pedosphere*, 2016, 26: 180–191
- 4 Zhang Q, Zong L G, Cao D, et al. Study on soil acidification and its restrictive factors of typical tea garden in Jiangsu Province (in Chinese). *Soils*, 2011, 43: 751–757 [张倩, 宗良纲, 曹丹, 等. 江苏省典型茶园土壤酸化趋势及其制约因素研究. *土壤*, 2011, 43: 751–757]
- 5 Wu S W, Suo Y Y, Zhang Z R, et al. Acidification of tea plantation soil and distribution of exchangeable acidity in water-stable aggregate (in Chinese). *J Soil Water Conserv*, 2012, 26: 195–199 [吴士文, 索炎炎, 张峥嵘, 等. 南方茶园土壤酸化特征及交换性酸在水稳性团聚体中的分布. *水土保持学报*, 2012, 26: 195–199]
- 6 Sun Y M, Zhang K, Ye C, et al. Soil acidification and its improvement of tea gardens in Jiangxi (in Chinese). *Soils Crops*, 2017, 6: 139–145 [孙永明, 张昆, 叶川, 等. 江西茶园土壤酸化及对策. *土壤与作物*, 2017, 6: 139–145]
- 7 Yang D X, Zhong Z M, Chen J X, et al. Evaluation of soil nutrient status of tea gardens in Fujian province (in Chinese). *Channel Sci*, 2016, 42: 129–131 [杨冬雪, 钟珍梅, 陈剑侠, 等. 福建省茶园土壤养分状况评价. *海峡科学*, 2016, 42: 129–131]
- 8 Wang H B, Chen X T, Ding L, et al. Effect of soil acidification on yield and quality of tea tree in tea plantations from Anxi county, Fujian Province (in Chinese). *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, 24: 1398–1403 [王海斌, 陈晓婷, 丁力, 等. 福建省安溪县茶园土壤酸化对茶树产量及品质的影响. *应用与环境生物学报*, 2018, 24: 1398–1403]
- 9 Wang H B, Chen X T, Ding L, et al. Effect of soil acidity on microbial diversity in rhizospheric soils of tea plants (in Chinese). *Chin J Trop Crops*, 2018, 39: 448–454 [王海斌, 陈晓婷, 丁力, 等. 土壤酸度对茶树根际土壤微生物群落多样性影响. *热带作物学报*, 2018, 39: 448–454]
- 10 Wang H B, Ye J H, Chen X T, et al. Effect on soil microbes of the rhizospheric soil acidity of tea tree continuous cropping (in Chinese). *Chin J Appl Environ Biol*, 2016, 22: 480–485 [王海斌, 叶江华, 陈晓婷, 等. 连作茶树根际土壤酸度对土壤微生物的影响. *应用与环境生物学报*, 2016, 22: 480–485]
- 11 Wang H B, Chen X T, Ding L, et al. Analysis on autotoxic potential, enzyme activity and microbial community function diversity of the rhizosphere soils from tea plants with continuous cropping years (in Chinese). *Chin J Trop Crops*, 2018, 39: 852–857 [王海斌, 陈晓婷, 丁力, 等. 连作茶树根际土壤自毒潜力、酶活性及微生物群落功能多样性的影响. *热带作物学报*, 2018, 39: 852–857]
- 12 Wang H B, Chen X T, Ding L, et al. Using T-RFLP technology to analyze bacterial diversity in the rhizospheric soils of tea tree at different ages (in Chinese). *Chin J Appl Environ Biol*, 2018, 24: 775–782 [王海斌, 陈晓婷, 丁力, 等. 不同树龄茶树根际土壤细菌多样性的T-RFLP分析. *应用与环境生物学报*, 2018, 24: 775–782]
- 13 Ye J H, Wang H B, Kong X H, et al. Soil sickness problem in tea plantations in Anxi county, Fujian province, China. *Allelopathy J*, 2016, 39: 19–28
- 14 Ye J H, Wang H B, Yang X Y, et al. Autotoxicity of the soil of consecutively cultured tea plantations on tea (*Camellia sinensis*) seedlings. *Acta Physiol Plant*, 2016, 38: 195–206
- 15 Jia X L, Wang H B, Ye J H, et al. Identification of allelochemicals responsible for soil degradation in continuously cropped tea plantations. *Allelopathy J*, 2018, 45: 1–12
- 16 Lacerda C M R, Choe L H, Reardon K F. Metaproteomic analysis of a bacterial community response to cadmium exposure. *J Proteome Res*, 2007, 6: 1145–1152

- 17 Khalili B, Nili N, Nourbakhsh F, et al. Does cultivation influence the content and pattern of soil proteins? *Soil Tillage Res*, 2011, 111: 162–167
- 18 Wang H B, Zhang Z X, Li H, et al. Characterization of metaproteomics in crop rhizospheric soil. *J Proteome Res*, 2011, 10: 932–940
- 19 Wiśniewski J R, Zougman A, Nagaraj N, et al. Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat Methods*, 2009, 6: 359–362
- 20 Bruderer R, Bernhardt O M, Gandhi T, et al. High-precision iRT prediction in the targeted analysis of data-independent acquisition and its impact on identification and quantitation. *Proteomics*, 2016, 16: 2246–2256
- 21 Liang Q Q, Wang B Y, Pang L X, et al. Application of citrate as a tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediate, prevents diabetic-induced heart damages in mice. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19: 43–48
- 22 Shen Y, Li J, He F, et al. Phenanthrene-triggered tricarboxylic acid cycle response in wheat leaf. *Sci Total Environ*, 2019, 665: 107–112
- 23 Alvarez H M. Central metabolism of species of the genus *Rhodococcus*. In: Alvarez H, ed. *Biology of Rhodococcus*. Microbiology Monographs. Heidelberg: Springer, 2010. 91–108
- 24 Wolosiuk R A, Buchanan B B. Studies on the regulation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 1976, 251: 6456–6461
- 25 De Muynck C, Pereira C S S, Naessens M, et al. The genus *Gluconobacter Oxydans*: Comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Crit Rev Biotech*, 2007, 27: 147–171
- 26 Wamelink M M C, Struys E A, Jakobs C. The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *J Inherit Metab Dis*, 2008, 31: 703–717
- 27 Pou-Barreto C, Quispe-Ricalde M A, Morchón R, et al. Galectin and aldolase-like molecules are responsible for the specific IgE response in humans exposed to *Dirofilaria immitis*. *Parasite Immunol*, 2008, 30: 596–602
- 28 Suparmin A, Kato T, Dohra H, et al. Insight into cordycepin biosynthesis of *Cordyceps militaris*: Comparison between a liquid surface culture and a submerged culture through transcriptomic analysis. *PLoS ONE*, 2017, 12: e0187052
- 29 Kristensen O, Ross B, Gajhede M. Structure of the PPX/GPPA phosphatase from *Aquifex aeolicus* in complex with the alarmone ppGpp. *J Mol Biol*, 2008, 375: 1469–1476
- 30 Kato A, Yasuda Y, Kitamura Y, et al. Carbocyclic thymidine derivatives efficiently inhibit *Plasmodium falciparum* thymidylate kinase (PfTMK). *Parasitol Int*, 2012, 61: 501–503
- 31 de Crécy-Lagard V, Marck C, Brochier-Armanet C, et al. Comparative RNomics and modomics in Mollicutes: prediction of gene function and evolutionary implications. *IUBMB Life*, 2007, 59: 634–658
- 32 Siebold C, Flükiger K, Beutler R, et al. Carbohydrate transporters of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS). *FEBS Lett*, 2001, 504: 104–111
- 33 Wissenbach U, Six S, Bongaerts J, et al. A third periplasmic transport system for L-arginine in *Escherichia coli*: molecular characterization of the *artPIQMJ* genes, arginine binding and transport. *Mol Microbiol*, 1995, 17: 675–686
- 34 Ritter C A, Jedlitschky G, Meyer zu Schwabedissen H, et al. Cellular export of drugs and signaling molecules by the ATP-binding cassette transporters MRP4 (ABCC4) and MRP5 (ABCC5). *Drug Metab Rev*, 2005, 37: 253–278
- 35 Golemi-Kotra D, Cha J Y, Meroueh S O, et al. Resistance to β -lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*, 2003, 278: 18419–18425
- 36 Hsieh Y J, Wanner B L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr Opin Microbiol*, 2010, 13: 198–203
- 37 Couto D, Zipfel C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants. *Nat Rev Immunol*, 2016, 16: 537–552
- 38 Gurevich E V, Gurevich V V. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol*, 2006, 7: 236–245
- 39 Mahmoudi E, Tarzaban S, Khodaygan P. Dual behaviour of plants against bacterial quorum sensing: inhibition or excitation. *J Plant Pathol*, 2014, 96: 295–301
- 40 Zong R, Jiao N. Proteomic responses of *Roseobacter litoralis* OCh149 to starvation and light regimen. *Microb Environ*, 2012, 27: 430–442
- 41 Yao Z, Guo Z, Wang Y, et al. Integrated succinylome and metabolome profiling reveals crucial role of S-ribosylhomocysteine lyase in quorum sensing and metabolism of *Aeromonas hydrophila*. *Mol Cell Proteomics*, 2019, 18: 200–215
- 42 Harper C J, Hayward D, Kidd M, et al. Glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase are regulated in response to nitrogen availability in *Mycobacterium smegmatis*. *BMC Microbiol*, 2010, 10: 138–149
- 43 Okumoto S, Pilot G. Amino acid export in plants: a missing link in nitrogen cycling. *Mol Plant*, 2011, 4: 453–463
- 44 Burnat M, Flores E. Inactivation of agmatinase expressed in vegetative cells alters arginine catabolism and prevents diazotrophic growth in the

- heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena*. *Microbiol Open*, 2014, 3: 777–792
- 45 Temple S J, Vance C P, Stephen Gantt J. Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 51–56
 - 46 Drath M, Baier K, Forchhammer K. An alternative methionine aminopeptidase, MAP-A, is required for nitrogen starvation and high-light acclimation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Microbiology*, 2009, 155: 1427–1439
 - 47 Suyal D C, Kumar S, Joshi D, et al. Quantitative proteomics of psychotrophic diazotroph in response to nitrogen deficiency and cold stress. *J Proteomics*, 2018, 187: 235–242
 - 48 Nissim I, Horyn O, Luhovyy B, et al. Role of the glutamate dehydrogenase reaction in furnishing aspartate nitrogen for urea synthesis: studies in perfused rat liver with ^{15}N . *Biochem J*, 2003, 376: 179–188
 - 49 Haystead A, Dharmawardene M W N, Stewart W D P. Ammonia assimilation in a nitrogen-fixing blue-green alga. *Plant Sci Lett*, 1973, 1: 439–445
 - 50 Lu C D. Pathways and regulation of bacterial arginine metabolism and perspectives for obtaining arginine overproducing strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 70: 261–272
 - 51 Wang C, Lin X, Li L, et al. Glyphosate shapes a dinoflagellate-associated bacterial community while supporting algal growth as sole phosphorus source. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2530
 - 52 Dyhrman S T, Ruttenberg K C. Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnol Oceanogr*, 2006, 51: 1381–1390
 - 53 Peck S C, van der Donk W A. Phosphonate biosynthesis and catabolism: a treasure trove of unusual enzymology. *Curr Opin Chem Biol*, 2013, 17: 580–588
 - 54 Wuttge S, Bommer M, Jäger F, et al. Determinants of substrate specificity and biochemical properties of the *sn*-glycerol-3-phosphate ATP binding cassette transporter (UgpB-AEC₂) of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2012, 86: 908–920
 - 55 Ferry J G. Formate dehydrogenase. *FEMS Microbiol Lett*, 1990, 87: 377–382
 - 56 Ochsner A M, Christen M, Hemmerle L, et al. Transposon sequencing uncovers an essential regulatory function of phosphoribulokinase for methylotrophy. *Curr Biol*, 2017, 27: 2579–2588.e6
 - 57 O'Brien J, Kla K M, Hopkins I B, et al. Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. *Neurochem Res*, 2007, 32: 597–607
 - 58 Hernández-Ortega A, Ferreira P, Martínez A T. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, 93: 1395–1410
 - 59 van der Ploeg J R, Eichhorn E, Leisinger T. Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 2001, 176: 1–8
 - 60 Musayev F N, Di Salvo M L, Ko T P, et al. Structure and properties of recombinant human pyridoxine 5'-phosphate oxidase. *Protein Sci*, 2003, 12: 1455–1463
 - 61 Haase I, Sarge S, Illarionov B, et al. Enzymes from the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily catalyse the elusive dephosphorylation step of riboflavin biosynthesis. *ChemBioChem*, 2013, 14: 2272–2275
 - 62 Vasiliou V, Nebert D W. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Hum Genomics*, 2005, 2: 138–143
 - 63 Shahbaz M H, Omidinia E, Saghir R, et al. Preliminary report of NAD⁺-dependent amino acid dehydrogenase producing bacteria isolated from soil. *Iran Biomed J*, 2007, 11: 131–135
 - 64 Ribera D, Narbonne J F, Arnaud C, et al. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biol Biochem*, 2001, 33: 1123–1130
 - 65 Takahashi Y, Katoh S, Shikura N, et al. Superoxide dismutase produced by soil bacteria increases bacterial colony growth from soil samples. *J Gen Appl Microbiol*, 2003, 49: 263–266
 - 66 Hultman J, Waldrop M P, Mackelprang R, et al. Multi-omics of permafrost, active layer and thermokarst bog soil microbiomes. *Nature*, 2015, 521: 208–212
 - 67 Pascual J A, Hernandez T, Garcia C, et al. Enzymatic activities in an arid soil amended with urban organic wastes: laboratory experiment. *Bioresour Tech*, 1998, 64: 131–138
 - 68 Saier Jr. M H. Bacterial sensor kinase/response regulator systems: an introduction. *Res Microbiol*, 1994, 145: 349–355
 - 69 Zhu H, Alexeev D, Hunter D J B, et al. Oxo-iron clusters in a bacterial iron-trafficking protein: new roles for a conserved motif. *Biochem J*, 2003, 376: 35–41

- 70 Buckley P A, Jackson J B, Schneider T, et al. Protein-protein recognition, hydride transfer and proton pumping in the transhydrogenase complex. *Structure*, 2000, 8: 809–815
- 71 Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, et al. The VANA glycopeptide resistance protein is related to D-alanyl-D-alanine ligase cell wall biosynthesis enzymes. *Molec Gen Genet*, 1990, 224: 364–372
- 72 Trivedi R R, Crooks J A, Auer G K, et al. Mechanical genomic studies reveal the role of D-alanine metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* cell stiffness. *MBio*, 2018, 9
- 73 López-Otín C, Overall C M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 509–519
- 74 Mehra A, Baker C L. Leaching and bioavailability of aluminium, copper and manganese from tea (*Camellia sinensis*). *Food Chem*, 2007, 100: 1456–1463
- 75 Nejatollahi M, Mortazavi S, Ildoromi A. Levels of Cu, Zn, Pb, and Cd in the leaves of the tea plant (*Camellia sinensis*) and in the soil of Gilan and Mazandaran farms of Iran. *Food Meas*, 2014, 8: 277–282
- 76 Wang H B, Ye J H, Chen X T, et al. Analysis on change of soil fertility in the rhizosphere of different age of Huangjingui tea tree (in Chinese). *Hubei Agric Sci*, 2016, 59: 4420–4423 [王海斌, 叶江华, 陈晓婷, 等. 不同年限黄金桂茶树根际土壤肥力变化分析. 湖北农业科学, 2016, 59: 4420–4423]
- 77 Cao Y S, Li Z A, Zou B. Regulation of rhizosphere and remediation of polluted soil by heavy metal. *Ecol Environ*, 2003, 12: 493–497 [曹裕松, 李志安, 邹碧. 根际环境的调节与重金属污染土壤的修复. 生态环境, 2003, 12: 493–497]
- 78 Wilkinson J M, Davies D R. The aerobic stability of silage: key findings and recent developments. *Grass Forage Sci*, 2012, 68: 1–19
- 79 Rashid M I, Mujawar L H, Shahzad T, et al. Bacteria and fungi can contribute to nutrients bioavailability and aggregate formation in degraded soils. *Microbiol Res*, 2016, 183: 26–41
- 80 Jing Z, Chen R, Wei S, et al. Response and feedback of C mineralization to P availability driven by soil microorganisms. *Soil Biol Biochem*, 2017, 105: 111–120
- 81 Pii Y, Mimmo T, Tomasi N, et al. Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils*, 2015, 51: 403–415
- 82 van der Heijden M G A, Bardgett R D, van Straalen N M. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecol Lett*, 2008, 11: 296–310
- 83 Chen W X, Li F D, Yan Z C. Retrospect and prospect of soil microbiology and biological nitrogen fixation researches in China (in Chinese). *World Sci-tech Res Dev*, 2002, 24: 6–12 [陈文新, 李阜棣, 闫章才. 我国土壤微生物学和生物固氮研究的回顾与展望. 世界科技研究与发展, 2002, 24: 6–12]
- 84 Kuzyakov Y, Friedel J K, Stahr K. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32: 1485–1498
- 85 Shen R F, Zhao X Q. Role of soil microbes in the acquisition of nutrients by plants (in Chinese). *Acta Ecol Sin*, 2015, 35: 6584–6591 [沈仁芳, 赵学强. 土壤微生物在植物获得养分中的作用. 生态学报, 2015, 35: 6584–6591]
- 86 Wang W B, Wang Y P, Wang H T, et al. Effects of different continuous cropping and rotation of poplar plantation on soil nitrogen bacteria community and nitrogen metabolism (in Chinese). *Sci Silvae Sin*, 2016, 52: 45–54 [王文波, 王延平, 王华田, 等. 杨树人工林连作与轮作对土壤氮素细菌类群和氮素代谢的影响. 林业科学, 2016, 52: 45–54]
- 87 Zhang L, Chen W, Burger M, et al. Changes in soil carbon and enzyme activity as a result of different long-term fertilization regimes in a greenhouse field. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0118371
- 88 Yuan Z G, Yang J, Guo L L, et al. Research progress on effect of acidification on soil quality and main improving measures for acidified soil (in Chinese). *J Agric*, 2015, 5: 51–55 [袁珍贵, 杨晶, 郭莉莉, 等. 酸化对土壤质量的影响及酸化土壤的主要改良措施研究进展. 农学学报, 2015, 5: 51–55]
- 89 Fan Q F, Zhang Y L, Chen Z, et al. Acidity characteristics and acidification mechanism of soils in protected fields (in Chinese). *Acta Pedol Sin*, 2009, 46: 466–471 [范庆锋, 张玉龙, 陈重, 等. 保护地土壤酸度特征及酸化机制研究. 土壤学报, 2009, 46: 466–471]
- 90 Yang Z F, Yu Tao, Tang J R, et al. A study of the characteristics and mechanisms of soil acidification in the Dongting Lake region in Hunan Province (in Chinese). *Earth Sci Front*, 2006, 13: 105–112 [杨忠芳, 余涛, 唐金荣, 等. 湖南洞庭湖地区土壤酸化特征及机理研究. 地学前缘, 2006, 13: 105–112]
- 91 Schulze W X, Gleixner G, Kaiser K, et al. A proteomic fingerprint of dissolved organic carbon and of soil particles. *Oecologia*, 2005, 142: 335–343

Construction of the microbial protein metabolism map of tea rhizosphere soil in acidified plantations

WANG HaiBin^{1,2}, WANG YuHua¹, ZHANG Qi^{2,3}, LIN ShunXian^{1,2}, ZHANG QingXu^{1,2},
YE JiangHua^{2,3}, DING Li¹, LIN Sheng² & HE HaiBin²

1 College of Life Sciences, Longyan University, Longyan 364012, China;

2 Key Laboratory of Agroecological Processing and Safety Monitoring, Agroecological Institut/College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China;

3 College of Tea and Food, Wuyi University, Wuyishan 354300, China

Soil plays a crucial role in tea tree growth, however, only few studies have reported the responses of soil microorganisms to soil acidification in tea plantations and the negative regulation of soil acidification on tea tree growth. In this study, the soil samples from Tieguanyin tea tree plantation with different acidities were used as a material for rhizosphere soil microbial protein extraction. Data dependent acquisition (DDA) was used to establish the soil microbial protein data, whereas Data independent acquisition (DIA) was used for quantitative analyses to obtain the reduced abundance of soil protein in tea rhizosphere soil. Furthermore, the functional analysis of the obtained proteins was conducted, and the regulation map of microbial protein metabolism of rhizosphere soil was constructed. The results showed that a total of 2,741 microbial proteins were detected in the tea tree rhizosphere soil, and the molecular weight ranged from 2.64 to 338.33 kD, whereas the range of pI was from 3.78 to 12.15. Quantitative analyses of soil proteins showed that the abundance of 54 microbial proteins, including genetic signaling proteins, energy metabolism signaling proteins, soil antioxidant signaling proteins, and soil nutrient cycling signaling proteins, which are named according to their functions, was decreased. Based on these analyses, a metabolic regulation map of soil microbial proteomes was constructed, and the results suggested that as tea soil acidity increased, soil microbes released quorum-sensing proteins to trigger signaling proteins for survival. Under the regulation of signaling pathway proteins, signaling proteins activated the expression of specific signaling proteins in different metabolic pathways and then regulated the expression of proteins in different metabolic pathways, demonstrating a downregulated expression trend. Finally, this regulation resulted in a decrease of microbial energy metabolism and circulation capacity as well as the reproduction capacity and quantity. The change in microbial quantity and function led to the weakening of soil nutrient cycling capacity, the blocking of the absorption of nutrients in tea trees, and the stunting of the growth and the declining of the yield and quality of tea trees.

tea tree, soil acidification, soil microbial protein, metabolism regulation

doi: [10.1360/SSV-2020-0008](https://doi.org/10.1360/SSV-2020-0008)