

DOI:10.12403/j.1001-1498.20240012

叶面喷施硒肥对香榧幼苗叶片代谢组的影响

陈振生¹, 李爱华², 杜拾平², 黄培耕¹, 许秀环^{2*}, 宁博林¹, 李文¹

(1. 广西国有博白林场, 广西博白 537617; 2. 湖北省林业科学研究院, 湖北武汉 430075)

摘要: [目的] 分析亚硒酸钠叶面喷施后对香榧 (*Torreya grandis*) 幼苗叶片代谢组的影响, 探究亚硒酸钠喷施后香榧叶片次生代谢物的累积情况及其对果实品质的影响。[方法] 以苗龄 2 年的香榧幼苗为供试材料, 叶面喷施亚硒酸钠 (浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 次, 间隔 15 d。第二次喷施后 15 d, 采取 1 年生叶片进行代谢组分析, 以色谱-质谱研究香榧幼苗叶片代谢物差异。[结果] 在正离子模式下, 处理组 and 对照组之间有 909 种差异代谢物, 其中 69 种显著变化 (27 种显著上调, 42 种显著下调)。在负离子模式下, 出现 433 种差异代谢物, 其中 43 种显著变化 (11 种显著上调, 32 种显著下调)。对人体有益的一些次生代谢物显著增加, 如车前苷 (2.827 倍)、川芎内酯 (2.524 倍)、6-唾液乳糖 (2.021 倍)、阿齐沙坦 (1.931 倍)。[结论] 香榧叶片喷施亚硒酸钠有利于促进对人体有益的次生代谢物的生物合成及其在叶片中的累积。

关键词: 香榧; 硒肥; 代谢组; 生物强化

中图分类号: S791.53

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2024)03-0203-10

硒是人体所必需的微量营养元素, 随着食物链进入人体, 以两种形式影响人体的健康。其一, 参与蛋白的生物合成。在人体中, 几种氨基酸含有硒元素, 如硒代半胱氨酸和硒代甲硫氨酸^[1]。含有这样氨基酸的蛋白被称为硒蛋白。在人的基因组中, 有 25 个基因编码硒蛋白^[1], 如谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 中的 GPX1、GPX2、GPX3、GPX4 和 GPX6, 氧还原蛋白还原酶 (TXNRD) 中的 TXNRD1、TXNRD2 和 TXNRD3, 碘化甲腺氨酸脱碘酶 (DIO) 中的 DIO1、DIO2 和 DIO3^[2]。其二, 硒元素以配位体的形式参与蛋白的活动。例如, 硒作为配位体参与调节硒结合蛋白 SBP1 的活动^[3]。这些蛋白在人体中具有多种重要的生理活动, 如上述的 GPXs 可以作为抗氧化酶起作用, TXNRDs 则在氧化还原信号转导过程中起作用, DIOs 参与甲状腺激素的生物合成^[1]。人体对硒的摄入量将影响上述蛋白的生物合成及其活动。如果

日常饮食中硒摄入量过多, 则引起硒中毒。然而, 日常饮食中硒摄入量偏少, 则引起人体各种疾病。据统计, 高达 80% 的人群经历过饮食性硒缺乏^[1]。硒摄入量不足引起的疾病中, 最著名的例子就是克山病和卡斯钦-贝 克病。克山病的发生与人体 GPX1 活动低下有关^[4], 硒元素的补充可以阻止克山病的发生^[5]。在卡斯钦-贝 克病发生过程中, 硒则与抗氧化和甲状腺功能的维持有关^[6]。此外, 硒的摄入量不足, 还会引起其它疾病, 如心脏病^[7-8]、癌症^[9-10]、腮腺疾病^[11-12] 等。因此, 硒的足量摄入可以消除这些疾病, 还可以用于治疗南美洲锥虫病^[13-14]。世界上许多国家, 针对本国人群的身体状况以及当地的水土中硒的含量, 制定了各自的硒摄入标准。

在日常生活中, 人们可以通过饮食强化的方式来解决硒摄入不足的问题。鉴于硒的毒性, 这种强化方式以生物强化为宜^[15]。植物的硒生物强化可以

收稿日期: 2024-01-06 修回日期: 2024-01-26

基金项目: 湖北省林业科技支撑重点项目“香榧良种选育与苗木快速繁育技术”(2016-LYKJ01)。

作者简介: 陈振生, 高级工程师。E-mail: 497585057@qq.com

* 通讯作者: 许秀环, 正高级工程师。E-mail: Xuxiuhuan08@163.com

通过多种方式进行,如通过对植物有益的微生物的作用^[16-17]和叶面施用亚硒酸钠、硒酸钠、硒酸钾^[18]。目前,人们已通过硒生物强化的方式来栽培一些农作物、水果、蔬菜以及食用与药用菌类,如水稻^[19]、大豆^[20]、小麦^[21-22]、苹果^[23]、猴头菇^[24]、灵芝^[25]、羽衣甘蓝^[26]、薄叶二行芥、羊茛苳以及生菜和菠菜^[27]。坚果是人们日常食用的休闲果品,也可以用于烘焙食品的生产,目前关于坚果类产品的硒生物强化研究报道较少,仅见巴西坚果^[28]。

近些年来,香榧(*Torreya grandis* Fort. ex Lindl.)果实作为休闲食品在我国越来越受到人们的青睐,对新品种选育及其产量研究尤受重视^[29-31],但对其果实的硒生物强化研究很少。作者曾在施用硒肥条件下使用植物根内生真菌印度梨形孢与香榧共生以促进其硒的累积^[32]。本研究对香榧幼苗叶片施加叶面肥亚硒酸钠,然后对其代谢组进行了分析,以期了解硒叶面肥对香榧叶片代谢的影响,探讨硒叶面肥的吸收转化以及有益于人体健康的次生代谢物的累积。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料的培养及其硒肥处理

60株香榧实生幼苗从四川省雅安市业之欣种植专业合作社购买,苗龄2年。将每株香榧幼苗定植于1个塑料花盆(高30 cm,直径25 cm)中。每盆装入等量的园艺培养基质(山东莘县一亩田农业科技有限公司生产)。将花盆连带香榧幼苗移入人工智能温室。根据培养基质的湿度进行水分的日常管理。栽培1年后,将60株幼苗随机分成2组,每组30株,对其中一组的叶片喷洒亚硒酸钠(浓度为100 μg·L⁻¹),另一组作为对照,喷洒去离子水,均以叶面全部喷湿为度。15 d后再重复1次。第二次喷施叶面肥后15 d时采样。本研究只取幼苗中上部枝条上叶龄为1年的叶片为非靶向代谢组分析的实验材料。采样时,因考虑到每株所采的1年叶片数量不足,因而随机采取2棵幼苗上的1年叶片合并为1个样品。处理组和对照组各6个样品,共计12个样品。取样后迅速以无菌水进行4次清洗,然后以液氮进行处理,保存于-80℃冰箱以待分析。

1.2 非靶向代谢组实验方法

1.2.1 代谢物的提取 首先取100 mg液氮研磨

的组织样本,置于EP管中,加入500 μL的80%甲醇水溶液;然后进行涡旋震荡,冰浴静置5 min,离心20 min(15 000 g,4℃)。取一定量的上清加质谱级水稀释至甲醇含量为53%,离心20 min(15 000 g,4℃),收集上清,进样LC-MS进行分析^[33]。所有样品均采用正负离子化模式分析。

色谱仪采用Thermo Fisher(型号:Vanquish UHPLC,德国)。液相色谱分析的条件如下:采用Hypersil Gold column(C18)色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.9 μm),其柱温:40℃;流速:0.2 mL·min⁻¹。正离子化模式下,流动相A:0.1%甲酸;流动相B:甲醇。负离子化模式下,流动相A:5 mmol·L⁻¹醋酸铵,pH 9.0;流动相B:甲醇。液相色谱梯度洗脱程序如表1所示:

表 1 色谱梯度洗脱程序
Table 1 Process of chromatographic gradient elution

时间 Time/min	A/%	B/%
0.0	98	2
1.5	98	2
3.0	15	85
10.0	0	100
10.1	98	2
11.0	98	2
12.0	98	2

质谱仪采用Fermo Fisher(型号:Q ExactiveTM HF,德国)。质谱条件如下:扫描范围选择m/z 100~1 500;ESI源的设置如下:喷雾电压:3.5 kV;鞘气流速:35 psi;辅助气流速:10 L·min⁻¹;离子传输管温度:320℃;离子导入射频电平:60;辅助气加热器温度:350℃;极性:正负离子化模式;MS/MS二级扫描为数据依赖性扫描。氮气(纯度≥99.999%)用作碰撞气以便产生碎片离子,其能量水平设置为正常碰撞能量的30%。

1.2.2 数据预处理和代谢物鉴定 首先将质谱检测得到的原始文件(.raw)导入Compound Discoverer 3.1(以下简称CD3.1)搜库软件中进行处理,对每个代谢物进行保留时间、质荷比(m/z)等参数的简单筛选,然后设置保留时间偏差0.2 min和质量偏差5 mg·kg⁻¹对不同样品进行

峰对齐,使鉴定更准确,随后设置质量偏差 $5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、信号强度偏差 30%、信噪比 3、最小信号强度、加合离子等信息进行峰提取,同时对峰面积进行定量,再整合目标离子,然后通过分子离子峰和碎片离子进行分子式的预测,并与 mzCloud (<https://www.mzcloud.org/>)、mzVault 和 Masslist 数据库进行比对,用 blank 样本去除背景离子,将原始定量结果依据公式:样本原始定量值/(样本代谢物定量值总和/QC1 样本代谢物定量值总和),进行标准化处理,得到相对峰面积;并将质量控制(QC)样本中相对峰面积的变异系数(CV)大于 30% 的化合物删除,最后得到代谢物的鉴定和相对定量结果。数据处理部分基于 Linux 操作系统(CentOS 版本 6.6)以及 R 语言软件包和 Python 软件包进行,其中代谢物定性和定量分析采用 Python 软件(Python-3.5.0);代谢物分类、QC 样本控制、总样品 PCA 分析均采用 R 语言(R-3.4.3)。

1.2.3 数据统计分析

使用 KEGG 数据库(<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)、HMDB 数据库(<https://hmdb.ca/metabolites>)和 LIPIDMaps 数据库(<http://www.lipidmaps.org/>)对鉴定到的代谢物进行注释。多元统计分析部分,使用代谢组学数据处理软件 metaX[6]对数据进行转换后进行主成分分析(PCA)和偏最小二乘法判别分析(PLS-DA),进而得到每个代谢物的 VIP 值。单变量分析部分,基于 t 检验来计算各代谢物在两组间统计学显著性(P 值),并计算代谢物在两组间的差异倍数(fold change, FC)。差异代谢物筛选的默认标准为变量投影重要度(Variable Importance in the Projection, VIP) > 1, P 值 < 0.05 且 $FC \geq 2$ 或 $FC \leq 0.5$ 。火山图用 R 软件包 ggplot2 绘制,可以综合代谢物的 VIP 值、 $\log_2$ (FoldChange) 和 $-\log_{10}$ (p 值) 3 个参数,来筛选感兴趣的代谢物。聚类热图,用 R 软件包 Pheatmap 进行绘制,使用 z-score 对代谢物数据进行归一化。差异代谢物之间的相关性分析(Pearson 相关系数)使用 R 语言中的 cor() 进行,统计显著性通过 R 语言中 cor.mtest() 实现, P 值 < 0.05 为在统计学上显著,并用 R 语言中的 corrplot 软件包绘制相关性图。KEGG 途径气泡图用 R 语言中的软件包 ggplot2 进行绘制。使用 KEGG 数据库来研究代谢物的功能和代谢途径,

当 $x/n > y/N$ 时,认为该代谢途径富集(其中, x 为与该通路相关的差异代谢物的数目; y 为与该通路相关的背景(所有)代谢物的数目; n 为 KEGG 注释的差异代谢物数目; N 为 KEGG 注释的背景(所有)代谢物的数目);当代谢途径的 P 值 < 0.05 时,认为该代谢途径是显著富集的。代谢物差异分析和 KEGG 富集分析均采用 Python-3.5.0 和 R-4.0.3 进行。

2 结果与分析

2.1 总样本和差异代谢物的 PCA 分析

对从 6 个硒处理样本和 6 个对照样本获得的数据,采用 PCA 方法进行归类分析,从总体上反映各组样本之间的总体代谢差异和组内样本之间的变异大小。从图 1 可以看出,在正负离子化模式下,6 个硒处理样本和 6 个对照样本都处于 95% 的置信区间范围内,且 QC 样本非常集中,表明实验数据质量高,可以满足后续的分析。在差异代谢物的总体分布趋势上,无论是在第一主成分方向上还是在第二主成分方向上,正负离子化模式下,硒处理和对照样本的代谢物差异都不大,表明硒处理只引起香榧叶片内少数代谢物发生差异变化(图 2)。

为了确定硒处理和对照之间的代谢物差异,采用有监督的 PLS-DA 模型放大硒处理和对照之间的差异,并建立代谢物表达量与延平类别之间的关系模型。交叉验证结果显示,在正离子化模式下, R2Y (模型对分类变量 Y 的可解释性) 和 Q2Y (模型的可预测性) 分别为 0.95 和 0.53 (图 3A); 在负离子化模式下, R2Y 和 Q2Y 分别为 0.98 和 0.63 (图 3B)。在正负离子化模式下,其 R2Y 和 Q2Y 均大于 0.5,且 R2Y 均大于 Q2Y (图 3A, B)。这些结果表明拟合模型的准确度和预测能力良好。从 PLS-DA 得分图可以看出,在正负离子化模式下,硒处理样本和对照具有非常显著的差别,且全部处于 95% 的置信区间内(图 3A, B)。通过置换检验对模型有效性进行检验,其结果表明原模型具有良好的稳定性,不存在过拟合现象,因为在正负离子化模式下, R2 均大于 Q2,且 Q2 回归线在 Y 轴上的截距小于 0 (图 3C, D)。

2.2 差异代谢物分析

在正离子化模式下,硒处理与对照之间存在 909 种差异代谢物,其中 69 种差异显著(27 种显

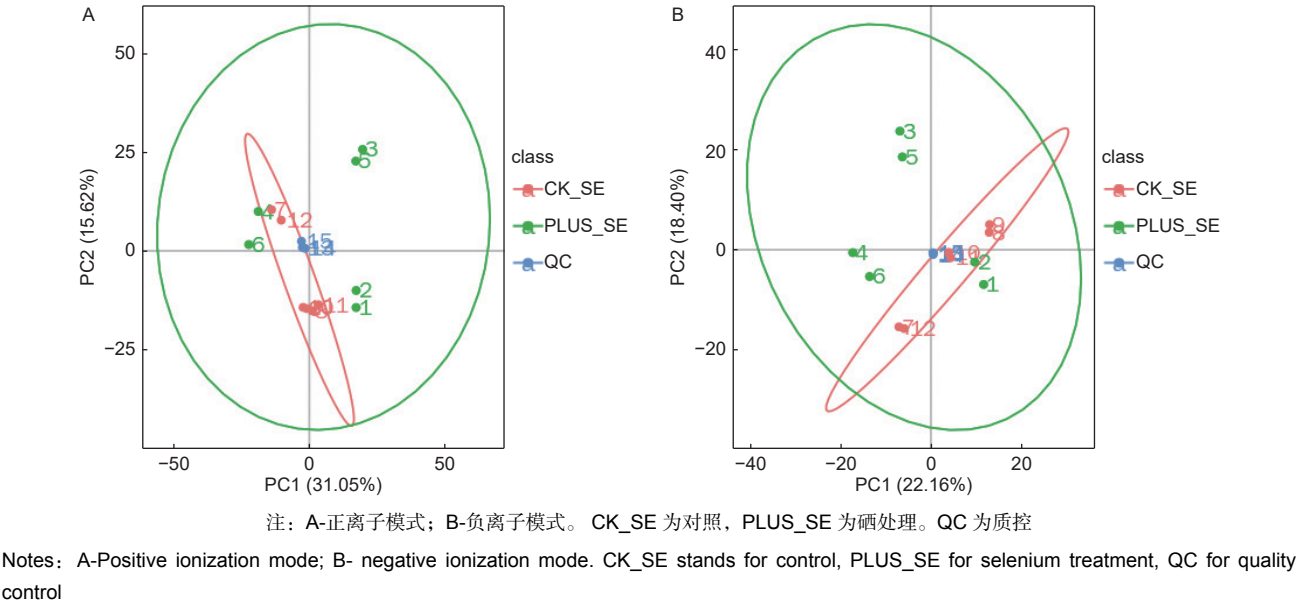


图 1 总样本 PCA 分析
Fig. 1 PCA analysis of total samples

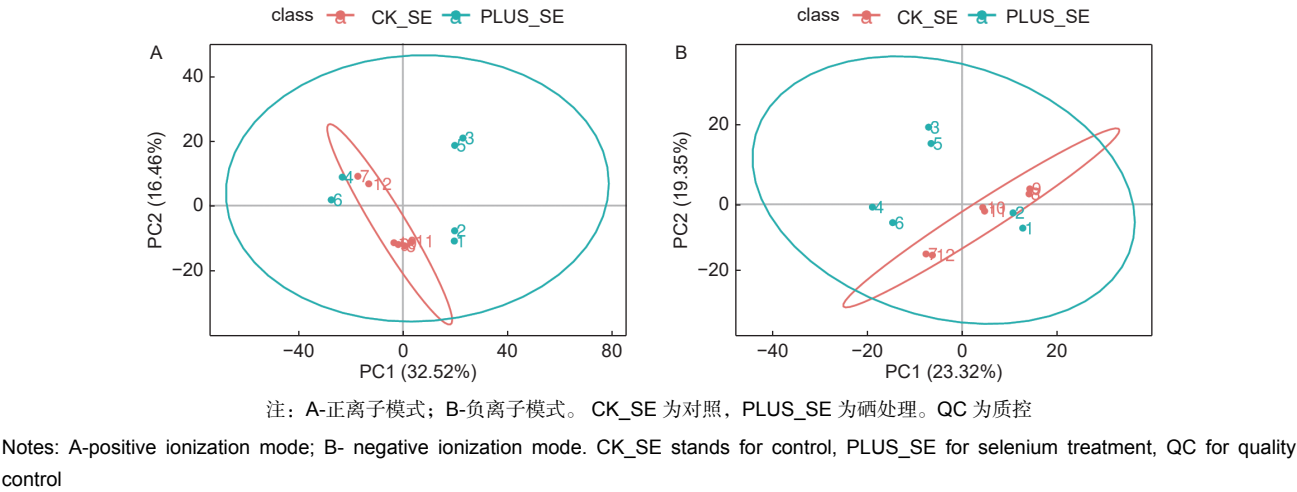


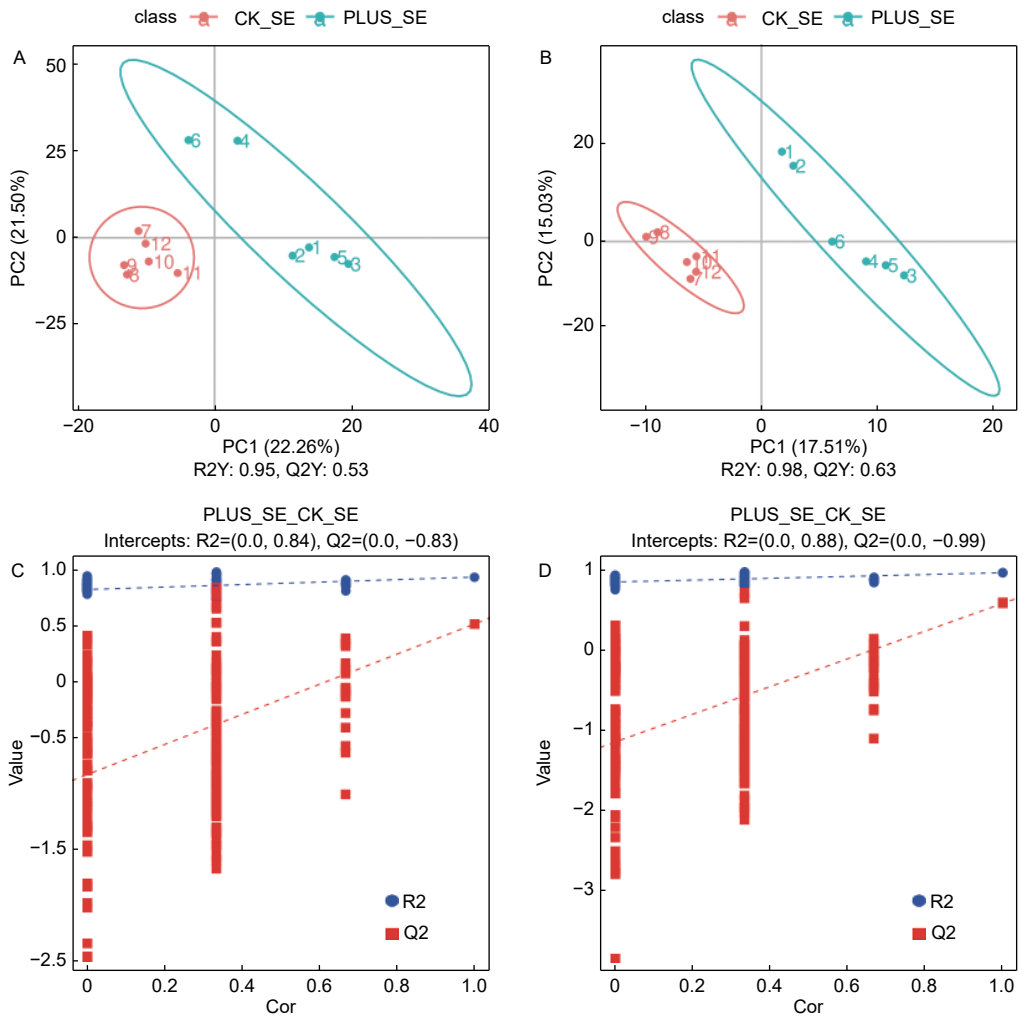
图 2 差异代谢物筛选的 PCA 分析
Fig. 2 PCA used for selection of differential metabolites

著上调，42 种显著下调)；在负离子化模式下，硒处理与对照之间存在 433 种差异代谢物，其中 43 种差异显著 (11 种显著上调，32 种显著下调) (表 2)。其火山图显示，在正负离子化模式下，无论是显著上调的代谢物还是显著下调的代谢物，其 VIP 大致一致 (图 4)。在正离子化模式下，显著上调的代谢物前 3 种为 *N*'-[6-(tert-butyl)thieno [3,2-d]pyrimidin-4-yl]-4-methylbenzohydrazide、4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)-decahydroazulen-6-one 和 butanedioicacid，其上调倍数分别为 7.009、3.179 和 2.718；在负离子化模式下，显著上调的代谢物前 3 种为 polyphyllin

V、C-pentosyl-apigenin *O*-*p*-coumaroylhexoside 和 plantagoside，其上调倍数分别为 3.761、3.399 和 2.827 (表 3)。

2.3 KEGG 通路富集分析

差异代谢物的 KEGG 通路富集结果如表 4 所示。在正离子化模式下，有 27 种 KEGG 通路显著富集；在负离子化模式下，有 11 种 KEGG 通路显著富集。在这些通路中，差异代谢物较多的通路为代谢途径 (9 种差异代谢物)、嘌呤代谢途径 (3 种差异代谢物) 以及 ABC 转运蛋白、氨基乙酰-tRNA 生物合成通路、氨基酸合成通路、核黄素代谢通路、氨基糖和核苷糖代谢通路 (各 2 种差异



注: A, C-正离子模式下的 PLS-DA 模型得分散点图及其置换结果检验; B, D-负离子模式下的 PLS-DA 模型得分散点图及其置换结果检验
Notes: A, C-PLS-DA scores and the related examination result under positive ionization mode; B, D-PLS-DA scores and the related examination result under negative ionization mode

图 3 代谢物筛选的 PLS-DA 分析
Fig. 3 PLS-DA used for selection of differential metabolites

表 2 差异代谢物筛选结果
Table 2 Selective results of differential metabolites

样品比对 Compared samples	代谢物总数 Num. of total ident.	差异显著的代谢物总数 Num. of total Sig.	显著上调代谢物总数 Num. of Sig.up	显著下调代谢物总数 Num. of Sig.down
正离子化模式 + Se vs. CK	909	69	27	42
负离子化模式 + Se vs. CK	433	43	11	32

注: 差异代谢物筛选时, 设定阈值为 $VIP > 1.0$, $FC > 1.2$

Notes: Threshold values were set as $VIP > 1.0$ and $FC > 1.2$ when differential metabolites were selected

代谢物)。

3 讨论

香榧果实作为国内正在兴起的休闲食品, 日益为人们所接收, 其消费量日益扩大。香榧果实的硒

生物强化, 可以适当满足人们对硒的摄入量, 进而增强人们的身体健康。硒肥叶面喷施是一个很好的途径, 在诸如葡萄^[34]、芒果^[35]、黄梨^[36]等上使用, 促进了这些水果的硒的生物强化。然而, 这些报道只对硒叶面肥对果树生长、果实品种等进行了

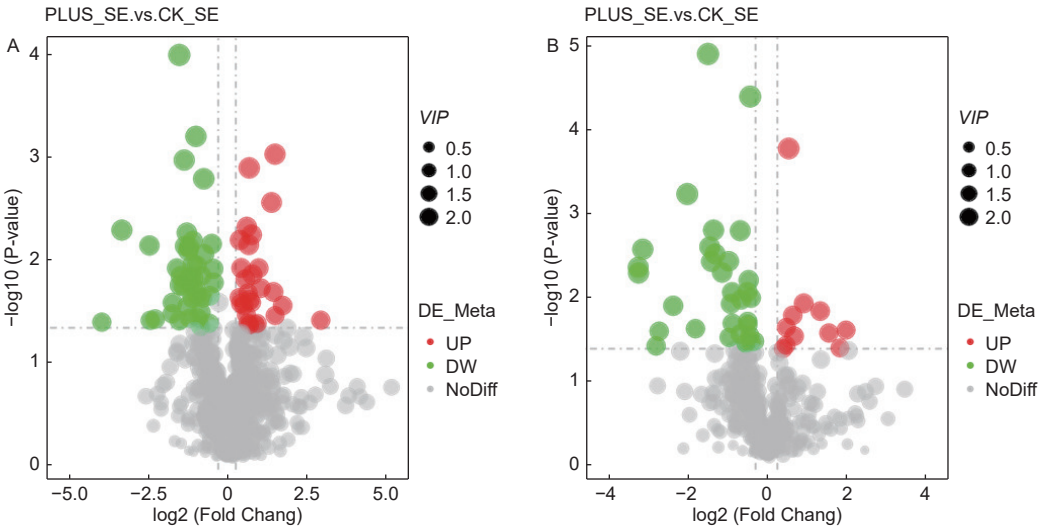


图 4 差异代谢物火山图。A-正离子化模式；B-负离子化模式

Fig. 4 Volcano maps of differential metabolites. A-positive ionization mode; B-negative ionization mode.

表 3 硒肥叶面处理后正负离子化模式下上调最多 10 种差异代谢物

Table 3 Top 10 differential metabolites significantly up-regulated under positive and negative ionization modes in leaves of *Torreya grandis* seedlings after selenium foliar application

差异代谢物名称 Names of metabolites	分子式 Formula	分子量 Molecular weight	滞留时间 RT/min	质荷比 m/z	倍数FC	log2FC	P value
正离子化模式下							
N'-[6-(tert-butyl)thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yl]-4-methylbenzohydrazide	C ₁₈ H ₂₀ N ₄ OS	362.12	4.44	363.13	7.009	2.809	0.041 8
1,4-dihydroxy-1,4-dimethyl-7-(propan-2-ylidene)-decahydroazulen-6-one	C ₁₅ H ₂₄ O ₃	234.16	7.041	235.17	3.179	1.669	0.029 7
butanedioic acid	C ₂₈ H ₃₆ O ₁₀	532.23	6.167	533.24	2.718	1.442	0.037 6
HQH	C ₁₇ H ₂₄ N ₈ O ₅	442.18	7.086	443.18	2.712	1.439	0.000 9
(2,6-dimethylmorpholino)(1-methyl-5-nitro-1H-pyrazol-4-yl)methanone	C ₁₁ H ₁₆ N ₄ O ₄	290.10	1.845	291.11	2.626	1.393	0.021 6
川芎内酯ligustilide	C ₁₂ H ₁₄ O ₂	190.10	7.114	191.11	2.524	1.336	0.002 7
6-唾液乳糖6-sialyllactose	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉	633.21	4.907	634.22	2.021	1.015	0.019 8
阿齐沙坦azilsartan	C ₂₅ H ₂₀ N ₄ O ₅	438.14	1.307	439.14	1.931	0.949	0.012 4
tricin 4'-O-(beta- guaiacylglyceryl) ether	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₁	526.15	5.199	527.15	1.874	0.906	0.045 1
aurantio-obtusin	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330.07	5.005	331.08	1.796	0.844	0.046 2
负离子化模式下							
polyphyllin V	C ₃₉ H ₆₂ O ₁₂	722.42	8.853	721.42	3.761	1.911	0.029 8
C-pentosyl-apigenin O- <i>p</i> - coumaroylhexoside	C ₃₅ H ₃₄ O ₁₆	710.18	5.152	709.17	3.399	1.765	0.048 9
车前苷plantagoside	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₂	466.11	4.792	465.11	2.827	1.499	0.032 2
gracillin	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₇	884.48	8.575	883.47	2.448	1.291	0.017 5
2-aminoethylphosphonate	C ₂ H ₈ NO ₃ P	125.02	4.824	124.02	1.860	0.895	0.014 1
rauwolscine hydrochloride	C ₂₁ H ₂₇ CIN ₂ O ₃	390.17	5.431	389.16	1.586	0.665	0.035 2
phenprobamate	C ₁₀ H ₁₃ NO ₂	179.09	5.521	178.09	1.549	0.632	0.019 7
bruceine A	C ₂₆ H ₃₄ O ₁₁	522.21	5.815	521.20	1.448	0.534	0.000 2
1,2,3-cyclopropanetricarboxylic acid	C ₆ H ₆ O ₆	174.02	1.909	173.01	1.394	0.479	0.027 6
2-aminoadipic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₄	161.07	4.771	160.06	1.386	0.471	0.045 3

表 4 硒肥叶面处理后最富集的 KEGG 通路

Table 4 The most enriched KEGG pathways after selenite treatment

MapID*	MapTitle	P value	x	y	n	N
正离子化模式						
map00230	purine metabolism	0.047 8	3	9	14	139
map00100	steroid biosynthesis	0.100 7	1	1	14	139
map00290	valine, leucine and isoleucine biosynthesis	0.100 7	1	1	14	139
map00232	caffeine metabolism	0.191 9	1	2	14	139
map00261	monobactam biosynthesis	0.191 9	1	2	14	139
map00630	glyoxylate and dicarboxylate metabolism	0.191 9	1	2	14	139
map00904	diterpenoid biosynthesis	0.191 9	1	2	14	139
map00910	nitrogen metabolism	0.191 9	1	2	14	139
map00053	ascorbate and aldarate metabolism	0.274 5	1	3	14	139
map00780	biotin metabolism	0.274 5	1	3	14	139
map02010	ABC transporters	0.305 6	2	11	14	139
map00970	aminoacyl-tRNA biosynthesis	0.346 0	2	12	14	139
map00220	arginine biosynthesis	0.349 2	1	4	14	139
map00240	pyrimidine metabolism	0.349 2	1	4	14	139
map00250	alanine, aspartate and glutamate metabolism	0.349 2	1	4	14	139
map00310	lysine degradation	0.349 2	1	4	14	139
map00750	vitamin B6 metabolism	0.349 2	1	4	14	139
map00860	porphyrin and chlorophyll metabolism	0.349 2	1	4	14	139
map00260	glycine, serine and threonine metabolism	0.416 6	1	5	14	139
map00902	monoterpenoid biosynthesis	0.416 6	1	5	14	139
map00944	flavone and flavonol biosynthesis	0.416 6	1	5	14	139
map00360	phenylalanine metabolism	0.477 6	1	6	14	139
map00945	stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	0.477 6	1	6	14	139
map00960	tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	0.532 6	1	7	14	139
map00941	flavonoid biosynthesis	0.582 1	1	8	14	139
map01230	biosynthesis of amino acids	0.648 7	2	15	14	139
map01100	metabolic pathways	0.800 8	9	80	14	139
负离子化模式						
map00740	riboflavin metabolism	0.013 6	2	2	9	73
map00520	amino sugar and nucleotide sugar metabolism	0.071 7	2	4	9	73
map00750	vitamin B6 metabolism	0.123 2	1	1	9	73
map00040	pentose and glucuronate interconversions	0.232 8	1	2	9	73
map00440	phosphonate and phosphinate metabolism	0.232 8	1	2	9	73
map00710	carbon fixation in photosynthetic organisms	0.330 1	1	3	9	73
map00030	pentose phosphate pathway	0.416 2	1	4	9	73
map00760	nicotinate and nicotinamide metabolism	0.416 2	1	4	9	73
map02010	ABC transporters	0.492 3	1	5	9	73
map01230	biosynthesis of amino acids	0.559 5	1	6	9	73
map01200	carbon metabolism	1	1	8	9	73

*注: (1) MapID: 富集的KEGG Pathway的ID; (2) MapTitle: 富集的KEGG Pathway名称; (3) P value: 富集分析的P value; (4) x: 与该通路相关的差异代谢物的数目; (5) y: 与该通路相关的背景 (所有) 代谢物的数目; (6) n: KEGG注释的差异代谢物数目; (7) N: KEGG注释的背景 (所有) 代谢物的数目

Notes: (1) MapID: the ID of enriched KEGG pathway; (2) MapTitle: name of the enriched KEGG pathway; (3) p value: p value of enrichment analysis; (4) x: the number of differential metabolites related to KEGG pathway; (5) y: the number of all the secondary metabolites related to KEGG pathway; (6) n: the number of differential secondary metabolites annotated in KEGG; (7) N: the number of all the secondary metabolites annotated in KEGG

研究,没有对硒肥施用对果树叶片和果实的代谢组的影响进行探讨。本研究实验结果表明,香榧叶面施加亚硒酸钠上调了许多次生代谢物(表3)。例如,川芎内酯在叶片中增加 2.524 倍(与对照相比,表3)。川芎内酯对人体和动物的生理具有重要影响。如在脑缺血再灌注,川芎内酯可以通过激活依赖于 PINK1/Parkin 的中型噬菌体而减少海马趾神经元的伤害^[37];在低氧口腔癌细胞中,通过激活内质网胁迫信号而诱导依赖于 c-Myc 的细胞凋亡^[38]。该次生代谢物还可以通过 TLR4 通路而促进与癌症相关的纤维组织母细胞的凋亡^[39]。在经过硒肥处理后,其叶片 6-唾液乳糖含量增加 2.021 倍(表3)。有研究表明,人乳中的 6-唾液乳糖通过抑制 toll 样的受体(TLR4)而抑制正在坏死的小肠结肠炎的发展^[40],在血管平滑肌细胞中,它还可以对血管紧张素 II 引起的繁殖、迁移以及成骨性转换具有抑制作用^[41]。在叶面硒肥应用后,阿齐沙坦含量增加 1.931 倍(表3,与对照相比)。阿齐沙坦是一种血管紧张素受体的阻断剂^[42],可用于治疗高血压^[43-44]。此外,该次生代谢物还可以用于治疗高血糖引起的血脑障壁的渗透压力过大^[45]。在施用硒叶面肥后,香榧叶片中车前子苷含量增加 2.827 倍(表3,与对照相比)。该次生代谢物首次从车前(*Plantago asiatica* L.)种子中分离鉴定,为一种新奇的甘露糖苷酶抑制剂,具有抑制免疫反应的作用^[46]。该次生代谢物近来用于治疗猴痘^[47]。由此可见,对香榧叶片喷施亚硒酸钠叶面肥,可以增加很多对人体有益的次生代谢物。如果这些次生代谢物能在香榧果实中累积,无疑可以进入人体而增强人体的各种机能。因此,进一步的实验需要对这些次生代谢物在香榧果实中累积进行分析。然而,正如前面所述,硒进入生物体后要么以离子形式存在,要么以氨基酸和蛋白质形成存在,其含量可能很低,因此,本研究没有检测到含硒的次生代谢物。

KEGG 富集通路分析表明,在亚硒酸钠叶面喷施后,香榧叶片中的代谢途径也发生很大的变化,其中包括黄酮类化合物的生物合成、氨基酸的生物合成以及碳固定途径(表4)。碳固定途径的富集,无疑表明了亚硒酸钠叶面喷施后可增强香榧叶片的光合作用,进而促进光合产物的累积而促进其生长。黄酮类化合物对人体具有非常重要的作

用,如充当抗氧化剂^[48]、抗癌^[49]、消炎^[50]。此外,香榧叶片喷施亚硒酸钠增加了其氨基酸的生物合成,然而均没有涉及到含硒氨基酸的合成通路富集(表4),这可能是质谱图库中没有相应的硒氨基酸合成通路。因此,要检测硒肥使用之后植物叶片中含硒氨基酸的生物合成途径的变化,应该在质谱图对比库中增添含硒氨基酸的图谱。

4 结 论

本研究结果表明,对香榧进行叶面喷施硒肥可以显著改变其代谢物的生物合成,其中一些代谢物对人体健康非常有益,因此香榧叶面喷施硒肥可以促进其叶片中有益于人体健康的代谢物的累积。

参考文献:

- [1] Minich W B. Selenium metabolism and biosynthesis of selenoproteins in the human body[J]. Biochemistry (Mosc), 2022, 87(Suppl 1): S168-S177.
- [2] Gladyshev V N, Arnér E S, Berry M J, et al. Selenoprotein gene nomenclature[J]. J Biol Chem, 2016, 291(46): 24036-24040.
- [3] Elhodaky M, Diamond A M. Selenium-binding protein 1 in human health and disease[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(11): 3437-3450.
- [4] Lei C, Niu X, Ma X, et al. Is selenium deficiency really the cause of Keshan disease?[J]. Environ Geochem Health, 2011, 33(2): 183-188.
- [5] Zhou H, Wang T, Li Q, et al. Prevention of Keshan disease by selenium supplementation: a systematic review and meta-analysis[J]. Biol Trace Elem Res, 2018, 186(1): 98-105.
- [6] Yao Y, Pei F, Kang P. Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease[J]. Nutrition, 2011, 27(11-12): 1095-1100.
- [7] Flores-Mateo G, Navas-Acien A, Pastor-Barriuso R, et al. Selenium and coronary heart disease: a meta-analysis[J]. Am J Clin Nutr, 2006, 84(4): 762-773.
- [8] Cui S, Luo Y, Li Y, et al. Selenium alleviates heart remodeling through Sirt1/AKT/GSK-3 β pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2022, 111: 109158.
- [9] Yuan S, Mason A M, Carter P, et al. Selenium and cancer risk: Wide-angled Mendelian randomization analysis[J]. Int J Cancer, 2022, 150(7): 1134-1140.
- [10] Rua R M, Nogales F, Carreras O, et al. Selenium, selenoproteins and cancer of the thyroid[J]. J Trace Elem Med Biol, 2023, 76: 127115.
- [11] Gorini F, Sabatino L, Pingitore A, et al. Selenium: an element of life essential for thyroid function[J]. Molecules, 2021, 26(23):

- 7084.
- [12] Wang F, Li C, Li S, *et al.* Selenium and thyroid diseases[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1133000.
- [13] Alcolea V, Pérez-Silanes S. Selenium as an interesting option for the treatment of Chagas disease: A review[J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 206: 112673.
- [14] Martín-Escolano R, Etxebeste-Mitxelorena M, Martín-Escolano J, *et al.* Selenium derivatives as promising therapy for Chagas disease: in vitro and in vivo studies[J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7(6): 1727-1738.
- [15] Hossain A, Skalicky M, Brestic M, *et al.* Selenium biofortification: roles, mechanisms, responses and prospects[J]. *Molecules*, 2021, 26(4): 881.
- [16] Ye Y, Qu J, Pu Y, *et al.* Selenium biofortification of crop food by beneficial microorganisms[J]. *J Fungi (Basel)*, 2020, 6(2): 59.
- [17] Yang D, Hu C, Wang X, *et al.* Microbes: a potential tool for selenium biofortification[J]. *Metallomics*, 2021, 13(10): mfab054.
- [18] Duborská E, Šebesta M, Matulová M, *et al.* Current strategies for selenium and iodine biofortification in crop plants[J]. *Nutrients*, 2022, 14(22): 4717.
- [19] Zhang L, Chu C. Selenium uptake, transport, metabolism, reutilization, and biofortification in rice[J]. *Rice (N Y)*, 2022, 15(1): 30.
- [20] Silva M A, de Sousa G F, Corguinha A P B, *et al.* Selenium biofortification of soybean genotypes in a tropical soil via Se-enriched phosphate fertilizers[J]. *Front Plant Sci*, 2022, 13: 988140.
- [21] Liu Y, Huang S, Jiang Z, *et al.* Selenium biofortification modulates plant growth, microelement and heavy metal concentrations, selenium uptake, and accumulation in black-grained wheat[J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 748523.
- [22] Lei H, Zhou M, Li B, *et al.* Humic acid chelated selenium is suitable for wheat biofortification[J]. *J Sci Food Agric*, 2023, 103(10): 4887-4898.
- [23] Groth S, Budke C, Neugart S, *et al.* Influence of a selenium biofortification on antioxidant properties and phenolic compounds of apples (*Malus domestica*)[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(2): 187.
- [24] Hu T, Hui G, Li H, *et al.* Selenium biofortification in *Hericium erinaceus* (Lion's Mane mushroom) and its in vitro bioaccessibility[J]. *Food Chem*, 2020, 331: 127287.
- [25] Xu M, Zhu S, Wang L, *et al.* Influence of Selenium Biofortification on the Growth and Bioactive Metabolites of *Ganoderma lucidum*[J]. *Foods*, 2021, 10(8): 1860.
- [26] Golob A, Novak T, Maršić N K, *et al.* Biofortification with selenium and iodine changes morphological properties of *Brassica oleracea* L. var. *gongylodes* and increases their contents in tubers[J]. *Plant Physiol Biochem*, 2020, 150: 234-243.
- [27] Francini A, Quattrini E, Giuffrida F, *et al.* Biofortification of baby leafy vegetables using nutrient solution containing selenium[J]. *J Sci Food Agric*, 2023, 103(11): 5472-5480.
- [28] Manfio D, Rodrigues M N F, Savi G D, *et al.* Brazil nut (*Bertholletia excels* H. B. K.) selenium distribution and physical chemical characteristics of shell, brown skin and edible part from two Amazon regions[J]. *Asian J Agri Rural Dev*, 2012, 2(2): 287-293.
- [29] 陈红星, 陈素贞, 张 迟, 等. 香榧新品种'玉山果榧'的选育[J]. *中国果树*, 2021 (8): 79-80, 109.
- [30] 胡文翠, 张 迟, 厉 锋, 等. 香榧良种'朱岩榧'的选育[J]. *果树学报*, 2021, 38 (3): 455-458.
- [31] 任少华, 龙成昌, 王 陈, 等. 香榧及其优质高产栽培技术探讨[J]. *现代园艺*, 2021, 44 (19): 72-74.
- [32] 李爱华, 许秀环, 李金柱, 等. 施加硒肥条件下的印度梨形孢接种对香榧幼苗根系发育、气体交换及其叶片硒累积的影响[J]. *安徽农业大学学报*, 2022, 49 (5): 735-740.
- [33] Want E J, Masson P, Michopoulos F, *et al.* Global metabolic profiling of animal and human tissues via UPLC-MS[J]. *Nature Protocols*, 2012, 8(1): 17-32.
- [34] 阙小峰, 余 雁, 方志成, 等. 葡萄叶面肥硒特性及可溶态硒分布研究[J]. *湖北农业科学*, 2022, 61 (7): 31-34.
- [35] 陈锦平, 农梦玲, 何景云, 等. 不同硒肥处理对芒果果实硒含量及品种的影响[J]. *热带农业科学*, 2021, 41 (6): 1-5.
- [36] 王永刚. 氨基酸硒叶面肥在晚秋黄梨上的应用效果[J]. *河北果树*, 2017, 168 (4): 3-5.
- [37] Mao Z G, Tian L Y, Liu J, *et al.* Ligustilide ameliorates hippocampal neuronal injury after cerebral ischemia reperfusion through activating PINK1/Parkin-dependent mitophagy[J]. *Phytomedicine*, 2022, 101: 154111.
- [38] Hsu R J, Peng K Y, Hsu W L, *et al.* Z-ligustilide induces c-Myc-dependent apoptosis via activation of ER-stress signaling in hypoxic oral cancer Cells[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 824043.
- [39] Ma J, Mei J, Lu J, *et al.* Ligustilide promotes apoptosis of cancer-associated fibroblasts via the TLR4 pathways[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 135: 110991.
- [40] Sodhi C P, Wipf P, Yamaguchi Y, *et al.* The human milk oligosaccharides 2'-fucosyllactose and 6'-sialyllactose protect against the development of necrotizing enterocolitis by inhibiting toll-like receptor 4 signaling[J]. *Pediatr Res*, 2021, 89(1): 91-101.
- [41] Nguyen T L L, Jin Y, Kim L, *et al.* Inhibitory effects of 6'-sialyllactose on angiotensin II-induced proliferation, migration, and osteogenic switching in vascular smooth muscle cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2022, 45(9): 658-670.
- [42] Zaiken K, Cheng J W. Azilsartan medoxomil: a new Angiotensin receptor blocker[J]. *Clin Ther*, 2011, 33(11): 1577-1589.
- [43] Baker W L, White W B. Azilsartan medoxomil: a new angiotensin II receptor antagonist for treatment of

hypertension[J]. *Ann Pharmacother*, 2011, 45(12): 1506-1515.

[44] Pradhan A, Tiwari A, Sethi R. Azilsartan: Current Evidence and Perspectives in Management of Hypertension[J]. *Int J Hypertens*, 2019, 2019: 1824621.

[45] Han J, Tang H, Yao L, *et al*. Azilsartan protects against hyperglycemia-induced hyperpermeability of the blood-brain barrier[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 3621-3633.

[46] Yamada H, Nagai T, Takemoto N, *et al*. Plantagoside, a novel alpha-mannosidase inhibitor isolated from the seeds of *Plantago asiatica*, suppresses immune response[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 165(3): 1292-1298.

[47] Bajrai L H, Alharbi A S, El-Day M M, *et al*. Identification of Anti-viral Compounds against Monkeypox Virus Profilin-like Protein A42R from *Plantago lanceolata*[J]. *Molecules*, 2022, 27(22): 7718.

[48] Rodríguez-Arce E, Saldías M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112236.

[49] Gul S, Maqbool M F, Zheng D, *et al*. Alpinetin: a Dietary Flavonoid with Diverse Anticancer Effects[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2022, 194(9): 4220-4243.

[50] Serafini M, Peluso I, Raguzzini A. Flavonoids as anti-inflammatory agents[J]. *Proc Nutr Soc*, 2010, 69(3): 273-278.

Effects of Foliar Spray of Selenite on Metabolome in Leaves of *Torreya grandis* Seedlings

CHEN Zhen-sheng¹, LI Ai-hua², DU Shi-ping², HUANG Pei-geng¹,
XU Xiu-huan², NING Bo-lin¹, LI Wen¹

(1. Bobai National Forest Farm of Guangxi, Bobai 537617, Guangxi, China;
2. Forestry Academy of Hubei, Wuhan 430075, Hubei, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of foliar spray of selenite on metabolome in the leaves of *Torreya grandis* seedlings and changes in levels of secondary metabolites in the leaves. [Method] Sodium selenite of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was sprayed to the leaves of 2-year-old seedlings of *T. grandis* at an interval of 15 days. 15 days after the second spraying, one-year-old leaves were harvested for metabolome analysis. [Result] The results showed that there were 909 differential metabolites between treatment group and control under positive ionization mode, with 69 metabolites of significant changes (27 metabolites up-regulated and 42 metabolites down-regulated). Under negative ionization mode, 433 differential metabolite occurred between treatment group and control, with 43 differential metabolites of significant changes (11 metabolites up-regulated and 32 metabolites down-regulated). Some metabolites beneficial to human health increased significantly in the treated leaves of *T. grandis* seedlings, such as plantagoside (increasing 2.827 times as control), ligustilide (increasing 2.524 times) , 6-sialyllactose (increasing 2.021 times), and azilsartan (increasing 1.931 times). [Conclusion] The results indicate that selenite foliar application on the leaves of *T. grandis* can increase biosynthesis of beneficial metabolites and accumulation in their leaves.

Keywords: *Torreya grandis*; selenium fertilizer; metabolome; biofortification

(责任编辑：彭南轩)