

有机肥对栀子果实中关键代谢产物作用机制的研究

龚伟伟, 张寿文, 朱 佩, 王梦超, 蔡雅婷, 罗扬婧, 罗光明*
(江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004)

摘要: **目的** 探讨有机肥对栀子果实中关键代谢产物的作用机制。**方法** 采用非靶向代谢组学、UPLC-Q-TOF-MS 法对 4 种施肥处理的样品进行定性、定量分析, 主成分分析 (PCA)、正交偏最小二乘判别分析 (OPLS-DA) 对关键代谢产物进行筛选, 系统聚类分析考察关键代谢产物变化趋势以及样品之间聚类情况, KEGG 分析对关键代谢产物进行注释和合成通路富集分析。**结果** 共鉴定出 104 种代谢产物, 其中 38 种为关键代谢产物。经 KEGG 分析, 有 34 种关键产物被注释到, 13 种物质合成途径被映射到。**结论** 本实验结合非靶向代谢组学、化学计量学、KEGG 合成通路富集分析, 揭示有机肥对栀子果实中关键代谢产物的作用机制。

关键词: 栀子果实; 有机肥; 关键代谢产物; 作用机制

中图分类号: R282 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)07-2431-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.07.057

栀子为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟的果实, 迄今为止已从其果实中鉴定出二百多种代谢物, 主要包括环烯醚萜类、黄酮类和黄酮苷类、奎宁酸及奎宁酸衍生物、萜类、生物碱等。其中, 二萜类化合物环烯醚萜类、藏红花酸等为其特征性物质; 环烯醚萜类化合物京尼平苷对急性肝损伤、胆汁淤积、非酒精性脂肪性肝炎、肝纤维化、肝癌有治疗作用; 二萜类化合物西红花苷 I 也是水溶性胡萝卜素类化合物, 被应用于食品添加剂、食用色素、服装高级染料^[1-3]。

代谢组学根据研究目的不同, 主要分为非靶向代谢谱分析、靶向代谢谱分析。其中, 前者主要是对生物样品提取物进行质谱检测, 获取代谢产物定性、定量信息, 筛选出差异代谢产物, 通过生物信息分析, 探讨生物体体内代谢产物与体外生理表征的相对关系, 阐明生物体代谢相关过程的代谢组学技术, 而后者主要区别于定性和定量特定的代谢产物^[4-5]。

有机肥能促进土壤有机碳矿化, 有利于其壤固氮培肥, 同时其所含氮素也有助于稳定氮循环和农业生态系统的可持续发展。邓秋林等^[6]报道, 它可提高麦冬中皂苷类、黄酮类代谢, 尤其是麦冬甲基黄烷酮 A、麦冬甲基黄烷酮 B 含量; 周芳等^[7]发现, 它对白术中倍半萜类白术内酯 I、II、III 含量有显著提高作用, 但尚无采用代谢组学方法研究施有机肥对栀子果实中代谢产物的作用机制。

本实验采用非靶向代谢组学、UPLC-Q-TOF-MS 法, 对 4 种施肥处理 (空白组、低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组) 栀子果实中内源性代谢产物进行定性、定量分析, 无监督模式主成分分析 (PCA)、有监督模式正交

偏最小二乘法-判别分析 (OPLS-DA), 进行关键代谢产物筛选, 无监督模式层次聚类分析 (HCA), 分析关键代谢产物变化趋势以及样品之间聚类情况, 京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 数据库对筛选出的内源关键代谢产物进行注释, 并对其进行合成通路富集分析, 探究有机肥对该部位中关键代谢产物的作用机制。

1 材料与方法

1.1 植物来源、生长条件和实验设计 本实验于 2020 年在江西省抚州市临川区栀子示范基地 (116°38'13"E, 27°34'10"N) 进行, 当地为亚热带季风性湿润气候, 全年平均气温 7~18℃, 日照时数 1 600~1 900 h, 无霜期 233~313 d, 年平均降雨量 1 700 mm 以上; 土壤条件为有机质含量 4.5 g/kg, pH 值 4.03, 全氮含量 1 750 mg/kg, 水解性氮 87.5 mg/kg, 全磷含量 739 mg/kg, 有效磷含量 15.8 mg/kg, 全钾含量 810 mg/kg, 速效钾含量 164 mg/kg。

以 4 年树龄的黄栀子为研究对象, 株高 0.75 m, 株行间距 3.0 m×1.5 m。肥料选择有机肥 (有机质≥45%, N+P₂O₅+K₂O≥12%, 微生物活菌≥1 亿/g)。实验采用随机区组设计, 设置 4 个处理, 增施量分别为空白组 (0 kg/株)、低量有机肥组 (2 kg/株)、中量有机肥组 (5 kg/株)、高量有机肥组 (8 kg/株), 每个处理重复 5 次, 共 20 个样本。药材经江西中医药大学药学院付小梅教授鉴定均为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实, 采集后浸煮 10~15 min 杀青, 置于 55℃烘箱中干燥 3~4 d, 粉碎, 过 4 号筛, 密封, 在 4℃下保存。

1.2 代谢组学样品制备 精密称取样品粉末 (过 3 号筛) 0.2 g, 置于具塞锥形瓶中, 精密加入 70% 甲醇, 称定质

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (6351803702)

作者简介: 龚伟伟 (1995—), 男, 硕士生, 从事中药资源开发与利用研究。Tel: 17138082278, E-mail: 3064769752@qq.com

* 通信作者: 罗光明 (1957—), 男, 教授, 博士生导师, 从事中药资源开发与利用研究。Tel: 13870809789, E-mail: jzlgm@163.com

量, 超声处理 30 min, 放冷, 70% 甲醇补足减失的质量, 摇匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液, 即得。

1.3 UPLC-Triple-TOF-MS 分析条件

1.3.1 仪器 L30A UPLC 型液相色谱系统 (日本岛津公司); AB SCIEX Triple TOF 5600 高分辨质谱仪 (美国赛默飞世尔科技公司); Welch UltimateR UHPLC XB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) [月旭科技 (上海) 股份有限公司]。

1.3.2 色谱 Welch UltimateR UHPLC XB-C₁₈ 色谱柱 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm); 流动相水 (含 0.1% 甲酸) (A) - 乙腈 (含 0.1% 甲酸) (B), 梯度洗脱 (0~0.01 min, 10% B; 0.01~2.5 min, 10% B; 2.5~7.5 min, 15% B; 10~15 min, 15% B; 15~17.5 min, 20% B; 17.5~25 min, 20% B; 25~30 min, 25% B; 30~37.5 min, 30% B; 37.5~40 min, 30% B; 40~45 min, 40% B); 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 3 μL。

1.3.3 质谱 电喷雾离子源; 正负离子扫描, 全扫描模式; 正离子喷雾电压 5 500 V, 负离子喷雾电压 4 500 V; 鞘气流量 40 arb; 辅助气流量 20 arb; 离子源温度 550 ℃; MS、MS/MS 扫描范围 *m/z* 50~1 500。

1.4 数据统计与预处理 采用 UHPLC-Q-TOF-MS 技术获取样品原始数据, Progenesis QI 2.0 软件对原始数据进行预处理, 即对筛选的信号峰进行完整性检测和缺失值处理、数据过滤、归一化等, 获取信号峰保留时间、信号峰强度 (峰面积)、MS/MS 离子碎片信息。采用 HMDB、METLIN、MassBank 数据库比对检测样品中信号峰, 以 MS/MS 离子碎片匹配鉴定代谢产物。采用 PCA、OPLS-DA 分析筛选样品关键代谢产物, HCA 分析关键代谢产物变化趋势及样品之间聚类情况。

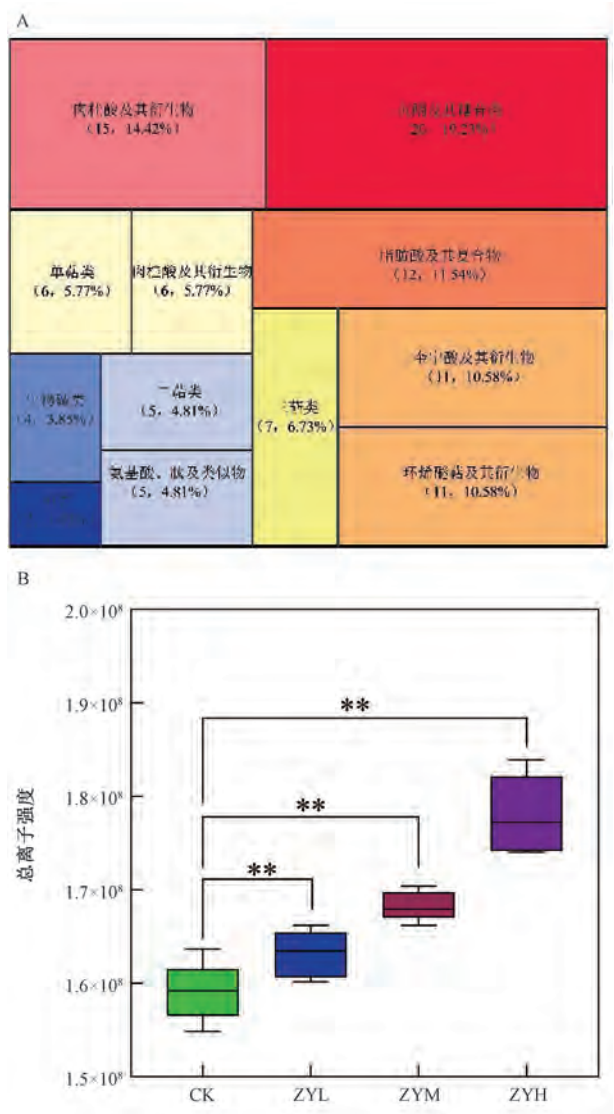
1.5 KEGG 注释、代谢产物合成通路富集分析 KEGG 是一种整合了基因组、化合物、系统功能信息的数据库, 其通路富集分析用于反映代谢产物的生物体内代谢合成途径^[8-9]。采用 KEGG 数据库对筛选出的内源差异性代谢产物进行注释, 并对其进行代谢合成途径分析, 以揭示增施有机肥对 梔子果实中差异性代谢产物的作用机制。

2 结果

2.1 内源性代谢产物鉴定 正、负离子模式下分别获得 281、338 个离子峰, 并对相对峰强度较高的 104 个离子峰进行识别, 可分为 12 类, 按类别数量和比例排序, 依次为环烯醚萜及其衍生物 (11 个, 10.58%)、黄酮及其糖苷类 (20 个, 19.23%)、奎宁酸及其衍生物 (11 个, 10.58%)、肉桂酸及其衍生物 (15 个, 14.42%)、脂肪酸及其复合物 (12 个, 11.54%)、三萜类 (7 个, 6.73%)、香豆素及其衍生物 (6 个, 5.77%)、单萜类 (6 个, 5.77%)、二萜类 (5 个, 4.81%)、氨基酸、肽及类似物 (5 个, 4.81%)、生物碱类 (4 个, 3.85%)、糖类 (2 个, 1.92%), 见图 1A。

再通过对标准化后内源性代谢产物进行半定量分析

(离子强度), 计算每个样品中代谢产物总含量 (即总离子强度), 发现不同施肥处理的 梔子果实中内源性代谢产物总含量存在显著差异, 见图 1B。与空白组比较, 低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组的 梔子果实中代谢产物总含量有显著差异 ($P<0.01$)。4 种施肥处理 梔子果实中代谢产物的总含量依次为高量有机肥组 (1.78×10^8) > 中量有机肥组 (1.68×10^8) > 低量有机肥组 (1.63×10^8) > 空白组 (1.59×10^8)。



注: CK、ZYL、ZYM、ZYH 分别为空白组、低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组。图 1A 中每种颜色代表一类代谢产物, 所在区域的面积越大, 此类代谢产物数量、占比越大; 图 1B 中, ** $P<0.01$ 。

图 1 4 种施肥处理 梔子果实中成分分析

2.2 关键代谢物分析

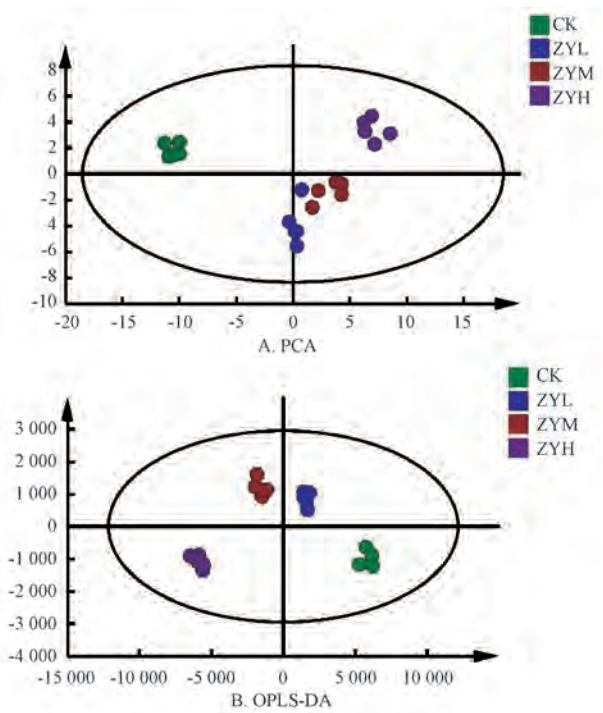
2.2.1 梔子果实变异趋势 对 20 批样品 (空白组、低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组各 5 个) 进行多元变量统计分析, 结果见图 2。由此可知, 来自相同有机肥处理的样品集聚在一起, 表明施肥实验具有良好的重复

性；各组样品分散在不同区域，表明其代谢产物含量存在差异；与空白组比较，离散趋势依次为高量有机肥组>中量有机肥组>低量有机肥组，表明随着有机肥施增量增加，栀子果实中代谢产物含量变异更明显。

2.2.2 关键代谢物 PCA 分析可对所有变量按一定权重系数进行线性组合形成新的特征变量，由于没有外部人为因素，可反映数据的主要原始信息。OPLS-DA 用于过滤噪声，提高模型的分析能力和有效性，消除抽样误差和其他随机误差，有效区分样本并提取差异变量的信息，并最大化评估组之间的差异。S-plot 是对关键代谢产物进行可视化处理，反映每个变量与模型之间的协方差和相关性，代谢产物位置距原点越远，它对关键代谢产物的贡献越大，故被用于识别关键代谢产物的筛选^[10-12]。

采用 OPLS-DA 分析成对筛选空白组与低量有机肥组、空白组与中量有机肥组、空白组与高量有机肥组中的关键代谢产物，模型参数见表 1，结果见图 3。由此可知，3 组 X 轴总解释率、Y 轴总解释率、累计预测率均接近 1，表明模型对样品中的信息解析能力、预测能力较强；经过 200 次迭代置换检验，3 组截距 R^2 均接近于 1，而且 Q^2 均低于 R^2 ，表明模型稳定性较好，未过度拟合。

以变量重要性投影（VIP 值） ≥ 1 、 $P < 0.05$ 、S-plot $|P(X)| \geq 0.05$ 、 $|P(Y)| \geq 0.5$ 为标准，对 104 个

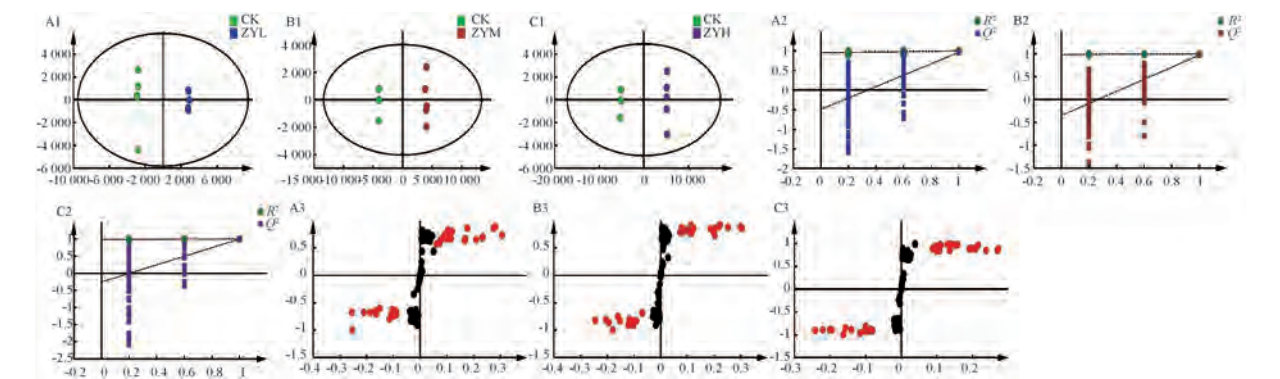


注：CK、ZYL、ZYM、ZYH 分别为空白组、低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组。

图 2 多元变量统计分析 Score 图

表 1 OPLS-DA 模型参数

组别	X 轴总解释率	Y 轴总解释率	累计预测率	组成部分	置换次数/次	截距 R^2	截距 Q^2
空白组与低量有机肥组	0.841	0.998	0.961	1 个预测值、3 个正交值	200	0.954	-0.491
空白组与中量有机肥组	0.894	0.999	0.971	1 个预测值、3 个正交值	200	0.984	-0.349
空白组与高量有机肥组	0.311	0.998	0.995	1 个预测值、3 个正交值	200	0.982	-0.257



注：CK、ZYL、ZYM、ZYH 分别为空白组、低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组。左上角编号中 A~C 分别为空白组与低量有机肥组、空白组与中量有机肥组、空白组与高量有机肥组，1~3 分别为 Score 图、Permutation Test 图、S-plot 图。S-plot 图中每个着色点代表 1 种代谢产物，红色点表示贡献较大，黑色点表示贡献较小。

图 3 OPLS-DA 分析图

代谢产物进行关键代谢产物筛选，结果见表 2、图 3。由此可知，共筛选出 38 个关键代谢产物，主要分为 7 类，分别为氨基酸、肽及类似物 1 种（亚叶酸）、肉桂酸及其衍生物 3 种（对甲氧基肉桂醛、没食子酸丙酯、阿魏酸）、二萜类 3 种（藏红花素、西红花苷 I、西红花苷 II）、脂肪酸及其复合物 8 种（棕榈酸、反式-茉莉酮、桉油醇等）、奎宁酸及其衍

生物 5 种（绿原酸、咖啡酸、奎尼酸等）、黄酮及其糖苷类 12 种（芦丁、山柰酚-3-龙胆二糖苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷、槲皮素等）、环烯醚萜及其衍生物 6 种（京尼平苷酸、京尼平苷、京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷、去乙酰基车叶草苷酸等）。另外，上调代谢产物有 22 个，占比 57.89%；下调代谢产物有 16 个，占比 42.11%，见表 2、图 4A~4B。

表 2 关键代谢产物

名称	分子式	相对分子质量	VIP 值	差异倍数	<i>P</i> 值	最高平均值	最低平均值
叶酸	C ₂₀ H ₂₃ N ₇ O ₇	473. 165 9	1. 170	0. 717	<0. 05	ZYL	ZYH
对甲氧基肉桂醛	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162. 068 2	2. 288	0. 635	<0. 05	ZYH	ZYL
没食子酸丙酯	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	814. 822 3	2. 178	0. 794	<0. 05	ZYH	ZYL
咖啡酸	C ₉ H ₈ O ₄	180. 042 3	1. 126	1. 176	<0. 05	ZYL	ZYH
西红花苷 I	C ₄₄ H ₆₄ O ₂₄	976. 378 8	3. 157	1. 250	<0. 05	ZYL	ZYH
藏红花素	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	328. 167 5	1. 751	0. 870	<0. 05	ZYL	ZYH
西红花苷 II	C ₃₈ H ₅₄ O ₁₉	814. 828 5	1. 277	1. 775	<0. 05	ZYH	ZYL
棕榈酸	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256. 240 2	2. 329	0. 600	<0. 05	ZYH	ZYL
组氨酸	C ₁₃ H ₁₀ O ₅	246. 052 8	2. 307	1. 258	<0. 05	ZYL	ZYH
反式-茉莉酮	C ₁₁ H ₁₆ O	164. 120 1	1. 107	1. 267	<0. 05	ZYH	ZYL
亚油酸	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	280. 240 2	1. 136	1. 155	<0. 05	ZYL	ZYH
十二烷酸	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200. 177 6	1. 126	0. 786	<0. 05	ZYM	ZYH
绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354. 095 0	1. 133	1. 237	<0. 05	ZYH	ZYL
α-亚麻酸	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	278. 224 6	1. 041	0. 823	<0. 05	ZYH	ZYL
桉树醇	C ₁₀ H ₁₈ O	154. 135 7	1. 038	1. 241	<0. 05	ZYH	ZYL
山柰酚-3- <i>O</i> -洋槐糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594. 158 5	2. 376	1. 268	<0. 05	ZYH	ZYL
芦丁	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610. 153 4	2. 171	0. 777	<0. 05	ZYH	ZYL
京尼平	C ₁₁ H ₁₄ O ₅	226. 084 1	2. 161	1. 255	<0. 05	ZYL	ZYH
川陈皮素	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	402. 131 5	2. 000	0. 836	<0. 05	ZYH	ZYL
异槲皮素	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464. 095 4	1. 560	1. 642	<0. 05	ZYH	ZYL
槲皮素 3- <i>O</i> -芸香糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610. 153 2	1. 491	1. 477	<0. 05	ZYH	ZYL
槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302. 042 6	1. 418	1. 435	<0. 05	ZYH	ZYL
圣草酚	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	288. 063 4	1. 418	1. 587	<0. 05	ZYL	ZYH
紫云英苷	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	448. 100 5	1. 344	1. 893	<0. 05	ZYH	ZYL
山柰酚	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274. 084 1	1. 134	0. 852	<0. 05	ZYL	ZYH
根皮素	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	274. 084 1	1. 134	1. 324	<0. 05	ZYL	ZYH
黄酮体-7-葡萄糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₁	516. 163 2	1. 096	0. 901	<0. 05	ZYH	ZYL
甲基十六烷酸	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270. 255 8	2. 990	1. 497	<0. 05	ZYL	ZYH
京尼平苷酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₀	374. 121 3	2. 804	0. 815	<0. 05	ZYH	ZYL
京尼平苷	C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀	388. 136 9	2. 627	1. 161	<0. 05	ZYH	ZYL
京尼平-1-β- <i>D</i> -龙胆二糖苷	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	550. 189 7	2. 070	1. 501	<0. 05	ZYL	ZYH
山柰酚-3 龙胆双糖苷	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610. 153 3	2. 093	1. 555	<0. 05	ZYH	ZYM
去乙酰基车叶草苷酸	C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁	390. 116 2	1. 968	1. 739	<0. 05	ZYL	ZYH
隐绿原酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354. 095 2	1. 153	0. 807	<0. 05	ZYH	ZYL
阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194. 057 9	1. 216	0. 785	<0. 05	ZYH	ZYL
油酸	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	354. 095 1	1. 044	0. 865	<0. 05	ZYL	ZYH
肉桂酸甲酯	C ₁₀ H ₁₀ O ₂	162. 068 1	1. 021	0. 901	<0. 05	ZYL	ZYH
奎宁酸	C ₇ H ₁₂ O ₆	192. 063 4	1. 018	1. 164	<0. 05	ZYH	ZYL

注：ZYL、ZYM、ZYH 分别为低量有机肥组、中量有机肥组、高量有机肥组。

2.2.3 层次聚类分析（HCA） 对 38 种差异代谢产物进行 HCA 分析，结果见图 4C。由此可知，4 组样品分别聚为一类，表明组内其代谢产物表达量相近或功能参与产物代谢相似，并且不同代谢产物分组模式有所差异；儿茶酚、亚油酸、奎宁酸、咖啡酸、京尼平苷、山柰酚-3-*O*-洋槐糖苷、桉油醇、反式-茉莉酮、京尼平、根皮素、槲皮素-3-*O*-芸香糖、槲皮素、山柰酚-3-龙胆二糖苷、甲基十六烷酸、西红花苷 I、圣草酚、紫云英苷、京尼平-1-β-*D*-龙胆二糖苷、去乙酰基车叶草苷酸、西红花苷 II、异槲皮苷为一类，高量有机肥组中上述成分表达量高于其他 3 组。

2.2.4 主要成分表达量变化趋势 梔子果实中含有种类丰富的肉桂酸及其衍生物（图 5A）、二萜类（图 5B1~5B3）、环烯醚萜及其衍生物（图 5C1~5C4）、黄酮及其糖苷类（图

5D1~5D4）、奎宁酸及其衍生物类（图 5E1~5E4）。与空白组比较，高量有机肥组中没食子酸丙酯表达量下调了 1. 259 倍，藏红花酸表达量下调了 1. 149 倍，西红花苷 I、西红花苷 II 表达量分别上调了 1. 250、1. 775 倍，京尼平苷酸、京尼平表达量分别下调了 1. 227、1. 255 倍，京尼平苷、京尼平-1-β-*D*-龙胆二糖苷表达量分别上调了 1. 161、1. 501 倍；山柰酚、芦丁表达量分别下调了 1. 174、1. 287 倍，山柰酚 3-龙胆二糖苷、反式-茉莉酮表达量分别上调了 1. 161、1. 477 倍，绿原酸、奎宁酸、去乙酰基车叶草苷酸、槲皮素-3-*O*-芸香糖表达量分别上调了 1. 227、1. 255、1. 739、1. 477 倍，见表 2。

2.3 KEGG 注释、通路分析 在 KEGG 数据库中，38 种关键产物在有 34 种被注释到，经富集分析后被注释的 34 种

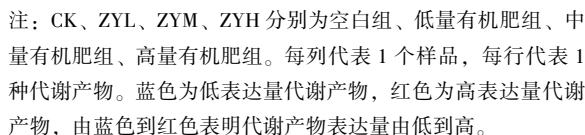


Figure 1 displays 12 box plots (A-L) showing the effect of ZYL, ZYM, and ZYH on the ion intensity of various compounds. The compounds are arranged in a 4x3 grid. Each plot compares four groups: CK (Control), ZYL, ZYM, and ZYH. The y-axis represents ion intensity. Statistical significance is indicated by asterisks (*, **, ***) and brackets.

Compound	CK	ZYL	ZYM	ZYH
A: 没食子酸丙酯	~8.5 × 10 ¹⁰	~7.5 × 10 ¹⁰	~6.5 × 10 ¹⁰	~6.0 × 10 ¹⁰
B1: 藏红花素	~4.8 × 10 ¹⁰	~4.2 × 10 ¹⁰	~4.0 × 10 ¹⁰	~3.5 × 10 ¹⁰
B2: 西红花苷 I	~8.5 × 10 ¹⁰	~1.1 × 10 ¹¹	~1.2 × 10 ¹¹	~1.3 × 10 ¹¹
B3: 西红花苷 II	~1.2 × 10 ¹¹	~1.5 × 10 ¹¹	~1.6 × 10 ¹¹	~1.7 × 10 ¹¹
C1: 京尼苷酸	~9.5 × 10 ¹⁰	~7.5 × 10 ¹⁰	~6.5 × 10 ¹⁰	~6.0 × 10 ¹⁰
C2: 京尼平	~6.0 × 10 ¹⁰	~4.5 × 10 ¹⁰	~3.5 × 10 ¹⁰	~3.0 × 10 ¹⁰
D1: 京尼平	~9.5 × 10 ¹⁰	~1.1 × 10 ¹¹	~1.2 × 10 ¹¹	~1.4 × 10 ¹¹
D2: 京尼平-1-β-D-龙胆二糖苷	~3.5 × 10 ¹⁰	~4.5 × 10 ¹⁰	~5.0 × 10 ¹⁰	~5.5 × 10 ¹⁰
D3: 山奈酚	~2.0 × 10 ¹¹	~1.8 × 10 ¹¹	~1.6 × 10 ¹¹	~1.4 × 10 ¹¹
D4: 山奈酚-3-龙胆双糖苷	~3.0 × 10 ¹¹	~3.5 × 10 ¹¹	~4.5 × 10 ¹¹	~5.5 × 10 ¹¹
E1: 芦丁	~7.5 × 10 ¹⁰	~6.5 × 10 ¹⁰	~5.5 × 10 ¹⁰	~5.0 × 10 ¹⁰
E2: 反式-茉莉酮	~1.8 × 10 ¹¹	~2.0 × 10 ¹¹	~2.2 × 10 ¹¹	~2.4 × 10 ¹¹
E3: 绿原酸	~2.2 × 10 ¹¹	~2.5 × 10 ¹¹	~2.8 × 10 ¹¹	~3.0 × 10 ¹¹
E4: 奎宁酸	~1.4 × 10 ¹¹	~1.6 × 10 ¹¹	~1.8 × 10 ¹¹	~1.9 × 10 ¹¹
E5: 去乙酰车叶草苷酸	~3.5 × 10 ¹¹	~4.0 × 10 ¹¹	~4.5 × 10 ¹¹	~5.0 × 10 ¹¹
E6: 槲皮素3-O-芸香糖苷	~2.8 × 10 ¹¹	~3.0 × 10 ¹¹	~3.5 × 10 ¹¹	~4.0 × 10 ¹¹

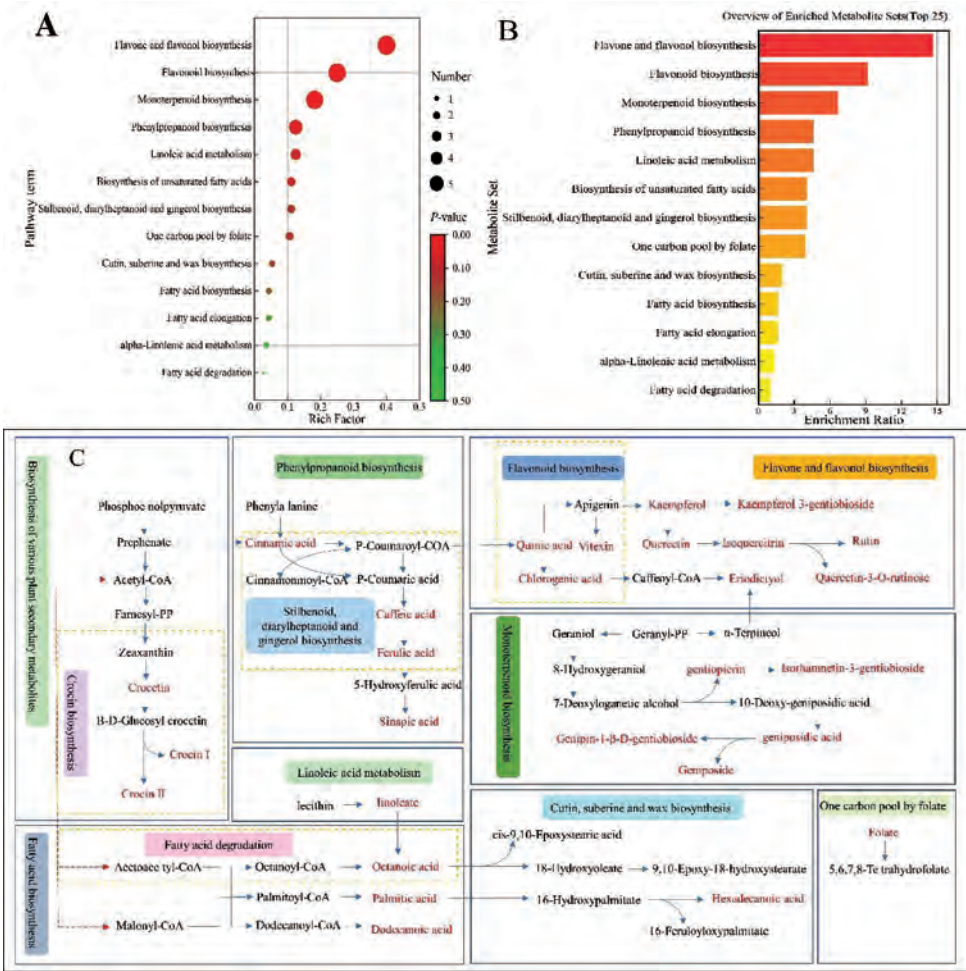
图 5 16 种主要成分表达量变化趋势

研究表明, 梔子果实中京尼平苷酸、京尼平苷、京尼平-1- β -D-龙胆二糖苷、去乙酰基车叶草苷酸等环烯醚萜类成分及其衍生物由单萜生物合成代谢途径合成, 其前体物质为牻牛儿基焦磷酸三铵盐; 藏红花素、西红花苷 I、西红花苷 II 等二萜类成分由藏红花素生物合成代谢途径合成, 其前体物质为磷酸醇丙酮酸盐; 芦丁、山柰酚、3-龙胆二糖苷、槲皮素-3-O-芸香糖、槲皮素等黄酮及其糖苷类成分由黄酮、黄酮醇类成分生物合成代谢途径和黄酮类成分生物合成代谢途径共同合成; 其他代谢产物由相应生物合成途径共同参与代谢。

植物生长发育和物质代谢活动的最终结果均为代谢物，在温度、光照、水分、土壤等因素胁迫下两者会受到直接的影响。代谢组学可有效反映环境对植物的胁迫作用，反映其在胁迫期间完整代谢物的变化，而代谢物质可作为分析植物应对所处的环境的胁迫的重要标志。采用高通量质谱技术分析受胁迫和未受胁迫样品之间的代谢物差异，借助于生物信息学数据分析平台，可以完整地阐述植物所处的环境对植物内代谢物的相互作用^[13-15]。

研究表明,有机肥内所含营养元素丰富,经微生物分解后可持续为植物提供所需养分,同时也能改善土壤理化性质,提高土壤肥力,对植物内源性代谢产物具有积极影响^[16-18]。本实验发现,施加高量有机肥时,西红花苷Ⅰ、西红花苷Ⅱ、京尼平苷、京尼平-1- β -D-龙胆二糖苷表达量分别提高了1.250、1.775、1.161、1.501倍。

谢产物, 并进行 HCA 分析, 发现空白组、施加低量有机肥组、施加中量有机肥组、施加高量有机肥组样品出现了 4 种聚类现象, 与前 2 种分析结果一致, 可相互佐证 4 种施



注：图 6A 为富集气泡图，气泡越大，颜色越深，代谢产物 KEGG 物质合成途径越显著；图 6B 为通路分类图，富集比率越高，代谢产物 KEGG 物质合成途径越明显；图 6C 为特定代谢产物与 KEGG 物质合成途径之间的网络图，红色代表筛选的关键化合物，黑色代表筛选的非关键或未鉴定化合物，圆角矩形框代表 KEGG 物质合成途径。

图 6 关键代谢产物 KEGG 物质合成途径

肥处理对栀子果实中代谢物有影响。

代谢组学不仅能反映植物在环境胁迫条件下代谢物的积累和变化，也能借助于数据平台分析代谢物在环境胁迫条件下物质代谢合成途径。本实验分析栀子果实中环烯醚萜及其衍生物、二萜类、黄酮及其糖苷类关键代谢物合成途径，它们在植物体内的合成是由一种或多种途径决定的，如奎尼酸是莽草酸途径代谢产物，也参与了黄酮及其糖苷类的物质合成；在乙酰辅酶 A 作用下，通过多种植物次生代谢物生物合成、藏红花酸生物合成途径产生藏红花酸。

4 结论

本实验首次结合非靶向代谢组学、化学计量学、KEGG 物质合成通路分析技术，揭示有机肥对栀子果实中关键代谢产物的作用机制，再采用 UPLC-Q-TOF-MS 法对 4 种有机肥所处理样品的中内源性代谢产物进行定性、定量分析，分别获得正离子模式下 281 个离子峰、负离子模式下 338 个离子峰，并对相对峰强度较高的 104 个进行识别。经 PCA、OPLS-DA 分析发现，与空白组比较，离散趋势依次

为高量有机肥组>中量有机肥组>低量有机肥组，结合 OPLS-DA、S-plot 筛选条件，共确定了 38 种关键代谢产物。在 HCA 分析过程中发现，有 22 种关键代谢产物上调，16 种关键代谢产物下调，38 种关键代谢产物有变化趋势。在 KEGG 物质合成通路分析中发现，38 种关键产物中有 34 种被注释到，经富集分析后被映射到 13 种代谢产物物质的途径合成，其中京尼甘昔等环烯醚萜类成分及其衍生物由单萜生物合成代谢途径合成，藏红花素等二萜类成分由藏红花素生物合成代谢途径合成，芦丁等黄酮类成分由黄酮、黄酮醇类成分生物合成代谢途径和黄酮类成分生物合成代谢途径共同合成。上述结果可为栀子果实中内源性代谢产物鉴定提供参考，为其关键代谢物生物合成途径研究提供依据。

参考文献：

[1] 刘 聃, 刘凤英, 黄 颖, 等. 栀子中栀子苷的研究进展 [J]. 农产品加工, 2021(23): 72-75.

[2]

高 雨, 朱 琦, 陈蕾蕾, 等. 梔子主要有效成分的代谢及毒性研究进展[J]. 中南药学, 2021, 19(2): 254-260.

[3]

朱鹤云, 王开鼎, 史健艺, 等. UFLC-MS/MS 法同时测定梔子厚朴汤中 10 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(10): 1751-1759.

[4]

Brigante F I, Podio N S, Wunderlin D A, *et al.* Comparative metabolite fingerprinting of chia, flax and sesame seeds using LC-MS untargeted metabolomics [J]. *Food Chem*, 2022, 371: 131355.

[5]

Chen J Y, Wang W T, Kong J Q, *et al.* Application of UHPLC-Q-TOF MS based untargeted metabolomics reveals variation and correlation amongst different tissues of *Eucommia ulmoides* Oliver [J]. *Microchem J*, 2022, 172(Part A): 106919.

[6]

邓秋林, 李思佳, 文秋姝, 等. 基于川麦冬皂苷和黄酮成分的氮磷钾化肥与有机肥适宜配比[J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(8): 1477-1486.

[7]

马 琳, 陈昌婕, 郭兰萍, 等. 有机肥和化肥配施对蕲艾生长、产量及品质的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 128-135.

[8]

岳文杰, 金心怡, 陈明杰, 等. 基于非靶向代谢组学分析白茶室内自然萎凋过程代谢物的变化规律[J]. 茶叶科学, 2021, 41(3): 379-392.

[9]

Nicácio K J, Ferreira M S, Katchborian N A, *et al.* Anti-inflammatory markers of hops cultivars (*Humulus lupulus* L.) evaluated by untargeted metabolomics strategy [J]. *Chem Biodivers*, 2022, 19(4): e202100966.

[10]

Lu Y Y, Yao G D, Wang X, *et al.* Chemometric discrimination of the geographical origin of licorice in China by untargeted metabolomics[J]. *Food Chem*, 2022, 380: 132235.

[11]

Yang M, Yin M Z, Chu S S, *et al.* Colour, chemical compounds and antioxidant capacity of *Astragali Radix* based on untargeted metabolomics and targeted quantification[J]. *Phytochem Anal*, 2022, 33(4): 599-611.

[12]

Ding J, Ruan C J, Guan Y, *et al.* Nontargeted metabolomic and multigene expression analyses reveal the mechanism of oil biosynthesis in sea buckthorn berry pulp rich in palmitoleic acid [J]. *Food Chem*, 2022, 374(1): 1317194.

[13]

Zhang L J, Li X X, Ma B, *et al.* The tartary buckwheat genome provides insights into rutin biosynthesis and abiotic stress tolerance[J]. *Mol Plant*, 2017, 10(9): 1224-1237.

[14]

Zhu Z, Chen Y L, Shi G Q, *et al.* Selenium delays tomato fruit ripening by inhibiting ethylene biosynthesis and enhancing the antioxidant defense system [J]. *Food Chem*, 2017, 219: 179-184.

[15]

Zhu Z, Zhang Y B, Liu J, Chen Y, *et al.* Exploring the effects of selenium treatment on the nutritional quality of tomato fruit [J]. *Food Chem*, 2018, 252: 9-15.

[16]

Wang C X, Pang X, Zhu T T, *et al.* Rapid discovery of potential ADR compounds from injection of total saponins from *Panax notoginseng* using data-independent acquisition untargeted metabolomics [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2022, 414 (2): 1081-1093.

[17]

Zhao X Y, Hengchao E, Dong H, *et al.* Combination of untargeted metabolomics approach and molecular networking analysis to identify unique natural components in wild *Morchella* sp. by UPLC-Q-TOF-MS [J]. *Food Chem*, 2022, 366 (2): 130642.

[18]

Li W W, Yang X N, Chen B X, *et al.* Ultra-high performance liquid chromatography/ion mobility time-of-flight mass spectrometry-based untargeted metabolomics combined with quantitative assay unveiled the metabolic difference among the root, leaf, and flower bud of *Panax notoginseng* [J]. *Arab J Chem*, 2021, 14(11): 103409.

[19]

Yin H R, Ni H, Zhang L L, *et al.* Untargeted metabolomics coupled with chemometric analysis deducing robust markers for discrimination of processing procedures: wine-processed *Angelica sinensis* as a case study [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44 (22): 4092-4110.

[20]

Lin J Z, Liu F, Zhou X F, *et al.* Effect of red light on the composition of metabolites in tea leaves during the withering process using untargeted metabolomics [J]. *J Sci Food Agric*, 2021, 102(4): 1628-1639.

[21]

Chang X W, Li J, Ju M Z, *et al.* Untargeted metabolomics approach reveals the tissue specific markers of balloon flower root (*Platycodi Radix*) using UPLC-Q-TOF/MS [J]. *Microchem J*, 2021, 168: 106447.