

韩 驰,仲文君,高志红,等. 基于液相色谱-串联质谱法分析茉莉酸与果梅休眠的关系[J]. 江苏农业科学,2015,43(5):167-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.05.055

基于液相色谱-串联质谱法分析茉莉酸与果梅休眠的关系

韩 驰¹, 仲文君², 高志红², 霍希美², 李百健³, 庄维兵², 倪照君²

(1. 江苏省徐州市果树服务站, 江苏徐州 221009; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095;

3. 南京傅家边科技园集团有限公司, 江苏南京 211221)

摘要:建立了不同果梅(*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)品种 4 个休眠时期花芽的茉莉酸(jasmonic acid)含量的液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem triple quadrupole mass spectrometric, LC-MS/MS)测定方法。样品经过甲醇提取, Agela Cleanert SPE-NH₂ 固相萃取小柱净化。色谱分离采用 C₁₈ 反相柱, 以乙腈-水(水相含 0.05% 乙酸)为流动相梯度洗脱, 质谱分析采用 ESI 离子源、二级串联质谱、负离子模式下进行检测。测定结果, 方法标准曲线线性良好, 茉莉酸 $r = 0.999\ 2$, 平均回收率范围为 78.18% ~ 97.49%, 相对标准偏差(RSD, $n = 3$)为 1.25% ~ 8.27%。该方法操作简便, 灵敏度高, 选择性好, 回收率高, 适合果梅花芽中茉莉酸的测定。结果表明, 被测 2 个品种的果梅花芽中, 休眠解除和生态休眠时期的茉莉酸含量高于内休眠和抑制性休眠时期, 推测内源激素茉莉酸可能有抑制果梅休眠和促进花芽正常生长的作用。本试验对进一步探讨果梅休眠与内源激素茉莉酸的关系打下了一定的基础。

关键词:液相色谱-串联质谱; 果梅; 休眠; 茉莉酸

中图分类号: O657.63 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)05-0167-04

季节性休眠包括抑制性休眠、内休眠和生态休眠 3 种类型, 其中内休眠又称为自然休眠^[1]。果树在休眠过程中受到环境因素尤其是光周期和温度的影响启动了一系列的生理生化反应, 涉及到植物激素、信号物质和多基因的表达和调控^[2]。芽的休眠由内源激素控制, 休眠的起始、终止均受激素调节, 环境因素(外部信号)也通过影响激素(内部信号)的合成和运输来影响休眠进程而改变低温需求量^[3]。通常认为, 休眠是由内源激素赤霉素、脱落酸、生长素和乙烯中的促进生长物质和抑制生长物质之间平衡状态决定。近期研究报道植物休眠与生长过程中也相继发现了与茉莉酸代谢相关的基因^[4-6]。

茉莉酸类化合物在植物中具有多方面调节功能:(1)信号传导作用。如在植物创伤、胁迫、病虫害过程中, 茉莉酸作为一种信号物质在植物体内传递生物或非生物胁迫的信号。(2)生理作用。如调节呼吸作用、花粉的发育、乙烯生物合成、果实的成熟、植物的光合作用和色素的形成、植物根系和植株的生长, 以及植物次生代谢的调节等。(3)基因的调控作用。如茉莉酸生物合成和茉莉酸信号通路相关的 AOS、AOC、OPR3、JMT、LOX2, 以及 JAZs、COI1、MYC2 等基因都可能受茉莉酸的调控^[7]。液质联用技术作为一种新型的现代

仪器分析手段, 因其高灵敏性、高准确性、高选择性、分析检测范围宽、时间短以及定性定量方面的强大功能等特点, 在分析检测领域得到了广泛的应用^[8]。本研究通过液质联用方法来测定果梅不同休眠时期花芽内的茉莉酸含量, 以期明确果梅休眠与内源激素茉莉酸的关系。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

安捷伦 1260 液相色谱-G6530 系列三级四级杆飞行时间质谱联用仪、Eppendorf/Centrifuge 5810R 冷冻离心机、真空冷冻干燥机(中国北京博医康实验仪器有限公司生产)、氮吹仪(美国 Organomation Associates 公司生产)、高能量磨样仪等。

二氢茉莉酸(dihydrojasmonic acid)购于 TCI 公司, 茉莉酸购于 Sigma 公司, 均为色谱级, 产品纯度 $\geq 98\%$ 。甲醇、乙腈: 色谱纯, 德国 Merck 公司产品, 二氯甲烷(色谱级), 乙酸(色谱级), 市售纯净水(娃哈哈)。

1.2 试验材料

供试材料为果梅品种桃形梅、丰后, 均采自南京农业大学国家果梅种质资源圃。桃形梅为低需冷量的果梅品种, 而丰后为高需冷量品种^[9]。分别采取不同果梅品种 4 个休眠时期的花芽, 即抑制性休眠(A)、内休眠(B)、生态休眠(C)、休眠解除(D)4 个时期。每个品种的花芽分别采于 3 棵对应品种的树上。采样日期的确定根据不同品种的需冷量和各自物候特征决定。在叶片脱落之前, 花芽处于抑制性休眠阶段; 等待叶片脱落之后, 剪取长势正常的枝条若干用 5% 蔗糖水放于光照培养箱中, 测定萌发率。光照培养箱保持 70% 的相对湿度, 温度为 $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, 光-暗周期 16 h-8 h。蔗糖溶液和

收稿日期: 2014-06-05

基金项目: 江苏省科技支撑计划(编号: BE2011458, BE2012361); 江苏省自然科学基金(编号: BK2011642); 江苏省“青蓝工程”。

作者简介: 韩 驰(1970—), 男, 江苏徐州人, 硕士, 高级农艺师, 主要从事果树技术推广。E-mail: xzsyxh@163.com。

通信作者: 高志红, 博士, 教授, 主要从事果树分子生物技术研究。E-mail: gaozhihong@njau.edu.cn。

新鲜的枝条每 3 d 更换 1 次,当芽尖端冒出绿色萼片时,即认为萌发了。研究结果,果梅花芽的萌发率与其需冷量呈正相关($r=0.979\ 7$)^[9]。光照培养箱中枝条的萌芽率小于 50% 时,此期间采取的花芽被认为处于内休眠阶段;当萌芽率大于 50% 时,则处于生态休眠阶段。在大田中正常生长的花芽萌发率达到 50% 时,此阶段采取的花芽则处于休眠解除阶段^[10]。

1.3 样品处理

1.3.1 茉莉酸提取 称取 0.1 g 果梅花芽并加入 400 ng 二氢茉莉酸作为内标物装在 2 mL 离心管中,样品经液氮冷冻磨成细粉末。用 800 μL 80% 冷甲醇提取 3 次,每次涡旋 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,收集上层液。氮吹浓缩蒸发至水相,用 2 mol/L 的 HCl 调 pH 值至 2.5~3.0。用等体积乙酸乙酯萃取 3 次,每次涡旋 10 min,4 ℃ 12 000 r/min 离心 10 min,吸取上层有机相到同一管中,氮气吹干,待进一步纯化^[11]。

1.3.2 纯化 提取步骤中的蒸干样品用 1 mL 二氯甲烷/甲醇($V:V=99:1$)溶解淋洗离 3 次,并将同一重复的 2 份样品溶解收集到同一管中。纯化用 Agela Cleanert SPE-NH₂ (500 mg/6 mL) 固相萃取小柱。小柱用前用 6 mL 二氯甲烷-甲醇($V:V=99:1$)活化。全部 6 mL 样品上柱,弃去过柱废液,用 3 mL 二氯甲烷-甲醇($V:V=99:1$)淋洗柱子,弃去淋洗液。用 2% 的乙酸甲醇溶液分 3 次洗脱,第 1 次用 4 mL,第 2、第 3 次用 3 mL,用干净的离心管收集洗脱液。洗脱液真空冷冻至干,用 0.3 mL 的 0.05% 乙酸水溶液-乙腈($V:V=80:20$)溶解,再用 0.22 μm 微孔膜过滤,收集滤液-20 ℃ 条件下保存备用。待测样品分别标号桃形梅 A、桃形梅 B、桃形梅 C、桃形梅 D、丰后 A、丰后 B、丰后 C、丰后 D,每个样品设置 3 份重复。

1.4 LC-MS 条件

1.4.1 色谱条件 色谱柱 C₁₈ (2.1×50 mm,1.8 μm,B 型全多孔,安捷伦);柱温 40 ℃;流动相 A1:0.1% 甲酸水,流动相 B1:甲醇;流动相 A2:0.05% 乙酸水,流动相 B2:乙腈。在已建立的质谱条件下改变流动相的配比和流速优化目标物分离的线性梯度洗脱程序^[12]。

表 2 二氢茉莉酸和茉莉酸的质谱条件

样品	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	喷雾压力 (MPa)	毛细管电流 (μA)	质谱扫描范围 (<i>m/z</i>)	干燥气温 (℃)	干燥气流速 (L/min)	检测模式
二氢茉莉酸	211.1335	59.0144	0.345	5.59	0~500	350	10.0	ESI ⁻
茉莉酸	209.1180	59.0142	0.345	5.59	0~500	350	10.0	ESI ⁻

2.3 回归方程及样品的液相质谱特征

该方法所得茉莉酸的回归方程为 $y=44\ 815.50x+14\ 125.83$, $r=0.999\ 2$,二氢茉莉酸的回归方程为 $y=54\ 299.44x+165\ 045.08$, $r=0.999\ 4$,呈较好的线性关系。从图 1-a 可见,茉莉酸的出峰时间为 4.8 min,其质谱图见图 1-b。从图 2-a 可见,内标二氢茉莉酸的出峰时间为 5.7 min,其质谱图见图 2-b。

2.4 精密度与准确度试验

在桃形梅 A、B、C、D 和丰后 A、B、C、D 样品中,分别加入茉莉酸标样 10.0 ng。按前述方法测定茉莉酸含量,重复 3

1.4.2 质谱条件 对茉莉酸和二氢茉莉酸标准品进行质谱扫描,确定其母离子与子离子。优化毛细管出口电压、碰撞气能量、干燥气温度、干燥气流速、喷雾压力等条件,确定其特征离子,选择相对强度大、信号稳定的碎片离子作为检测离子。

1.5 标准曲线的绘制

准确配制 0.75、1.25、2.50、5.00、10.00 ng/μL 的茉莉酸标准系列溶液,进行仪器分析,以峰面积(y)对浓度(x)绘制标准曲线。以保留时间、茉莉酸和二氢茉莉酸的母离子与子离子定性,以内标法定量。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的建立

色谱检测时,最初 5 min 的洗脱液排入废液池(防止对 MS 离子源带来背景干扰和非挥发性的盐污染质谱仪);流速 0.4 mL/min;检测器 DND,进样量为 10 μL。因为流动相的组成对 LC-MS/MS 测定的信号强度会产生很大的影响,我们对比了 2 种流动相对于色谱行为的影响。结果表明,流动相 A2:0.05% 乙酸水,流动相 B2:乙腈,出的峰更好,所以选择了第 2 种流动相为测定花芽中的茉莉酸含量。并且优化了梯度洗脱程序(表 1)。

表 1 色谱分离的线性梯度洗脱程序

流速 (mL/min)	时间 (min)	乙腈浓度 (%)	0.05% 乙酸水 (%)
0.4	0.0	20	80
0.4	2.5	20	80
0.4	4.5	98	2
0.4	10.5	98	2
0.4	12.0	20	80

2.2 质谱条件的确定

为了消除复杂基质对检测器灵敏度的影响,采用串联质谱(MS/MS)的多反应监测(MRM)技术,目标物经过液相色谱柱分离后,经过一级质谱对相对分子质量进行筛选,电离后经过二级质谱对离子进行筛选,从而提高了被分析物的信噪比,去除了共流出物的干扰,最大限度地排除杂质背景,显著提高实际样品的灵敏度和定量分析的准确性。质谱条件见表 2。

次,计算回收率结果见表 3。

从表 3 可以看出,该方法的平均回收率范围为 78.18%~97.49%, RSD 为 1.25%~8.27%。

2.5 样品的测定

运用 LC-MS/MS 法对 2 个品种不同休眠时期的花芽分别进行检测,茉莉酸含量结果分析见图 3、图 4。

3 讨论

茉莉酸在植物界中普遍存在,广泛分布于植物的幼嫩组织、花和发育的生殖器官中^[13],通过信号转导途径调控植物

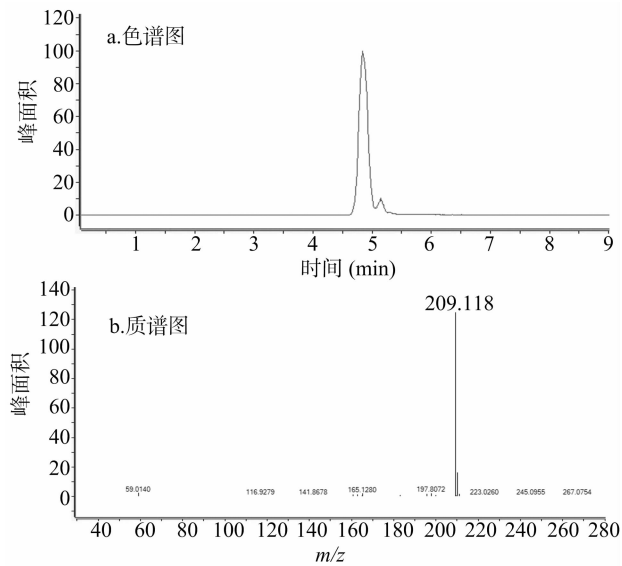


图1 茉莉酸的色谱及质谱图

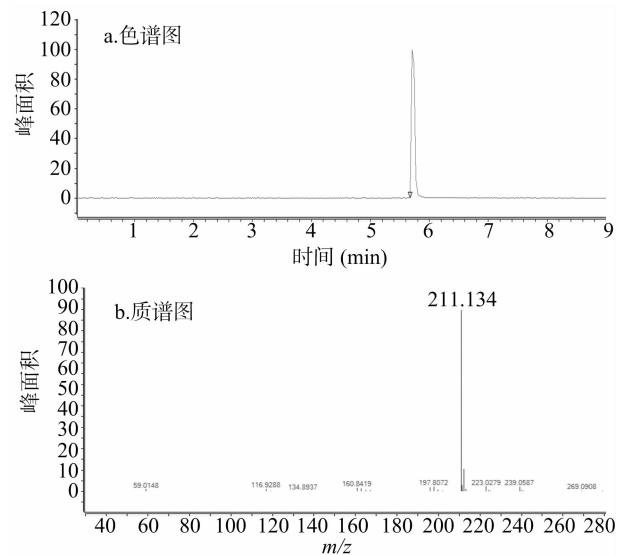


图2 二氢茉莉酸的色谱及质谱图

表 3 花芽中茉莉酸的加标回收率及 RSD

品种	样品代号	回收率 (%)	RSD (%)
桃形梅	A	78.17	1.25
	B	89.71	3.63
	C	97.49	8.27
	D	96.67	2.32
丰后	A	80.83	1.39
	B	90.36	1.39
	C	93.60	2.01
	D	90.14	5.41

注:RSD(n=3)。

生长发育和应激反应。随着研究的深入,茉莉酸的生物学作用越来越受关注。本研究通过测定不同品种果梅的花芽中茉莉酸的含量,初步探索果梅 4 个休眠时期与茉莉酸含量的内在联系。

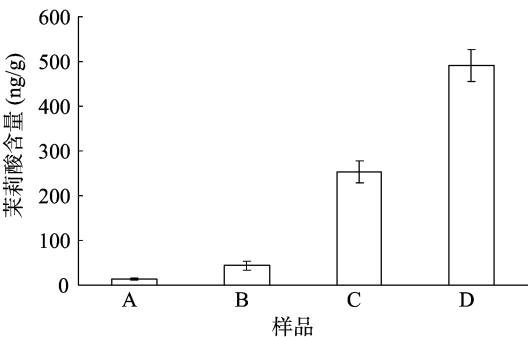


图3 桃形梅 4 个休眠时期花芽的茉莉酸含量

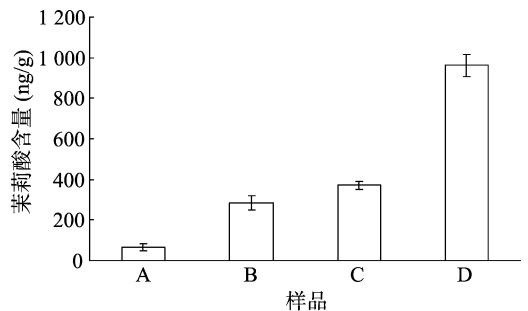


图4 丰后 4 个休眠时期花芽的茉莉酸含量

2 个品种间,茉莉酸在抑制性休眠和内休眠时期含量偏低,而在生态休眠期茉莉酸含量明显高于内休眠时期的。这一现象得出茉莉酸的合成在抑制性休眠和内休眠时期被抑制,推测茉莉酸对果梅的休眠可能有抑制作用。茉莉酸与植物的发育密切相关,如种子的萌发和生长、贮藏蛋白的积累等。而生长停止是植物进入休眠的前提条件,也是多年生植物抵御冬季低温的机制之一。所以在抑制性休眠和内休眠时期,茉莉酸的含量偏低,则不利于植物的生长与相关蛋白等的积累,但有利于植物休眠的顺利进行。

生态休眠是植物休眠经历的第三个阶段,它是由于外界不利的生长条件而造成,如干旱或低温等。一旦外界条件合适,植物可以很快恢复生长,而内休眠即使条件合适也不会恢复生长,必须满足其需冷量后才能在适宜条件下生长。本试验中,供试的 2 个果梅品种花芽在生态休眠时期的茉莉酸含量比抑制性休眠和内休眠时期有所增加。Zhong 等在数字基因表达谱研究中也发现茉莉酸相关基因在生态休眠期间的表达量高于内休眠时期的^[6]。茉莉酸含量的增大有利于花芽在生态休眠期间贮存蛋白积累,为促进花芽萌发做准备。在花的发育过程中,茉莉酸含量多少也与花粉育性有关。生态休眠期间,茉莉酸含量明显增加另有一种解释,也有可能与果梅自身的防御系统相关。生态休眠本就是因为外界不利的生长条件所造成,植物在遭遇不利环境因子胁迫时,自身增大了茉莉酸的合成量,加强了茉莉酸在信号转导中的信使作用,并诱导一系列植物防御基因的表达、防御反应化学物质的合成等,从而调节植物的免疫和应激反应^[11,14-15]。相关研究表明,茉莉酸合成途径的激活对于应激信号的传递和放大是必不可少的^[16]。

从本试验结果可以看出,桃形梅和丰后花芽内的茉莉酸含量,在休眠解除时期明显高于生态休眠时期。休眠解除,果

树正常生长,生理反应开始活跃,茉莉酸合成也大大增加。同时也说明茉莉酸合成相关基因在前 3 个休眠时期可能被某种程度抑制了。相关报道指出,茉莉酸可以激活乙烯相关基因来调控休眠^[4],乙烯合成在休眠期间也是被抑制的^[17],表明茉莉酸在调控果梅休眠进程上作用于乙烯存在着密切的关联。这需要进一步研究阐述。

植物体内的激素代谢途径是相互互联的复杂网络。基于 2 个果梅品种花芽的茉莉酸含量在生态休眠和休眠解除时期高于抑制性休眠和内休眠时期,我们可以推测,茉莉酸含量增加是有益于芽的萌发与生长,并促进果梅花芽打破休眠。Rinne 等在杨树上研究表明,除了 *FT*、*CENLI* 等基因外,脂质体相关的 1,3- β -葡聚糖水解酶基因家族(*GHI7*)也参与了休眠调控,光周期、低温、赤霉素 3 和赤霉素 4 均可上调该基因的表达,从而促进 *FT* 和 *CENLI* 的表达,休眠芽停止休眠,重新恢复生长^[18]。尽管 GA_3 和 GA_4 都可以促进基因的表达,但只有 GA_4 在实际中促进休眠芽的萌发。本研究中,推测茉莉酸也可能具有 GA_4 打破休眠的功能。Sasaki 等通过基因芯片技术在拟南芥中发现,41 个茉莉酸响应的基因中有 5 个是茉莉酸合成途径的基因,而 JA_s 的合成途径是属于正反馈调控的^[19]。茉莉酸合成途径基因的过量表达会促进茉莉酸的合成,如番茄中 AOC 基因的过量表达提升了花组织中 JA_s 的含量^[20],茉莉酸合成途径的产物又为其提供了一条正反馈回路。在果梅休眠期间,施加一定浓度的茉莉酸是否会促进其正反馈路径,使信号效应可以不断逐级放大,诱导一系列的后续反应,达到休眠解除的效果,还需要进一步验证。

参考文献:

- [1] Lang G A, Early J D, Martin G C, et al. Endo - para - and eco - dormancy: physiological terminology and classification for dormancy research[J]. HortScience, 1987, 22(3): 371 - 377.
- [2] Zhuang W B, Gao Z H, Wang L J, et al. Comparative proteomic and transcriptomic approaches to address the active role of GA_4 in Japanese apricot flower bud dormancy release[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(16): 4953 - 4966.
- [3] Seeley S D, Damavandy H, Anderson J L, et al. Autumn - applied growth regulators influence leaf retention, bud hardiness, bud and flower size, and endodormancy in peach and cherry[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1992, 117(2): 203 - 208.
- [4] Lorenzo O, Piqueras R, Sanchez S J, et al. ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense[J]. The Plant Cell, 2003, 15(1): 165 - 178.
- [5] Qin Q P, Kaas Q, Zhang C, et al. The cold awakening of doritaenopsis 'Tinny Tender' orchid flowers; the role of leaves in cold - induced bud dormancy release[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2012, 31(2): 139 - 155.
- [6] Zhong W J, Gao Z H, Zhuang W B, et al. Genome - wide expression profiles of seasonal bud dormancy at four critical stages in Japanese apricot[J]. Plant Molecular Biology, 2013, 83(3): 247 - 264.
- [7] Skibbe M, Qu N, Galis I, et al. Induced plant defenses in the natural environment: Nicotiana attenuata WRKY3 and WRKY6 coordinate responses to herbivory[J]. The Plant Cell, 2008, 20(7): 1984 - 2000.
- [8] 张小涛, 侯宏卫, 刘 彤, 等. 高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定烟用香精香料中 16 种邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 分析科学学报, 2013, 29(6): 806 - 810.
- [9] Gao Z H, Zhuang W B, Wang L J, et al. Evaluation of chilling and heat requirements in Japanese apricot with three models[J]. HortScience, 2012, 47(12): 1826 - 1831.
- [10] Campoy J A, Ruiz D, Allderan L, et al. The fulfilment of chilling requirements and the adaptation of apricot (*Prunus armeniaca* L.) in warm winter climates: An approach in Murcia (Spain) and the Western Cape (South Africa)[J]. European Journal of Agronomy, 2012, 37(1): 43 - 55.
- [11] Llugany M, Martin S R, Barcelo J, et al. Endogenous jasmonic and salicylic acids levels in the Cd - hyperaccumulator Noccaea (Thlaspi) praecox exposed to fungal infection and/or mechanical stress[J]. Plant Cell Reports, 2013, 32(8): 1243 - 1249.
- [12] Liu M, Hashi Y, Song Y Y, et al. Simultaneous determination of carbamate and organophosphorus pesticides in fruits and vegetables by liquid chromatography - mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1097(1/2): 183 - 187.
- [13] Wasternack C, Hause B. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development[J]. Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology, 2002, 72: 165 - 221.
- [14] Mhamdi A, Hager J, Chaouch S, et al. Arabidopsis GLUTATHIONE REDUCTASE1 plays a crucial role in leaf responses to intracellular hydrogen peroxide and in ensuring appropriate gene expression through both salicylic acid and jasmonic acid signaling pathways[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 1144 - 1160.
- [15] Rodriguez V M, Chetelat A, Majcherczyk P A. Chloroplastic phosphoadenosine phosphosulfate metabolism regulates basal levels of the prohormone jasmonic acid in arabidopsis leaves[J]. Plant Physiology, 2010, 152(3): 1335 - 1345.
- [16] Li L, Li C, Lee G I, et al. Distinct roles for jasmonate synthesis and action in the systemic response of tomato[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(9): 6416 - 6421.
- [17] Horvath D P, Chao W S, Suttle J C, et al. Transcriptome analysis identifies novel responses and potential regulatory genes involved in seasonal dormancy transitions of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.)[J]. BMC Genomics, 2008, 9: 536.
- [18] Rinne P L, Welling A, Vahala J, et al. Chilling of dormant buds hyperinduces FLOWERING LOCUS T and recruits GA - inducible 1,3- β -glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*[J]. The Plant Cell, 2011, 23(1): 130 - 146.
- [19] Sasaki Y, Asamizu E, Shibata D, et al. Monitoring of methyl jasmonate - responsive genes in Arabidopsis by cDNA macroarray: self - activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways[J]. DNA Research, 2001, 8(4): 153 - 161.
- [20] Miersch O, Weichert H, Stenzel I, et al. Constitutive overexpression of allene oxide cyclase in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Lukullus) elevates levels of some jasmonates and octadecanoids in flower organs but not in leaves[J]. Phytochemistry, 2004, 65(7): 847 - 856.