



## 几种经济红藻中茉莉酸合成途径的关键物质

王思琪, 陈娟娟, 杨锐, 骆其君, 吴玮, 崔晓山, 陈海敏\*

(宁波大学海洋学院, 浙江省海洋生物工程重点实验室, 浙江 宁波 315211)

**摘要:** 为研究几种经济红藻中茉莉酸合成途径的关键物质, 实验采用液相色谱—质谱联用技术(LC-MS)对茉莉酸生物合成途径相关物质建立检测方法, 并对龙须菜、坛紫菜受到机械损伤时各物质的变化情况进行检测。以100%甲醇提取茉莉酸(JA)、茉莉酸甲酯(MeJA)、12-氧-植物二烯酸(12-OPDA)和13-氢过氧化亚麻酸(13-HpOTE), 利用XBridge™ C<sub>18</sub>色谱柱, 以甲醇/水为流动相分离4种物质。优化条件下4种物质得到良好分离, 加标回收率为81.23%~90.25%, 检测限为0.04~0.56 ng/mL, 灵敏度高。坛紫菜、龙须菜和真江蓠3种红藻中, 坛紫菜中未检测到JA和13-HpOTE, 4种物质均在另外2种藻中检测到。龙须菜受机械损伤胁迫后, 4种物质在短时间内得到积累, 其中13-HpOTE响应迅速。研究表明, 红藻中可能存在类似于植物的茉莉酸合成途径, 并参与对损伤的胁迫响应。

**关键词:** 红藻; 茉莉酸合成途径; 机械损伤; 胁迫响应; LC-MS

**中图分类号:** O 656; S 917.3

**文献标志码:** A

茉莉酸(jasmonic acid, JA)是广泛存在于植物体内的一种基本的植物生长调节物质<sup>[1]</sup>。大量研究表明, JA常作为信号物质调节植物的生长发育过程, 并且在损伤、高温、干旱、高盐、病原菌感染等生物和非生物胁迫条件下, 调节植物对逆境的防御反应, 增强植物的抗逆性<sup>[2]</sup>。特别是机械损伤, 当植物受到损伤或咬食时, 茉莉酸作为重要的内源性信号分子会在细胞中积累<sup>[3-4]</sup>。

茉莉酸的生物合成途径在植物中已研究清楚, 当植物受到外界刺激时, 从质膜中释放出的亚麻酸在13-脂氧合酶的催化下首先形成13-氢过氧化亚麻酸(13-hydroperoxylinolenic acid, 13-HpOTE), 13-HpOTE由丙二烯氧化物酶氧化生成13-AOS, 这个不稳定的中间物会进一步被丙二烯氧化环化酶氧化为12-氧-植物二烯酸(12-oxo-phytodienoic acid, 12-OPDA), 12-OPDA通过3次 $\beta$ -氧化产生JA, JA进而可以代谢为多种相关化合物, 如在

甲基转移酶作用下生成茉莉酸甲酯(methyl jasmonic acid, MeJA)。因此JA, MeJA, 12-OPDA和13-HpOTE都是茉莉酸生物合成代谢途径的关键物质<sup>[5-6]</sup>。

潮间带生长的大型海藻由于受到环境的影响, 如泥沙的磨蚀、气候、微生物和其他藻类的挑战等, 具备自身的抗逆防御方式。研究表明, 某些大型藻类中检测到茉莉酸的存在, 并受不同的刺激影响而改变, 如病原体侵染墨角藻(*Fucus vesiculosus*)后, JA作为主要的防御物质发挥作用<sup>[7]</sup>。另外, 某些藻类也会响应JA或MeJA的刺激而产生抗性反应, 如Piotrowska-Niczyporuk等<sup>[8]</sup>发现JA可以诱导小球藻对UV射线、重金属和活性氧簇的抗性反应; 海带受到MeJA刺激, 会产生氧爆发, 并启动脂氧合途径<sup>[9]</sup>。但是对于藻体内的茉莉酸生物合成方式是否和植物一致尚不清楚。

收稿日期: 2019-01-27 修回日期: 2019-06-03

资助项目: 国家自然科学基金(31872540); 浙江省自然科学基金(LY 18C190004); 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-50); 浙江省重大科技专项(2016C02055-6B)

通信作者: 陈海敏, E-mail: chenhaijin@nbu.edu.cn

因此, 本研究利用液相色谱—质谱联用技术(LC-MS)建立了JA合成途径中的关键物质(JA、MeJA、12-OPDA和13-HpOTE)的定量检测技术, 优化了海藻中4种物质的提取方法, 比较了不同红藻中的含量差异。并以龙须菜(*Gracilariopsis lemaneiformis*)和坛紫菜(*Pyropia haitanensis*)为材料, 观察机械损伤胁迫下4种化合物的含量变化, 为揭示海藻中JA与藻类抗逆性之间的关系提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料、试剂与仪器

龙须菜采集于福建莆田龙须菜海水养殖基地, 坛紫菜采集于浙江象山养殖基地, 真江蒿(*Gracilaria asiatica*)采集于浙江温州洞头养殖基地。实验前清洗挑取的健康藻体, 滤纸吸干后于-20 °C冰箱保存。

标准品MeJA和JA(纯度>98%)购自美国Sigma-Aldrich公司, 12-OPDA和13-HpOTE(纯度>98%)购自美国Cayman公司。

安捷伦液相色谱-SCIEX TripleQuad三重四极杆/串联线性离子阱质谱联用4500分析系统(Agilent Technologies公司), XBridge™ C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm, Waters公司)。

### 1.2 标准曲线的建立

将JA、MeJA、12-OPDA和13-HpOTE标准品配制成浓度为1、5、10、50、100、500和1 000 ng/mL的一系列标准溶液, 依次注入LC-MS分析。每个样品进样3次, 计算其回归方程及相关系数。

### 1.3 高效液相色谱—质谱条件

高效液相色谱条件: 采用XBridge™ C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为100%甲醇(A)和超纯水溶液(B); 线性洗脱梯度: 在30 min内, 流动相A从70%上升到100%, 在1 min后, 又下降到70%, 保持4 min; 流动相B在30 min内从30%下降到0, 在1 min后, 又上升到30%, 保持4 min; 进样体积5 μL, 柱温30 °C, 流速为200 μL/min。

质谱条件: 分别采用ESI源电喷雾正负离子电离模式, 喷雾电压分别为5 500和4 500 V, 气帘气241.15 kPa, 离子源温度450 °C, 喷雾气275.60 kPa, 辅助加热气275.60 kPa。质谱采用二级裂解离子全扫描模式进行数据采集, 后续的定量分析采用多反应离子检测模式(MRM)。4种茉莉酸类物质标准品对应的离子通道和碰撞能量见表1。

表1 四种标准品在MRM模式下获得的特征碎片离子

Tab. 1 Characteristic fragment ions obtained from 4 standards in MRM mode

分析物 analytes	检测模式 detection mode	通道 transition	碰撞能量/(×10 <sup>-19</sup> J) collision energy
茉莉酸 JA	负离子	209.21<59.20	32
茉莉酸甲酯 MeJA	正离子	225.22<151.21	24
12-氧-植物二烯酸 12-OPDA	负离子	291.13<165.21	48
13-氢过氧化亚麻酸 13-HpOTE	负离子	309.21<111.20	40

### 1.4 样品处理及提取方法

将龙须菜用剪刀剪为长度为3 cm的小段, 将坛紫菜剪成4 mm×4 mm的片段, 损伤后的藻体置于灭菌海水中, 20 °C恢复培养5 min、10 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h、24 h和48 h。每个时间点的样品取出液氮冷冻后于-20 °C冰箱保存。

准确称取藻样品(鲜重)0.2 g, 液氮研磨后加入1 mL甲醇, 涡旋振荡1 min, 冰浴超声10 min, 均质器细胞破碎10 min(6 500 r/min, 15 s×2, 15 s, 10个循环)后置于-20 °C冰箱提取12 h; 在4 °C、

12 000 r/min离心10 min, 取上清液。残渣再用0.5 mL甲醇提取2次, 合并上清液, 冷冻离心浓缩至干, 保存于-20 °C冰箱。分析时加入300 μL甲醇复溶, 过0.22 μm滤膜, LC-MS分析。提取液中均加入100 mg/L的BHT抗氧化剂。

### 1.5 回收率的测定

为了考察提取方法的有效性, 分别取6份龙须菜样品, 每份0.2 g, 按“样品处理及提取方法”提取。复溶时其中3组加300 μL的甲醇, 另3组加1 μg/mL的混合标准液300 μL, 上机分析, 分

别计算各物质的含量为 $m_1$ 和 $m_2$ ，加入的标准品的含量为 $m_3$ 。按照下面的公式计算各物质的回收率：

$$\text{回收率 (recovery rate, \%)} = \frac{m_2 - m_1}{m_3} \times 100\%$$

## 1.6 数据分析

实验所得数据以平均值±标准差(mean±SD)表示，以SPSS 24.0统计软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)，差异显著者进行Duncan氏多重比较。 $n=3$ ， $P<0.05$ 为具有显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 质谱条件的选择

JA、12-OPDA和13-HpOTE在负离子模式下进行定量分析，MeJA在正离子模式下进行定量分析。JA、12-OPDA和13-HpOTE的准分子离子峰[M-H]<sup>-</sup> m/z分别为209.21、291.13和309.21，MeJA的准分子离子峰[M+H]<sup>+</sup> m/z为225.22。电喷雾电离模式下4种茉莉酸合成相关途径化合物标准品的二级质谱图及碎裂方式如图1所示，分别

选取丰度最强的子离子m/z 59.20、165.21、111.20和151.21作为JA、12-OPDA、13-HpOTE和MeJA的监测离子(图1)。

### 2.2 碰撞能量的选择

采用直接进样方式对JA、MeJA、12-OPDA和13-HpOTE溶液进行二级质谱分析。碰撞能量设置为0~48×10<sup>-19</sup> J，根据母离子的相对丰度较低、子离子的相对丰度较高的原则来选择最佳碰撞能量。选择32×10<sup>-19</sup> J为JA的最佳碰撞能量，选择24×10<sup>-19</sup> J为MeJA的最佳碰撞能量，选择48×10<sup>-19</sup> J为12-OPDA的最佳碰撞能量，选择40×10<sup>-19</sup> J为13-HpOTE的最佳碰撞能量(图2)。

### 2.3 色谱条件的优化

研究对比了几种色谱柱，最终采用XBridge™ C<sub>18</sub>柱来分离这4种物质，分离效果较好，各离子峰都能分开，且峰形对称，保留时间适中(图3)。同时考察了甲醇/水、乙腈/水、甲醇/水(含0.1%的甲酸)、乙腈/水(含0.1%的甲酸)、甲醇/水(含10 mmol/L的甲酸铵)、乙腈/水(含10 mmol/L的甲酸铵)、甲醇/水(含0.1%的氨水)、乙腈/水(含0.1%的

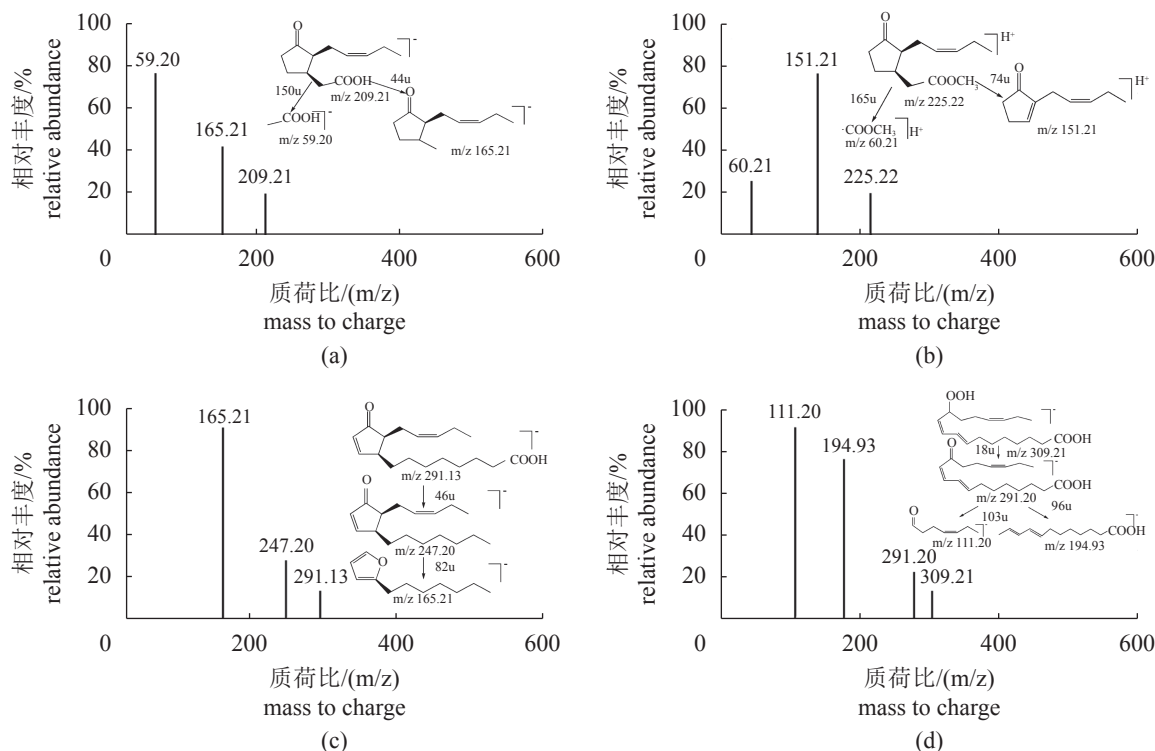


图1 电喷雾电离模式下四种茉莉酸合成相关途径化合物标准品的二级质谱图

(a) 茉莉酸; (b) 茉莉酸甲酯; (c) 12-氧-植物二烯酸; (d) 13-氢过氧化亚麻酸

Fig. 1 MS/MS spectrum of four standard materials under electrospray ionization

(a) JA; (b) MeJA; (c) 12-OPDA; (d) 13-HpOTE

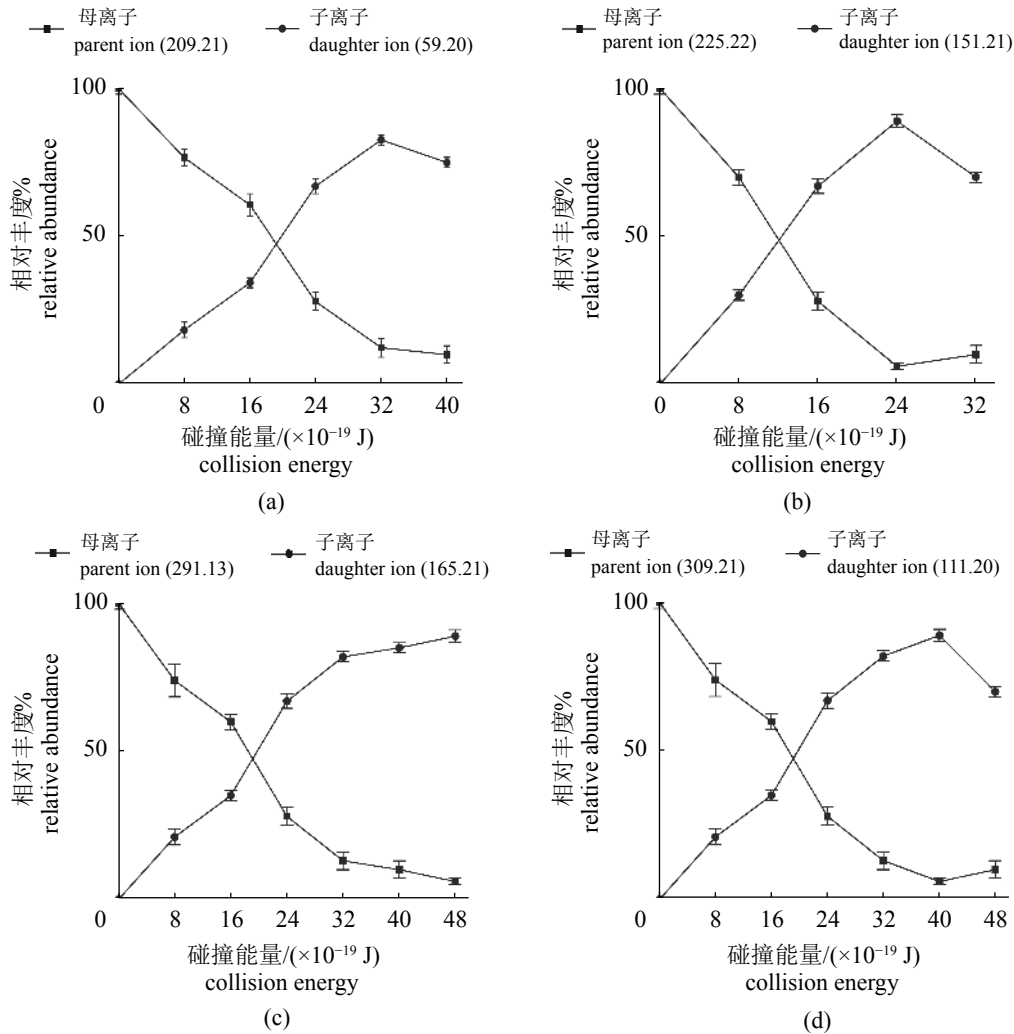


图 2 四种标准品的能量碰撞曲线

(a) 茉莉酸; (b) 茉莉酸甲酯; (c) 12-氧-植物二烯酸; (d) 13-氢过氧化亚麻酸

Fig. 2 Energy collision curves of 4 standard compounds

(a) JA; (b) MeJA; (c) 12-OPDA; (d) 13-HpOTE

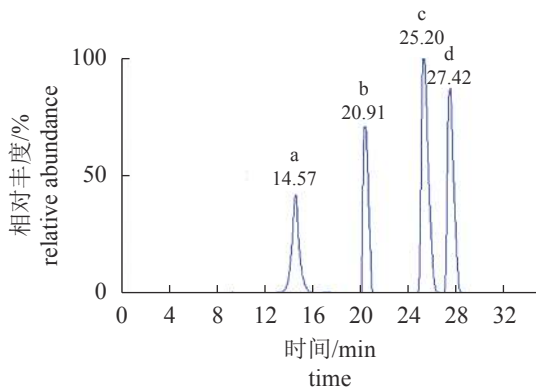


图 3 标准品的MRM模式总离子流图

a. 茉莉酸; b. 茉莉酸甲酯; c. 12-氧-植物二烯酸; d. 13-氢过氧化亚麻酸

Fig. 3 MRM mode chromatograms of standards

a. JA; b. MeJA; c. 12-OPDA; d. 13-HpOTE

氨水)8组不同组成的流动相。发现当流动相为甲醇/水时,浓度为1 mg/L的JA、MeJA、12-OPDA和13-HpOTE的混合标准品可获得良好的信号响应,4种化合物完全分离,保留时间适中,峰形对称。因此,选择甲醇和超纯水作为流动相(图3)。

### 2.4 提取方法的优化

以龙须菜为实验对象,分别对提取溶剂和提取时间进行了考察。

采用正丙醇:水:浓盐酸(2:1:0.002)、80%甲醇、乙腈:水:甲酸(80:19:1)和100%甲醇4种提取方法,并求得回收率(表2)。当采用100%甲醇作为提取液时重复性好,回收率较高,可以满足检测需求,因此选用100%甲醇作为提

表2 不同有机溶剂提取四种物质的回收率  
Tab. 2 Recoveries of four compounds extracted by different extraction solutions %

化合物 compounds	正丙醇:水:浓盐酸 (2:1:0.002) N-propanol: water: HCl	80%甲醇 80% methanol	乙腈:水:甲酸(80:19:1) acetonitrile: water: formic acid	100%甲醇 100% methanol
茉莉酸 JA	66.28±20.58	82.41±3.67	63.04±19.49	97.13±4.36
茉莉酸甲酯 MeJA	52.12±3.21	119.25±18.26	53.25±7.27	86.52±6.34
12-氧-植物二烯酸 12-OPDA	68.32±5.34	113.43±23.16	82.25±8.32	76.35±3.21
13-氢过氧化亚麻酸 13-HpOTE	47.28±3.54	56.23±7.24	71.38±2.39	80.23±2.98

取溶剂。

以甲醇作为提取溶剂,选择5个浸提时间(0、4、8、12、16 h)来比较4种化合物的回收率,发现提取12 h得到的回收率最佳,4种物质的回收率都在75%以上,JA达到97.52%,因此本实验采用12 h作为4种化合物的提取时间(表3)。

## 2.5 化合物的液相色谱—质谱定量方法

分别配制0.1~1 000 ng/mL的混合标准溶液,按照优化条件进行分析。4种化合物标准品在该浓度范围内线性良好,相关系数( $R^2$ )均高于0.995 0,表明建立的标准曲线可靠(表4)。对应的各物质的检测限为0.04~0.56 ng/mL( $S/N=3$ ),定量限为0.13~1.69 ng/mL( $S/N=10$ ),说明本方法检测这4种

化合物的灵敏度很高(表4)。

根据上述优化方法,4种化合物的加标回收率为81.23%~90.25%,相对标准偏差低于6.00%( $n=6$ )(表5)。因此该提取方法能满足龙须菜样品中4种化合物的测定要求。

## 2.6 大型红藻中4种化合物的含量

4种化合物在不同红藻中的含量存在很大差异。坛紫菜中并没有检测到JA和13-HpOTE,12-OPDA含量非常低,但坛紫菜中MeJA含量却非常高,达265.30 ng/g。龙须菜和真江蓠中4种化合物都可以检测到,真江蓠中的JA和13-HpOTE含量最高,龙须菜中的12-OPDA含量最高(表6)。

表3 不同提取时间下四种化合物的回收率  
Tab. 3 Recoveries of four compounds extracted by different time %

化合物 compounds	浸提时间 extraction time				
	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h
茉莉酸 JA	80.25±4.92	82.26±5.34	86.54±3.73	97.52±3.26	89.45±4.01
茉莉酸甲酯 MeJA	57.24±2.45	60.12±10.24	73.24±5.25	85.67±2.12	87.24±5.15
12-氧-植物二烯酸 12-OPDA	40.57±4.35	56.23±4.38	67.32±4.26	77.67±3.22	67.24±4.17
13-氢过氧化亚麻酸 13-HpOTE	60.35±7.21	67.23±5.34	75.89±5.19	83.67±2.68	75.27±3.15

表4 四种化合物的线性方程、检测限和定量限  
Tab. 4 Calibration curves for four compounds and their LODs and LOQs

化合物 compounds	线性方程 linear equation	相关系数 ( $R^2$ ) correlation coefficient	线性范围 (ng/mL) linear range	最低检测限 (ng/mL)( $S/N=3$ ) minimum detection limit	定量限 (ng/mL)( $S/N=10$ ) limit of quantitation	日内 精密度的/% intraday precision	日间 精密度的/% daytime precision	离子 抑制率/% ion inhibition rate
茉莉酸 JA	$y=(1.83e+004)x-1.81e+003$	0.996 4	0.1~1 000	0.17	0.52	2.51	4.33	4.81
茉莉酸甲酯 MeJA	$y=(2.56e+004)x-4.25e+003$	0.996 8	0.1~1 000	0.56	1.69	3.22	5.12	1.63
12-氧-植物二烯酸 12-OPDA	$y=(3.47e+004)x-8.88e+003$	0.996 6	0.1~1 000	0.04	0.13	4.65	6.71	3.67
13-氢过氧化亚麻酸 13-HpOTE	$y=(3.48e+004)x-8.40e+003$	0.995 9	0.1~1 000	0.05	0.15	1.82	3.26	2.15

注:  $y$ 为被分析物的峰面积;  $x$ 为被分析物的质量浓度(ng/mL)

Notes:  $y$  is the peak area of the analyte;  $x$  is the mass concentration of the analyte (ng/mL)

表 5 四种化合物的加标回收率  
Tab. 5 Recoveries of four compounds

n=6

化合物 compounds	样品含量/g content	质量浓度/( $\mu\text{g/mL}$ ) concentration	回收率/% recovery	相对标准偏差/% relative standard deviation
茉莉酸 JA	0.1	1	90.25 $\pm$ 3.25	3.60
茉莉酸甲酯 MeJA	0.1	1	81.23 $\pm$ 3.89	4.79
12-氧-植物二烯酸 12-OPDA	0.1	1	85.45 $\pm$ 4.89	5.72
13-氢过氧化亚麻酸 13-HpOTE	0.1	1	89.24 $\pm$ 4.23	4.74

表 6 三种大型红藻中四种化合物的含量  
Tab. 6 Contents of four compounds in three species of red algae

ng/g

红藻 red algal	化合物含量 compound content			
	茉莉酸 JA	茉莉酸甲酯 MeJA	12-氧-植物二烯酸 12-OPDA	13-氢过氧化亚麻酸 13-HpOTE
龙须菜 <i>G. lemaneiformis</i>	1.26 $\pm$ 0.23	2.96 $\pm$ 0.43	7.34 $\pm$ 1.23	8.77 $\pm$ 2.32
坛紫菜 <i>P. haitanensis</i>		265.30 $\pm$ 12.5	0.109 $\pm$ 0.02	
真江蓠 <i>G. asiatica</i>	3.21 $\pm$ 0.43	3.19 $\pm$ 1.21	6.89 $\pm$ 0.89	23.21 $\pm$ 3.21

### 2.7 红藻响应机械损伤时的茉莉酸合成途径关键物质的变化

选择龙须菜和坛紫菜开展4种物质响应机械损伤的变化研究。龙须菜在机械损伤后, JA、MeJA、12-OPDA和13-HpOTE的含量均呈现先升后降的趋势(图4-a)。除MeJA外, 其他3种物质都在10 min时出现最大响应。其中, 13-HpOTE的响应值最高, 与对照组相比, 在5 min时增加至2.65倍( $P<0.01$ ), 10 min时升高至4.03倍, 达到(35.21 $\pm$ 2.11)ng/g( $P<0.001$ )。JA在胁迫时的响应幅

度最大, 10 min时增加至对照组的8.55倍( $P<0.001$ )。MeJA响应峰值的出现略迟, 在30 min时出现最大响应。可见, 4种物质都能积极响应机械损伤胁迫(图4-a)。

而坛紫菜响应机械损伤的变化与龙须菜有很大区别(图4-b)。13-HpOTE在损伤过程中始终没有检测到, 但JA却在机械损伤后出现了, 并随时间延长, 在1 h时达到最大响应。12-OPDA虽然含量非常低, 但整体出现上升现象, 在30 min时达到最高值。而MeJA的响应时间远远晚于龙须菜, 在24 h才出现响应峰值。

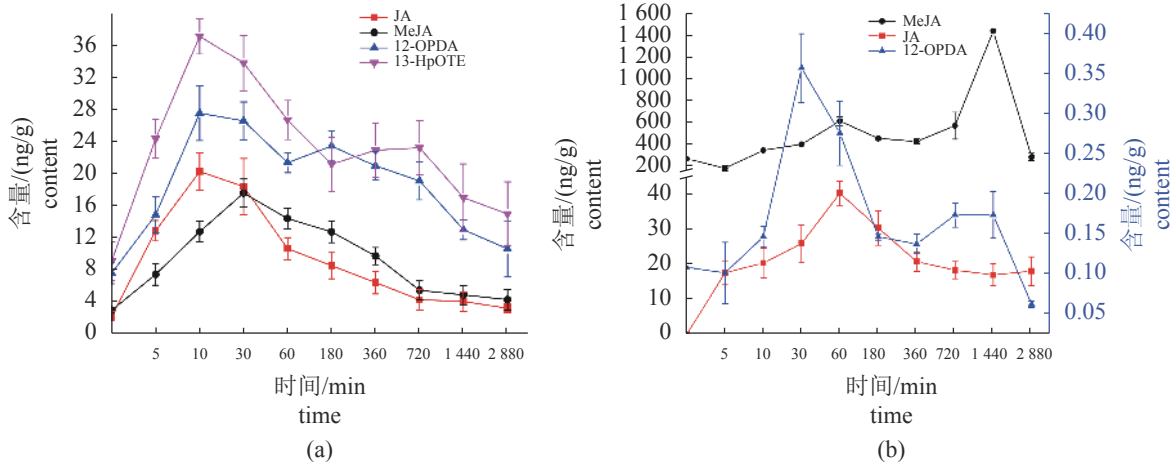


图 4 红藻响应机械损伤时的物质变化

(a) 龙须菜; (b) 坛紫菜

Fig. 4 Changes of compounds of red algae in response to mechanical damage

(a) *G. lemaneiformis*; (b) *P. haitanensis*

### 3 讨论

植物中的JA的合成途径非常明确,对于这几个相关物质的检测也多有报道,如采用LC-MS或GC-MS等方法检测JA、MeJA或13-HpOTE等<sup>[10-13]</sup>。红藻中曾检测到含有大量的脂质氧化产物,但是对于是否存在茉莉酸及其合成相关物质始终存在质疑,因为Mikami等<sup>[14]</sup>在红藻中没有检测到JA,也没有发现其生物合成的相关基因。刘雪梅等<sup>[15]</sup>用LC-MS测定大型海藻中的植物激素时,发现JA只在部分藻中被检测到,比如石莴(*Mlua lactuca*)、羊栖菜(*Sargassum fusiforme*)和海带(*Saccharina japonica*)等;在角叉菜(*Chondrus ocellatus*)和坛紫菜这2种红藻中却没有检测到。红藻中是否有类似于植物的JA相关合成途径?有报道指出,红藻受刺激或胁迫时,JA相关物质会有所变化,如在高温和高盐胁迫时,龙须菜的JA含量变化剧烈,有助于藻体对抗逆境<sup>[16]</sup>;以往针对坛紫菜的研究也发现,坛紫菜中含有大量的MeJA<sup>[17]</sup>,当受1-辛烯-3-醇(1-octen-3-ol)刺激时,MeJA会显著响应<sup>[18]</sup>。JA是否在红藻中参与抗性反应?迄今为止,针对红藻中的这条合成途径的相关物质(JA, MeJA, 12-OPDA和13-HpOTE)的研究尚无报道。

因此,本研究改进了提取技术,优化了LC-MS对这几种物质的检测方法,首次实现了4种JA生物合成相关物质的同步测定,获得了采用100%甲醇提取12 h的优化方法,在该优化条件下,JA、MeJA、12-OPDA和13-HpOTE这4种化合物得到了良好的分离,并具有较好的检测灵敏度。而以往报道的方法需要经过衍生化后利用GC-MS测定,或者在提取后,需要固相微萃取步骤,相对而言,本实验方法简便、灵敏度高<sup>[19]</sup>。利用该实验条件,在龙须菜和真江蓠中检测到了这4种化合物的存在;但在坛紫菜中却没有发现JA和13-HpOTE,很可能是因为其含量低于检测限,这与刘雪梅等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。并且,坛紫菜中12-OPDA的含量也非常低,远远低于其他2种藻,但是坛紫菜中MeJA的含量非常高,是另外2种藻的数百倍。因此对比这3种藻,JA合成途径的4种关键物质在龙须菜和真江蓠中都能找到,说明这2种藻的JA合成途径很可能与植物类似;而坛紫菜却缺失了其中的2种物质。由于植物中JA的合成途径是以亚麻酸为原料

<http://www.scxuebao.cn>

的,而坛紫菜中的亚麻酸含量极低<sup>[18]</sup>,可能导致了其氧化产物12-OPDA含量极低并检测不到JA。另外,坛紫菜中的脂氧合酶蛋白(PhLOX)还具有过氧化氢裂解酶活性,并且其活性非常高,13-HpOTE会在几秒钟内被其裂解为挥发性短链脂肪物质<sup>[20]</sup>,因此可能造成了本研究中检测不到13-HpOTE的原因。但是坛紫菜中MeJA含量过高,而其上游物质却含量极低,甚至没有,说明MeJA的合成途径可能与植物的不一致。

在植物中,JA是响应机械损伤的重要信号物质,能够在机体受到损伤后5 min左右迅速累积,局部诱导损伤叶片中的JA反应基因的表达,达到胁迫防御作用<sup>[21]</sup>。本研究尝试用龙须菜和坛紫菜做材料,分析它们受到机械损伤时各物质的反应。结果发现,机械损伤能引起2种藻的JA相关化合物的应答。在龙须菜中,合成途径中的几个物质(12-OPDA、13-HpOTE和JA)的含量都在短时间内(5 min)发生了显著性的上升,并在10 min后达到最高;而MeJA是通过JA在甲基转移酶的作用下形成的<sup>[22]</sup>,所以作为JA的下游物质增加比较缓慢;而各物质在达到最高值后都出现了下降,说明JA在龙须菜中可能也类似于植物,是作为瞬时的损伤响应信号起作用,一旦信号传递后,可能就被代谢掉<sup>[20]</sup>。而坛紫菜中的JA在没有受到机械胁迫时检测不出,但在损伤后可被检测出,并且含量升高,而12-OPDA和MeJA含量也有所上升,实验在研究坛紫菜受1-octen-3-ol和flg22刺激时,也观察到了类似现象,说明在坛紫菜中JA是典型的胁迫响应物质<sup>[17-18]</sup>;但是坛紫菜中这些物质的响应速率非常慢,远远迟于植物和龙须菜的响应时间,可能与其响应方式不同有关。

综上所述,本研究建立了红藻中茉莉酸生物合成途径关键物质的LC-MS检测方法并优化了提取方法。实验发现机械损伤时龙须菜和坛紫菜都可以做出JA相关物质的响应,其中龙须菜可能存在类似植物的茉莉酸途径的响应,这为后续研究大型海藻胁迫响应中的茉莉酸信号作用提供了一定的理论基础。

#### 参考文献:

- [1] 宋云, 李林宣, 卓凤萍, 等. 茉莉酸信号传导在植物抗性方面研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(2): 17-24.

- Song Y, Li L X, Zhuo F P, *et al.* Progress on jasmonic acid signaling in plant stress resistant[J]. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2015, 17(2): 17-24(in Chinese).
- [ 2 ] Wasternack C, Hause B. Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*[J]. *Annals of Botany*, 2013, 111(6): 1021-1058.
- [ 3 ] Creelman R A, Tierney M L, Mullet J E. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(11): 4938-4941.
- [ 4 ] 张双玉, 齐芪, 李晓慧, 等. 茉莉酸及其前体12-氧-植物二烯酸的HPLC-MS/MS检测方法[J]. *植物学报*, 2017, 52(5): 631-636.
- Zhang S Y, Qi Q, Li X H, *et al.* Simultaneous determination of jasmonic acid and 12-oxo-phytodienoic acid in different plant materials by HPLC-MS/MS[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2017, 52(5): 631-636(in Chinese).
- [ 5 ] Schillmiller A L, Koo A J K, Howe G A. Functional diversification of acyl-coenzyme a oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action[J]. *Plant Physiology*, 2007, 143(2): 812-824.
- [ 6 ] Schaller F, Biesgen C, Müssig C, *et al.* 12-oxophytodienoate reductase 3(OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis[J]. *Planta*, 2000, 210(6): 979-984.
- [ 7 ] Arnold T M, Targett N M, Tanner C E, *et al.* Evidence for methyl jasmonate - induced phlorotannin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae)[J]. *Journal of Phycology*, 2001, 37(6): 1026-1029.
- [ 8 ] Piotrowska-Niczyporuk A, Bajguz A, Zambrzycka E, *et al.* Phytohormones as regulators of heavy metal biosorption and toxicity in green alga *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae)[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 52: 52-65.
- [ 9 ] Küpper F C, Gaquerel E, Cosse A, *et al.* Free fatty acids and methyl jasmonate trigger defense reactions in *Laminaria digitata*[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2009, 50(4): 789-800.
- [10] Liu X, Yang Y L, Lin W H, *et al.* Determination of both jasmonic acid and methyl jasmonate in plant samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2010, 55(21): 2231-2235.
- [11] Xiao H M, Cai W J, Ye T T, *et al.* Spatio-temporal profiling of abscisic acid, indoleacetic acid and jasmonic acid in single rice seed during seed germination[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2018, 1031: 119-127.
- [12] Gidda S K, Miersch O, Levitin A, *et al.* Biochemical and molecular characterization of a hydroxyjasmonate sulfotransferase from *Arabidopsis thaliana*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(20): 17895-17900.
- [13] Engelberth J, Schmelz E A, Alborn H T, *et al.* Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry[J]. *Analytical Biochemistry*, 2003, 312(2): 242-250.
- [14] Mikami K, Mori I C, Matsuura T, *et al.* Comprehensive quantification and genome survey reveal the presence of novel phytohormone action modes in red seaweeds[J]. *Journal of Applied Phycology*, 2016, 28(4): 2539-2548.
- [15] 刘雪梅, 赵鹏, 徐继林, 等. LC-MS同时测定大型海藻中9个植物激素[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(10): 1747-1752.
- Liu X M, Zhao P, Xu J L, *et al.* LC-MS simultaneous determination of nine phytohormones in macroalgae[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(10): 1747-1752(in Chinese).
- [16] 蔡西粟, 邵旻玮, 孙雪, 等. 龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)中多种植物激素的GC-MS检测及对氮胁迫的响应[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(6): 753-758.
- Cai X L, Shao M W, Sun X, *et al.* Detection of multiple phytohormones by GC-MS technique in *Gracilaria lemaneiformis* and the response to nitrogen stresses[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(6): 753-758(in Chinese).
- [17] Tu S S, Yang R, Xu X, *et al.* Flg22-triggered oxylipin production in *Pyropia haitanensis*[J]. *Phycological Research*, 2017, 65(1): 86-93.
- [18] Chen H M, Yang R, Chen J J, *et al.* 1-Octen-3-ol, a self-stimulating oxylipin messenger, can prime and induce defense of marine alga[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 37.
- [19] Müller A, Düchting P, Weiler E W. A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*[J]. *Planta*, 2002, 216(1): 44-56.
- [20] Chen H M, Zhu Z J, Chen J J, *et al.* A multifunctional lipoxygenase from *Pyropia haitanensis*-the cloned and



- functioned complex eukaryotic algae oxylipin pathway enzyme[J]. *Algal Research*, 2015, 12: 316-327.
- [21] Glauser G, Dubugnon L, Mousavi S A R, *et al.* Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(50): 34506-34513.
- [22] Seo H S, Song J T, Cheong J J, *et al.* Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: a key enzyme for jasmonate-regulated plant responses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(8): 4788-4793.

## Key compounds in the synthesis pathway of jasmonic acid in several economic red algae

WANG Siqi, CHEN Juanjuan, YANG Rui, LUO Qijun,  
WU Wei, CUI Xiaoshan, CHEN Haimin\*

(Key Laboratory of Marine Biotechnology in Zhejiang Province, School of Marine Science,  
Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** This study was designed to research the key compounds of jasmonic acid synthesis pathway in several economic red algae. A liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) was used to establish the detection method of compounds involved in the biosynthetic pathway of jasmonic acid, and the changes of these compounds were detected in *Gracilariopsis lemaneiformis* and *Pyropia haitanensis* when they were subjected to mechanical damage. Jasmonic acid (JA), methyl jasmonate (MeJA), 12-oxy-phytodienoic acid (12-OPDA) and 13-hydroperoxylinolenic acid (13-HpOTE) were extracted with 100% methanol, and the four compounds were separated by XBridge™ C<sub>18</sub> chromatographic column with methanol/water as mobile phase. The results showed that the four compounds could be separated well under optimal conditions. The recoveries of the four compounds were 81.23%-90.25%, and the detection limits of the method were between 0.04 and 0.56 ng/mL, indicating that the high sensitivity of this method. These four compounds in *G. lemaneiformis*, *P. haitanensis* and *Gracilaria asiatica* were analyzed. In addition to no JA and 13-HpOTE detected in *P. haitanensis*, four compounds were detected in the other two species of red algae. The content changes of these compounds in *G. lemaneiformis* under mechanical damage stress were analyzed, and it was found that when the alga was stressed, the contents of them were accumulated within a short time, and the responses of them were rapid. After *P. haitanensis* was mechanically damaged, JA production was detected, but the response rates of these compounds were slower than *G. lemaneiformis*. These results suggest that some red algae may have a similar pathway of jasmonic acid synthesis to that of plants, and also may participate in the stress response to mechanical injury.

**Key words:** red algae; jasmonic acid biosynthesis pathway; mechanical damage; stress response; LC-MS

**Corresponding author:** CHEN Haimin. E-mail: chen\_haimin@nbu.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (31872540); Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LY 18C190004); China Agriculture Research System (CARS-50); Major Scientific and Technological Special Projects of Zhejiang Province (2016C02055-6B)