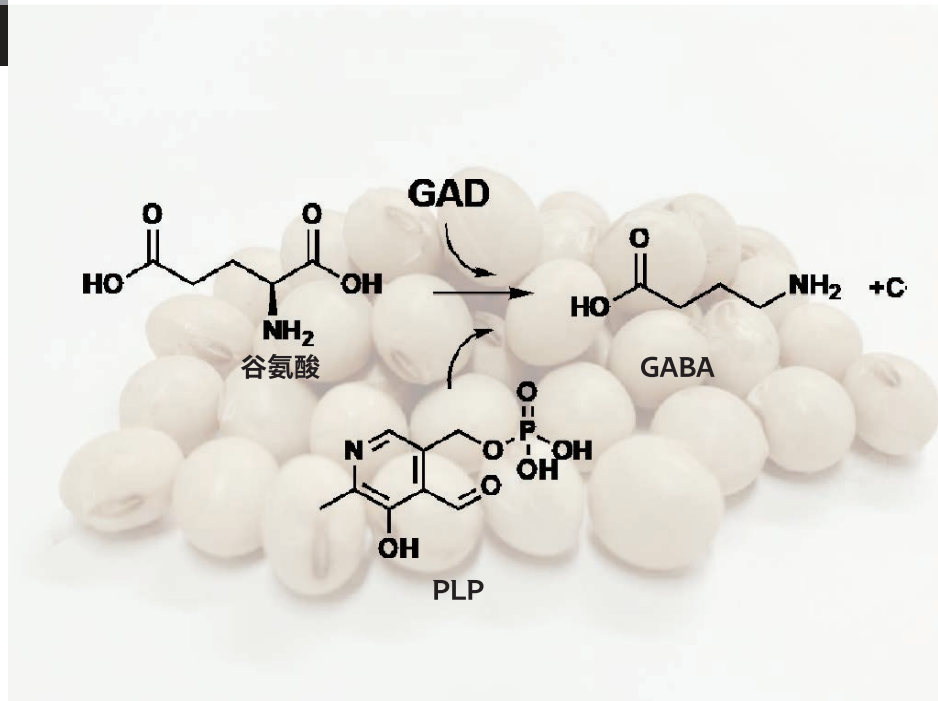


iMScope™QT对豆科植物种子萌发过程中谷氨酸脱羧酶活性定位的可视化

生田 宗一郎¹、篠原 菜穗¹、中川 薫、山本 卓志、福崎 英一郎^{1, 2, 3}、新闻 秀一^{1, 2, 3}



■ 摘要

检测体内酶促反应时，通常使基质和酶先发生反应，然后使反应产物进一步发生显色反应，并测量吸光度等。在传统方法中，需要基质和酶先进行一次反应，然后通过二次反应显色。在新方法中，通过在组织表面进行检测，可以实现酶活性的可视化。本报告介绍了能够进行高空间分辨率质谱成像的 iMScope QT 在酶组织化学中的应用¹⁾。

1. 引言

阐明生物体中酶活性的定位对于理解生物的生命现象非常重要²⁾。免疫组化法³⁾和原位杂交法⁴⁾被广泛用于研究酶的分布。不过，这些技术能够可视化酶蛋白和编码酶蛋白氨基酸序列的 mRNA 的定位，但无法可视化酶活性本身的定位。另一方面，酶组织化学是在组织切片上进行酶活性定位可视化的方法²⁾。

在植物样品中，酶组织化学方法从 20 世纪 60 年代起开始应用于研究的酶活性定位⁵⁾，近年来，de Ávila 等人将其应用于 *Vitis vinifera* L. 果皮中所含过氧化物酶 (POD, EC1.11.1.7) 定位的可视化⁶⁾。“EC”是“Enzyme Commission”的简称，根据酶的功能分为七类。即，所有的酶具有一个唯一的 EC 编号。

另外，此处所述的基于 POD 的可视化技术是对组织切片上的酶提供的基质 DAB (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride) 生成的色素聚合物进行可视化。如上所述，现有的酶组织化学可用于研究酶活性的特异性定位，但缺点是需要进行二次显色反应，这限制了靶酶的数量。

因此，为了避免利用二次显色反应，我们采用了质谱成像 (Mass spectrometry imaging) 技术来检测酶反应中产生的分子，并将分布信息可视化，此前已有相关报道。我们的研究小组主要以小分子代谢物为目标，成功完成了胆碱酯酶 (ChE)⁷⁾和胆碱乙酰转移酶 (ChAT)⁸⁾的活性定位、以及米曲中 Dipeptidylpeptidase B 的活性定位的可视化⁹⁾。

1 大阪大学大学院工学研究科生物工程专业
 2 大阪大学・岛津分析创新协作研究所
 3 大阪大学先导性跨学科研究机构

该靶标谷氨酸脱羧酶 (GAD, EC4.1.1.15) 是一种催化 L-谷氨酸脱羧反应生成 γ -aminobutyric acid (GABA) (一种氨基酸) 的酶。了解 GABA 的生物合成在食品化学和植物生理学领域都很重要。GABA 在植物体内发挥着信号转导、pH 调节、C/N 比调节以及生物 / 非生物胁迫响应的作用¹⁰⁾。另外, 据报道, GABA 会在大豆¹¹⁾、水稻¹²⁾、大麦¹³⁾ 等各种植物的萌发阶段增加, 可能在种子萌发阶段发挥着重要作用。另外, GABA 含量高的食品也备受关注, 大豆等豆科植物的发芽种子作为 GABA 含量高的食品在市场上流通。基于上述几点, 了解在萌发过程中参与 GABA 生物合成的 GAD 定位分布, 有助于阐明 GAD 在萌发过程中发挥着怎样的作用。此外, 还可能有助于促进 GABA 高含量食品的开发。综上所述, 阐明植物中的 GAD 活性是非常重要的。但是, 目前还没有关于研究植物种子中 GAD 活性的组织特异性定位方法的报告。

因此, 本研究的目的是通过使用 MS 成像的酶组织化学方法, 开发植物种子萌发过程中的 GAD 活性定位可视化方法。用于开发该方法的样品是大豆 (*Glycine max*) 种子和紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 种子, 这两种种子都属于豆科植物, 在食品科学中经常被用作模式植物。首先, 对组织进行了酶反应条件优化, 并使用 iMScope QT 详细研究了 GAD 活性的组织特异性定位。



图 1 基质升华仪 iMLayer™



图 2 成像质谱显微镜 iMScope™ QT

此外, 我们还研究了该方法是否适用于紫苜蓿萌发种子, 因为这种种子很小, 约为 3 mm, 很难分离和收集组织。

2. 实验

大豆种子购自 Greenfield Project。将大豆播种在蛭石上, 轻轻覆盖蛭石, 在 25°C 黑暗环境中培养 5 天, 使其萌发。紫苜蓿种子播种到皮氏培养皿中, 24 小时后得到萌发种子。在分析之前, 将回收的萌发种子在 -80°C 下冷冻保存。

制作冷冻切片时, 将大豆种子和紫苜蓿萌发种子放到模具中, 用 4% Carboxymethyl cellulose 溶液 (CMC 溶液) 包埋, 在 -80°C 下冷冻。制作的切片用粘附膜 (SECTION-LAB) 回收。用导电性双面胶 (3M) 将附着了样品的粘附膜固定在 Indium Tin Oxide (ITO) 载玻片 (Matsunami) 上。

将 50 mM Glu-d3 70 mM 磷酸缓冲液 (调节 pH 值分别为 3.0、5.8 和 8.0, 用于考察最佳的 pH 值)、2 mM EDTA 和 0.2 mM PLP 混合, 制备成 GAD 基质溶液。使用喷枪 (GSI Creos) 在每个切片上涂敷 50 μ L 的 GAD 基质溶液。涂敷基质后, 在加热至 40 - 60°C 的加湿腔室内反应 0 - 30 分钟。

使用基质升华仪 iMLayer™ (图 1), 通过升华法在样品上涂敷 α -氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA、西格玛·奥尔德里奇) 基质。

采用由 LCMS-9030 Q-TOF 质谱仪和带内置显微镜的 iMScope QT 大气压 MALDI 装置连接而成的质谱成像系统 (图 2) 进行 MS 成像。详细的测定条件如表 1 所示。所有质谱图均在正离子模式下获得的, 分子量范围为 m/z 95 - 155。数据分析使用的是 MS 成像数据分析软件 IMAGEREVEAL™ MS (图 3)。进行了 GAD 活性图像的 ROI (region of interest) 分析。在设置 ROI 时, 将显微照片确定的每个区域用固定尺寸圈住。依据由 ROI 获得的强度平均值绘制柱形图。

研究 3 组以上平均值的显著差异时, 进行了方差分析 (ANOVA), 并使用 Bonferroni 法进行了校正。

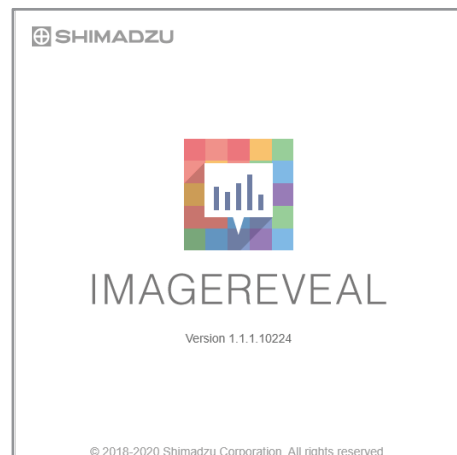


图 3 MS 成像数据分析软件 IMAGEREVEAL™ MS

3. 结果与讨论

证实 GABA 是由 GAD 生成的

为了证实 GAD 的酶促反应，我们在大豆种子切片上检测了基质生成产物的情况。使用喷枪涂敷 Glu-d3 基质后，在 40°C 下培养 15 分钟，然后升华 CHCA 基质，通过 MS 成像分析证实在大豆种子切片上检测到了基质和产物 GABA-d3。结果显示，在在 m/z 151.08 和 m/z 107.09 的平均质谱图中分别检测到了 Glu-d3 和 GABA-d3（图 4）。

此外，为了证实 GABA 的产生是由切片上的大豆 GAD 引起的，我们对高压灭菌灭活的切片进行了同样的实验。结果，在高压灭菌灭活的切片上没有检测到 GABA-d3（data not shown）。这些结果证实了 GAD 在大豆萌发种子切片上将 Glu-d3 转化为 GABA-d3 的酶促反应。

表 1 iMScope QT 测定条件

测定模式	:	positive
间距 (空间分辨率)	:	25 μ m
m/z 范围	:	95 - 155
样品电压	:	3.50 kV
检测器电压	:	2.50 kV
激光照射次数	:	100 次
激光重复频率	:	1000 Hz
激光照射直径设定值	:	2
激光强度	:	77.6

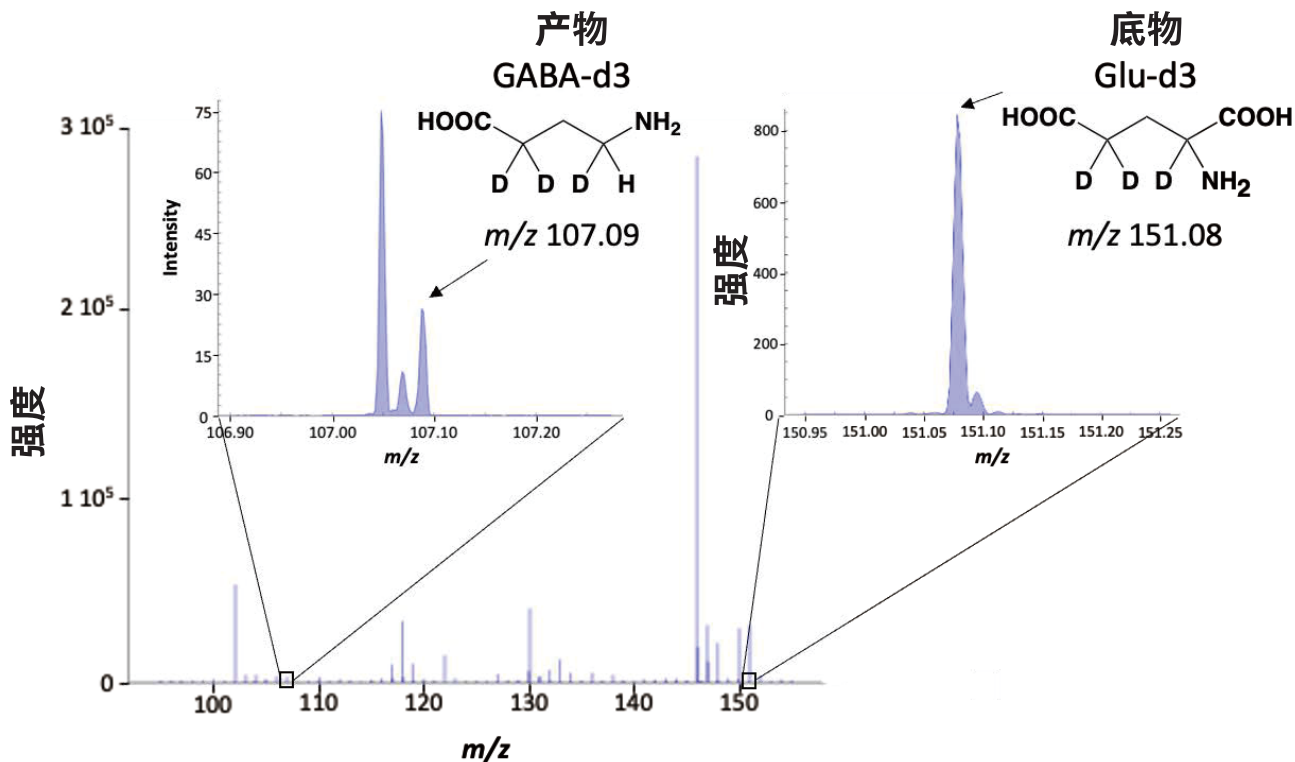


图 4 大豆萌发种子切片上的质谱图
可以看出，反应产物 GABA-d3 的峰值 (m/z 107.09) 来自基质 Glu-d3 (m/z 151.08)。
另外，iMScope QT 是 Q-TOF 型质谱仪，可以看出峰分辨率极高。

GAD 反应条件的研究

我们研究了用于 GAD 活性可视化的基质溶剂 pH 值、酶促反应温度和酶促反应时间。结果显示，与 pH 3.0 相比，在 pH 5.8、pH 8.0 的条件下检测到了明显更强的活性（图 5A）。其中，最佳 pH 值设定为 5.8，因为在 pH 值为 5.8 时活性最强。在 40°C、50°C、60°C 的条件下对酶促反应温度进行了比较。温度越高，活性越强，将 40°C 和 60°C 进行比较时，观察到了显著差异（图 5B）。根据上述结果，将反应的最佳温度确定为 60°C。涂敷基质后，酶促反应培养时间在 0-5 分钟内呈线性增加，但在 5 分钟之后达到稳态（data not shown）。根据这些结果，将反应时间确定为 3 分钟。

萌发种子的 GAD 活性可视化

在上述差异性反应条件下，进行萌发种子的 GABA-d3 MS 成像分析，实现 GAD 活性分布的可视化。其结果如图 5C 所示。图 5C 显示，GABA-d3 在子叶部位分布极少，在胚轴部位较多。特别是在下胚轴部位中，GABA-d3 在与子叶部位相对的胚轴顶端部位分布更高。结果表明，萌发种子中 GAD 活性较高的部位主要是下胚轴而非子叶。

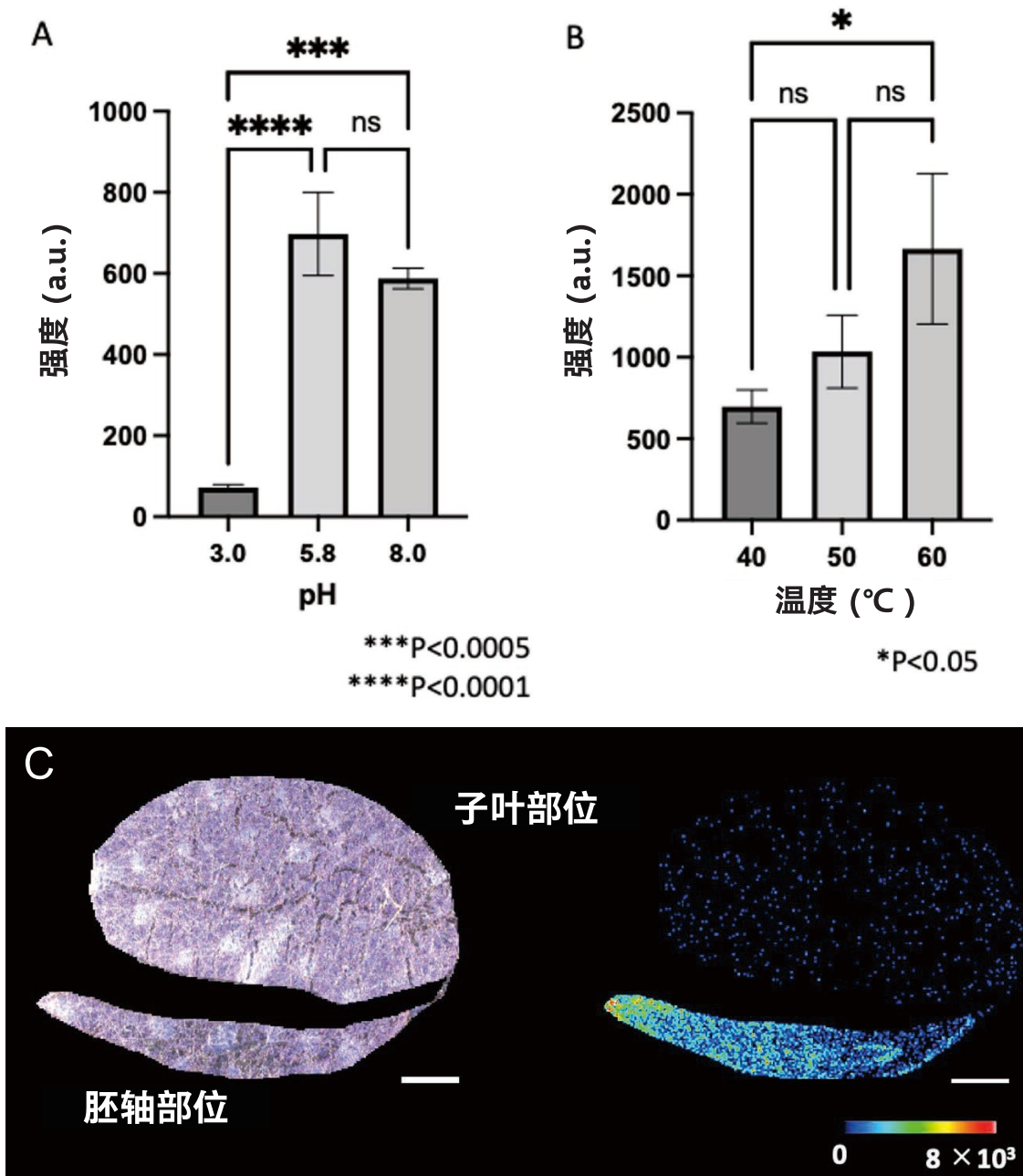


图 5 大豆种子组织切片上的反应条件研究和最佳条件下的活性分布 (A) 基质溶液 pH 值、(B) 反应温度和 (C) pH 5.8、60°C、反应时间 3 分钟时的 GABA-d3 分布。通过在最佳条件下进行 MS 成像，观察到了 GABA-d3 在萌发大豆切片中胚轴部位的蓄积。

GAD 酶促反应条件下萌发种子胚轴中的 GAD 活性

图 5C 所示的萌发种子中 GABA-d3 的 MS 成像结果证实 GABA-d3 在下胚轴部位中的分布存在偏差, 这源于组织学结构。因此, 我们尝试对胚轴部位进行了高空间分辨率分析 (空间分辨率: 15 μm)。MS 成像结果如图 6A 所示。MS 成像结果显示, GABA-d3 高度分布在胚轴部位的血管系统根部分生组织中。另一方面, 与上述两个部位相比, GABA-d3 在根部薄壁组织中的分布较少。

紫苜蓿种子的 GAD 活性可视化

紫苜蓿种子与大豆种子不同, 直径只有 1-2 mm, 吸水、萌发后的种子也只有 2-3 mm 左右。这种样品很难通过分离子叶和下胚轴部位来进行分析, 这说明利用 MS 成像可视化酶活性是非常有用的。和大豆种子一样, 对萌发的紫苜蓿种子进行了 GABA-d3 的 MS 成像。结果如图 6B 所示。从获得的 GABA-d3 的 MS 图像中证实, 和大豆种子一样, 与子叶部位和根部柔软组织相比, GABA-d3 在根尖端部位 (root tip) 的分布较多。

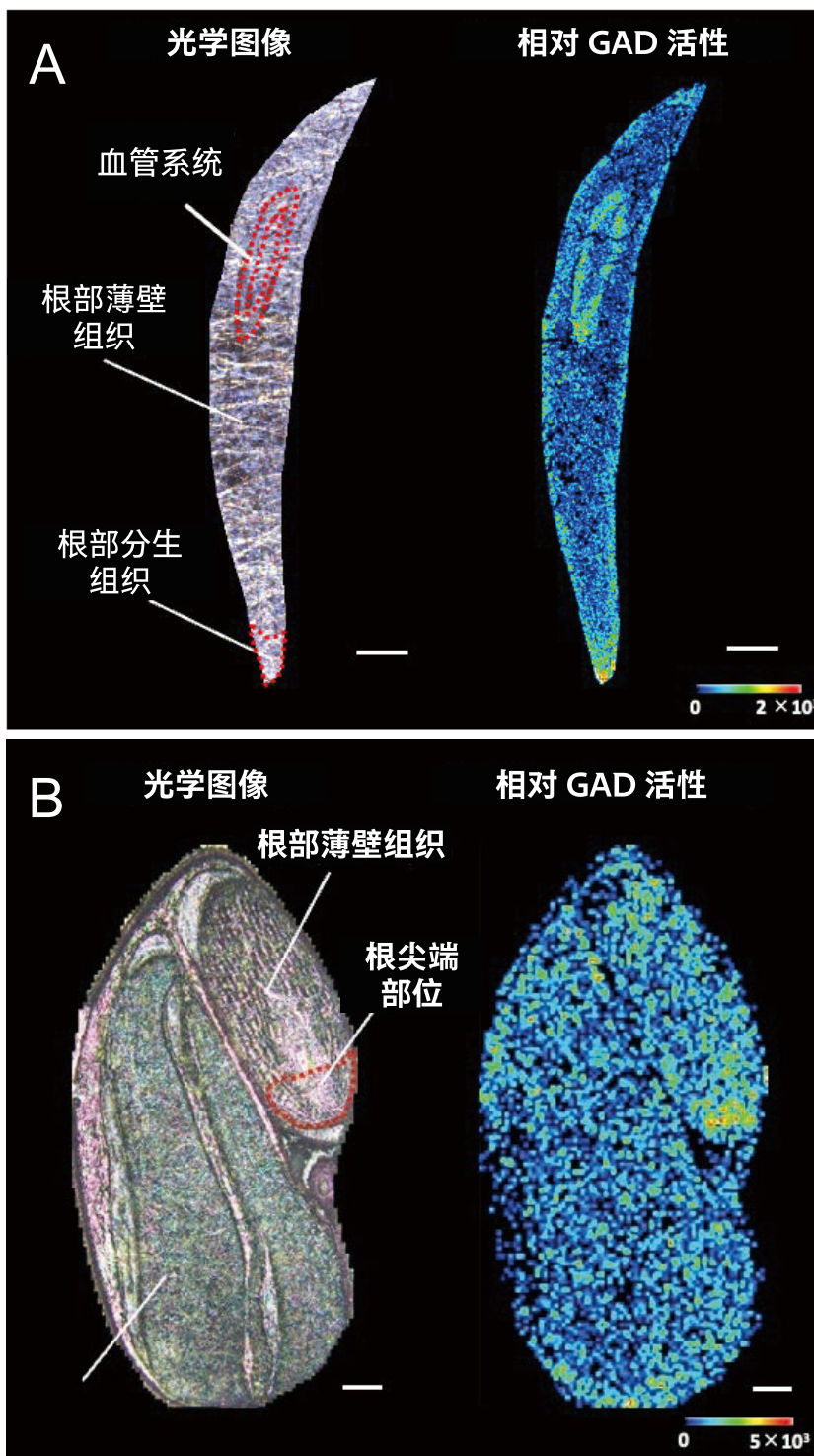


图 6 (A) 大豆种子胚轴部位的高分辨率成像和 (B) 紫苜蓿种子的 MS 成像
各种种子在根尖部位均有较高的离子强度。表明 GAD 在细胞分裂活跃部位具有更高的活性。

4. 讨论

本研究对基质溶剂的 pH 值、酶反应温度和酶反应时间进行了研究,以比较 GAD 活性的酶反应条件。有报告称,在 Cowpea¹⁴⁾、potato¹⁵⁾、germinated rice¹⁶⁾ 等植物物种的前期研究中,GAD 活性的最佳 pH 值是 pH 5.8-6.0。另外,在测定大豆 GAD 活性的前期研究中,也使用了 pH 5.8¹⁷⁾,因此,与本研究的 MS 成像验证并不矛盾。有报告称,Faba bean¹⁸⁾ 和 potato¹⁵⁾ 等植物的 GAD 最佳温度为 40°C,而 germinated rice¹⁶⁾ 和 squarsh¹⁹⁾ 的最佳温度是 60°C,推断最佳温度因植物物种的不同而异。在通过本实验获得的大豆萌发种子结果证实,60°C 时的 GAD 活性最高。结果表明,大豆中 GAD 活性的最佳温度为 60°C。在残存足够的基质的情况下,酶促反应时间恒定,生成物数随反应时间而线性增加。因此,在本研究中,以反应线性进展为条件,将反应时间 3 分钟的 GABA-d3 检测强度视为 GAD 活性的相对活性值分布。

有报告称,进行 40 小时萌发处理的大豆种子的 GAD 活性与未萌发种子相比增加 2.81 倍²⁰⁾,表明大豆种子的 GAD 活性在萌发初期被激活。该结果与本研究结果一致。有报告称,大豆种子在进行萌发处理 5 天之内的 GAD 基因表达量增加²¹⁾,本研究结果也得出了 GAD 基因表达量增加的结果,可能的原因是酶活性增加。

而且,获得的 GABA-d3 分布表明,萌发过程中 GAD 活性的增加是胚轴部位的 GAD 活性增加引起的。大豆种子的子叶主要是存储和供应营养,在萌发初期,GABA 的生物合成不活跃。在将子叶部位和胚轴部位分离的前期研究¹⁷⁾中也表明了胚轴部位的 GAD 活性高于子叶部位的 GAD 活性,与本研究结果一致。上述结果表明,我们建立了一种利用 MS 成像可视化大豆种子中 GAD 活性定位的方法。

此外,高空间分辨率分析结果表明,维管系统不仅用于运输光合产物等 Small molecule,而且用于输送 mRNA、proteins 等的大分子量物质²²⁾,表明可能具有大量的 GAD 蛋白,GAD 活性可能很强。另外,在前期研究²³⁾中,在将萌发大豆根部切成每段 1 cm 的部位和子叶的 GAD 活性、Ca 水平、CaM 量进行研究后发现,与子叶等成熟的组织相比,萌发大豆根部尖端 1 cm 的 GAD 活性和 Ca 水平增加。而且,与根的其他部位相比,根部尖端 1 cm 处检出的 CaM 的量更多。根据上述结果,大豆 GAD 可能是一种钙/钙调蛋白(Ca²⁺/CaM)依赖性酶²⁴⁾,因此在根尖分裂组织中具有更高的活性。

其次,本研究首次利用质谱成像技术对苜蓿萌发种子中 GAD 活性的定位进行了可视化。和大豆种子一样,紫苜蓿种子根端的 GAD 活性较高,表明细胞分裂活跃。

5. 结论

在本文中,本研究首次成功地通过酶组织化学方法,应用 MS 成像技术对大豆种子中 GAD 活性的定位进行了可视化分析。而且,通过本方法可以阐明传统方法中无法阐明的大豆组织内的 GAD 活性分布。此外,本方法还成功地实现了紫苜蓿种子组织间 GAD 活性定位的差异的可视化,这表明本方法具有很强的可扩展性。除豆科种子之外,本方法还可以应用于研究其他植物种子的 GAD 活性分布。在其他植物物种中,萌发糙米和萌发大麦也和萌发大豆一样,作为 GABA 高含量食品而在市场上流通,通过应用本研究成果,有望阐明 GAD 对该种子萌发过程所产生的作用。最终,有望促进 GABA 高含量食品的开发。

此外,参与 GABA 生物合成的 GAD 与植物的盐胁迫响应密切相关。有报告称,在一些植物物种中,盐胁迫会增加萌发过程中的 GAD 活性值和 GAD 基因表达。

例如,大豆种子²⁵⁾在盐胁迫下与 GAD 基因表达的增加有关,蚕豆种子^{26,27)}在低氧胁迫和盐胁迫的组合环境下,与包括 GAD 在内的 GABA 代谢途径有关。因此,将本方法用于上述植物种子萌发阶段,可以阐明受到盐胁迫的萌发种子的 GAD 活性定位,并有助于阐明 GAD 作为盐胁迫响应在组织学方面的作用。另外,过度灌溉等农作物造成的盐害已经成为世界范围内的重大问题,并影响到了农作物的种子萌发²⁸⁾。在此背景下,如果能够阐明种子萌发过程中 GAD 对耐盐胁迫的作用,可为开发耐盐品种提供帮助,因此,本方法在农业生产方面有一定价值。此外,由于在植物种子萌发过程中,GAD 活性对胁迫反应的调节可以影响 GABA 的生物合成,因此,有望应用于包括开发 GABA 高含量食品在内的食品生产领域。

同时 MS 成像还是观察内源代谢物和外源化合物的有力工具。MS 成像可用于内源性代谢产物和外源性化合物定位、酶活性定位的同时可视化,并对其进行比较。例如,有报告称,GABA 会在香蕉果实的催熟过程中增加²⁹⁾,和萌发大豆、萌发大麦、萌发糙米一样,作为 GABA 高含量食品而受到广泛关注。另外,还有报告称,GAD 基因表达会在成熟过程中增加³⁰⁾。但是,目前尚未研究果实成熟过程中 GAD 活性的变化及其定位的实例。因此,通过使用 MS 成像对果实催熟过程中内源性 GABA 分布和 GAD 活性定位的同时可视化,并对 MS 成像结果进行比较,可以阐明果实中 GABA 与 GAD 活性的因果关系。上述结果有望对开发 GABA 高含量品种等做出贡献。

此外，通过比较作为外源化合物的植物调节剂的分布和酶活性的定位，有可能间接揭示植物调节剂对植物体内酶活性的影响。这有助于阐明现有植物调节剂的作用机制，并开发新的调节剂。

在本研究中，我们是以 GAD 的酶活性为对象，但如上所述，我们的研究小组之前已经证明该方法对 ChE 和 ChAT 也有效。虽然酶的种类比此处列出的要多得多，但我们认为，这种向组织表面涂敷基质并绘制酶反应产生的代谢产物图谱的简单方法，将来会对植物和动物体内各种酶活性的可视化研究提供帮助。

< 参考文献 >

- Ikuta S et al Shinohara N, Fukusaki E, Shimma S. Mass spectrometry imaging enables visualization of the localization of glutamate decarboxylase activity in germinating legume seeds. *J. Bioeng. Biosci.* (in press)
- Gomori, G. Microtechnical demonstration of phosphatase in tissue sections. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 42, 23 (1939)
- Walker, R. P., Chen, Z. H., Johnson, K. E., Famiani, F., Tecsí, L., and Leegood, R. C.: Using immunohistochemistry to study plant metabolism: The examples of its use in the localization of amino acids in plant tissues, and of phosphoenolpyruvate carboxykinase and its possible role in pH regulation, *J. Exp. Bot.*, 52, 565-576 (2001).
- Jiang, J.: Fluorescence in situ hybridization in plants: Recent developments and future applications, *Chromosome Res.*, 3, 153-165 (2019).
- Läuchli, A.: Cryostat technique for fresh plant tissues and its application in enzyme histochemistry, *Planta*, 70, 13-25 (1966).
- Molero, M. E., Alarcón, M. V., Uriarte, D., Mancha, L. A., Moreno, D., and Francisco-Morcillo, J.: Histochemical and immunohistochemical analysis of enzymes involved in phenolic metabolism during berry development in *Vitis vinifera* L., *Protoplasma*, 256, 25-38 (2019).
- Takeo, E., Fukusaki, E., and Shimma, S.: Mass spectrometric enzyme histochemistry method developed for visualizing in situ cholinesterase activity in *Mus musculus* and *Drosophila melanogaster*, *Anal. Chem.*, 92, 12379-12386 (2020).
- Takeo, E., Sugiura, Y., Ohnishi, Y., Kishima, H., Fukusaki, E., and Shimma, S.: Mass Spectrometric enzyme histochemistry for choline acetyltransferase reveals de novo acetylcholine synthesis in rodent brain and spinal cord, *ACS Chem. Neurosci.*, 12, 2079-2087 (2021).
- A.P. Wisman, M. Minami, Y. Tamada, S. Hirohata, K. Gomi, E. Fukusaki, S. Shimma Visualization of dipeptidyl peptidase B enzymatic reaction in rice koji using mass spectrometry imaging *J. Biosci. Bioeng.*, 134 (2022), pp. 133-137
- Li, L., Dou, N., Zhang, H., and Wu, C.: The versatile GABA in plants, *Plant Signal Behav.*, 16, e1862565 (2021).
- Matsuyama, A., Yoshimura, K., Shimizu, C., Murano, Y., Takeuchi, H., and Ishimoto, M.: Characterization of glutamate decarboxylase mediating gamma-amino butyric acid increase in the early germination stage of soybean (*Glycine max* [L.] Merr), *J. Biosci. Bioeng.*, 107, 538-543 (2009).
- Zhao, G., Xie, M., Wang, Y., and Li J.: Molecular mechanisms underlying gamma-aminobutyric acid (GABA) accumulation in giant embryo rice seeds, *J. Agric. Food Chem.*, 65 4883-4889 (2017).
- AL-Quraan N., AL-Ajlouni Z., and Obedat D.: The GABA shunt pathway in germinating seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.) under salt stress, *Seed Sci Res.*, 29, 250-260 (2019).
- Brandon, S. Johnson, Narendra, K. Singh, Joe, H. Cherry, and Robert, D. Locy.: Purification and characterization of glutamate decarboxylase from cowpea, *Phytochemistry*, 46, 39-44 (1997).
- Sstyanarayan, V. and Nair, P. M.: Purification and characterization of glutamate decarboxylase from *Solanum tuberosum*, *Eur. J. Biochem.*, 150, 53-60 (1985).
- Pramai, P., Thanasukarn, P., Thongsook, T., Jannoey, P., Chen, F., and Jiamyangyuen, S.: Glutamate decarboxylase (GAD) extracted from germinated rice: Enzymatic properties and its application in Soymilk, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 65 166-170 (2019).
- Guo, Y., Yang, R., Chen, H., Song, Y., and Gu, Z.: Accumulation of gamma-aminobutyric acid in germinated soybean (*Glycine max* L.) in relation to glutamate decarboxylase and diamine oxidase activity induced by additives under hypoxia, *Eur. Food Res. Technol.*, 234, 679-687 (2012).
- Runqiang, Y., Yongqi, Y., Qianghui G., and Zhenxin G.: Purification, properties and cDNA cloning of glutamate decarboxylase in germinated faba bean (*Vicia faba* L.), *Food Chem.*, 138, 1945-1951 (2013).
- Matsumoto, T., Yamaura I., and Funatsu M.: Improved purification and spectroscopic properties of squash glutamate decarboxylase, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 60, 889-890 (1996).
- Yang, R., Feng, L., Wang, S., Yu, N., and Gu, Z.: Accumulation of gamma-aminobutyric acid in soybean by hypoxia germination and freeze-thawing incubation, *J. Sci. Food Agric.*, 96, 2090-2096 (2016).
- Luo, X., Wang, Y., Li, Q., Wang, D., Xing, C., Zhang, L., Xu, T., Fang, F., and Wang, F.: Accumulating mechanism of gamma-aminobutyric acid in soybean (*Glycine max* L.) during germination, *Int. J. Food Sci.*, 53, 106-111 (2018).
- Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.R., Helariutta, Y., He, X. Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S. M., and other 6 authors: The plant vascular system: Evolution, development and functions, *J. Integr. Plant Biol.*, 55, 294-388 (2013).
- Oh, S., and Choi, W.: Changes in the levels of gamma-aminobutyric acid and glutamate decarboxylase in developing soybean seedlings, *J. Plant Res.*, 114, 309-313 (2001).
- Snedden, W. A., Arazi, T., Fromm, H., and Shelp, B. J.: Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiol.*, 108, 543-549 (1995).
- Yin, Y., Yang, R., Guo, Q., and Gu, Z.: NaCl stress and supplemental CaCl₂ regulating GABA metabolism pathways in germinating soybean, *Eur. Food Res. Technol.*, 238, 781-788 (2014).
- Yin, Y., Cheng, C., and Fang, W.: Effects of the inhibitor of glutamate decarboxylase on the development and GABA accumulation in germinating fava beans under hypoxia-NaCl stress. *RSC Advances*, 8, 20456-20461 (2018).
- Yang, R., Wang, S., Yin, Y., and Gu, Z.: Hypoxia treatment on germinating faba bean (*Vicia faba* L.) seeds enhances GABA-related protection against salt stress. *Chil. J. Agric. Res.*, 75, 184-191 (2015).
- Tester, M. and Davenport, R.: Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Ann. Bot.*, 91, 503-527 (2003).
- Parijadi R., Yamamoto K., Ikram M., Dwivany F., Wikantika K, Putri S, Fukusaki E.: Metabolome Analysis of Banana (*Musa acuminata*) Treated With Chitosan Coating and Low Temperature Reveals Different Mechanisms Modulating Delayed Ripening. *Front. Sustain. Food Syst.*, 6, (2022).
- Hu, W., Liu, J., Yang, X., Zhang, J., Jia, C., Li, M., Xu, B., and Jin, Z.: Identification of a Gene Encoding Glutamate Decarboxylase Involved in the Postharvest Fruit Ripening Process in Banana. *HortScience horts*, 49, 1056-1060 (2014)

岛津应用云



iMLayer、iMScope、LCMS 和 IMAGEREVEAL 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家 / 地区的商标。



岛津企业管理（中国）有限公司
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话： 800-810-0439
400-650-0439

免责声明：

* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；
* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2022年09月