

海藻中的植物激素检测方法*

THE DETECTION METHODS OF PHYTOHORMONES IN ALGAE

黄冰心 韩丽君 范 晓

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

随着植物激素突变株的鉴定和分子生物学检测手段的进步,高等植物的生长和繁殖受到内源性生长物质或激素的调节已是不争的事实。目前已经被广泛公认的植物激素有5大类:生长素类、细胞激动素类、赤霉素类、脱落酸类和乙烯。这些激素协同作用,调节植物体各部分的生长速率和不同组织器官的分化,控制生殖过程。

使用海藻为原料制备海藻提取液作为海藻肥首次在英国应用于农业生产,自此以后这种传统生物技术在全世界广泛使用,已经发展为各类商业产品进入市场,如 SMB、Seasol、Kelpark 66 等。这些海藻肥的效用在于利用海藻中的植物激素(特别是细胞激动素)来促进陆生植物的生长。用于粮食、蔬菜、水果、花卉可以提高作物产量,改善植物品质,延长果实的生命期,增强作物的耐寒性,抑制病虫害^[1]。植物激素参与植物体内的生理反应,强化植物对营养物质的吸收^[2]。吲哚乙酸可以促进单细胞和多细胞藻的生长和分裂^[3],赤霉素增加大型海藻的生长速率,细胞激动素可以促进藻类生长,加速细胞分裂,增加蛋白质和叶绿素的含量^[4],并可调节藻类的形态建成和再生。脱落酸则表现出对植物的某些生理过程的抑制作用,乙烯对藻类的细胞分裂有促进作用,影响藻类的生长速率^[5]。为了了解植物激素在海藻植物生长剂中的作用,它们的含量必须首先被测定。因此研究

者们作了大量的海藻粗提液的生物活性的定性和定量实验。文献报道的检测方法有以下几种。

1 生物检测法

生物检测法是检测生物活性的唯一手段,因此沿用至今。目前使用的生物检测法主要有:(1)萝卜叶扩张分析法;(2)大麦叶感觉分析法;(3)莴苣下胚轴生长分析法;(4) *Amaranthus Caudatus* 分析法;(5)烟草愈伤组织和茎组织分析法;(6)大豆组织分析法;(7)黄花草种子叶分析法。通过对海藻液的生物检测可以获得有用的数据,但是它同时有很大的局限性,因为它不能对其活性准确的定性和定量。例如使用不同的生物检测法测定一系列海藻中的赤霉素类似物(表1),当生物检测受到非特异性干扰而导致生长抑制现象,就不像出现生长促进现象那么容易解决。而生长促进是否由我们所寻找的物质导致,也很难判断。特别对于赤霉素来说没有特异性鉴定的物质。因此生物检测法一般用于海藻粗提液的生物活性检测。

需要指出的是不同结构的赤霉素、细胞激动素或生长素对不同生物检测法的响应不同。例如大豆组织分析法对于细胞激动素来说检测最快速,但是对于异戊烯基腺嘌呤(iP)和异戊烯基腺苷(iPA)的响应不如对玉米素Z和玉米素核苷ZR^[6]。所以此时iP和iPA有可能测不出。

如上所述,生物检测法的检测结果是寻找藻类中激素的第一步,经测试确定生物活性存在后,才有必要作下一步的纯化鉴定。

2 气相色谱法

藻类激素的研究中还有使用气相色谱法(表2)。通过与标准样品的共色层分离(Co-chromatography)来鉴定待测样品中的激素及其含量,但是它对激素不能作最后的定论,因为无法排除杂质和污染物与标准品的共色层分离。特异的预纯化步骤可能可以减少这种情况。高效液相色谱或薄层层析是样品纯化必不可少的步骤,再就是选择特异的检测器。测定脱落酸ABA用电子捕获检测器ECD,测定吲哚乙酸IAA用火焰光度检测器FPT。

3 气质联用法

藻类激素研究中气-质联用法的检测是结论性的(表3)。因为可以得到被测物的准确化学结构,从而确认其激素的性质,并精确的定量。检测中需要用适当的稳定的同位素作内标。

* 国家自然科学基金资助项目
29932030号。中国科学院海洋研究所调查研究报告第4194号。
收稿日期:2000-10-20;
修回日期:2001-03-20

表 1 海藻中类赤霉素活性物质的检测

藻类种名	检测方法	检测结果	作者
甘紫菜(<i>Porphyra tenera</i>)	大麦叶感觉分析法	检出	Murakami (1966)
钩沙菜(<i>Hypnea musciformis</i>)	大豆组织分析法	检出	Jennings and McComb (1967)
皮江藻(<i>Gracilaria corticata</i>)	黄瓜种子子叶分析法	检出	Raju (1972)
石枝藻(<i>Lithothamnium calcareum</i>)	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Augier (1974)
冈村紫菜(<i>P. oka murai</i>)	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Augier (1974)
浒苔(<i>Enteromorpha prolifera</i>)	大豆组织分析法	100 ng/g, F W	Jennings (1968)
	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Augier (1974)
曲浒苔(<i>E. flexuosa</i>)	黄瓜种子子叶分析法	检出	Raju (1972)
心型鞘藻(<i>Oedogonium cardiacum</i>)	大豆组织分析法	检出	Banerjee and Horsley
蕨菜(<i>Caulerpa prolifera</i>)	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Augier (1974)
	萝卜叶扩张分析法	检出	Jacobs (1968)
刺松藻(<i>Codium fragile</i>)	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Augier (1974)
冠轮藻(<i>Chara coronata</i>)	大麦叶感觉分析法	检出	Murakami (1966)
石莼(<i>Ulva</i> sp.)	大麦叶感觉分析法	检出	Ogawa and Imamura (1966)
墨角藻(<i>Fucus vesiculosus</i>)	大豆组织分析法	0.3 ~ 0.5 ng/g, F W	Radley (1961)
	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Borowczak 等 (1977)
鼠尾藻(<i>Sargassum thunbergii</i>)	大麦叶感觉分析法	检出	Ogawa and Imamura (1966)
无肋马尾藻(<i>S. fulvellum</i>)	黄瓜种子子叶分析法	检出	Ogawa and Imamura (1966)
幅叶藻(<i>Petalonia fascia</i>)	莴苣下胚轴生长分析法	检出	Augier (1974)

表 2 气相色谱法检测海藻中的激素

藻类种名	检测方法	激素种类	作者
仙菜(<i>Ceramium rubrum</i>)	GC-ECD	ABA	Tietz 等 (1989)
糖海带(<i>Laminaria saccharina</i>)	GC-ECD	ABA	Tietz 等 (1989)
扁平松藻(<i>Codium latum</i>)	GC-ECD	乙烯	Boyer 等 (1989)
大昆布(<i>Ecklonia maxima</i>)	GC-ECD	ACC	Zhang, W. 等 (1993)
甘紫菜(<i>Porphyra perforata</i>)	GC-ECD	乙烯	Zhang, W. 等 (1993)

ABA 为脱落酸;ACC 为 1-氨基环丙烷-1-羧酸。

表 3 气-质联用法检测海藻中的细胞激动素

藻类种名	所测部位	细胞激动素	定量(ng/g, F W)	作者
纤细裸藻(<i>Euglena gracilis</i>)	tRNA	cis ZR iPA ZR		Swa minathan and Bock(1977)
半叶紫菜(<i>Porphyra katadai</i>)	全藻	iPA	0.6	Zhang 等 (1991)
	tRNA	iPA	0.5	Zhang 等 (1992)
		ZR	1.02	
巨藻(<i>Macrocystis pyrifera</i>)	幼叶	Z	23.4	De Nys 等 (1990)
球状轮藻(<i>Chara globularis</i>)	全藻	iPA	0.4	Zhang 等 (1991)
杉叶蕨藻(<i>Caulerpa taxifolia</i>)	全藻	iP		Farooqi 等 (1990)
囊藻(<i>Vanlanopsis pachynema</i>)	全藻	Z		Farooqi 等 (1990)
印度钙扇藻(<i>Udotea indica</i>)	全藻	ZR,iP		Farooqi 等 (1990)

注:iP 为异戊烯基腺嘌呤;iPA 为异戊烯基腺苷;Z 为玉米素;ZR 为玉米素核苷。

4 酶联免疫法

酶联免疫法的分析非常特异和

灵敏,Hirsch 采用酶联免疫法分析了 64 种海藻。但是它的最大弱点是无法排除交叉反应引起的错误,高

度的结合特异性不能保证检测准确,高浓度的与抗体有弱亲和力的物质会干扰抗原结合。有机化合物



表 4 酶联免疫法测定细胞激动素

藻类种名	部位	细胞激动素	含量(ng/g,FW)		作者
大昆布(<i>Ecklonia maxi ma</i>)	茎	Z	ca 6		Hof man 等 (1986)
		ZR	ca 5		
		iPA	ca 47.5		
巨藻(<i>Macrocystis pyri fera</i>)	叶		幼期	成熟期	De Nys 等 (1990)
		iP	1.4	2.8	
		iPA	3.7	2.9	
		iPNT	1.3	0.9	

也有可能污染。所以酶联免疫法的路线准确是非常重要的, Pengelly 叙述了酶联免疫法标准步骤。

需要了解的是一种植物激素的多种构型对不同抗体有不同的交叉反应。要想得到可靠的定性和定量的数据, 仍需用高效液相色谱和薄层层析。比如细胞激动素的葡萄糖苷结构不与现有的任何抗体交叉作用。酶联免疫法已经用于检测一系列海藻中的植物激素(表 4)。

高等植物中的激素研究已经取得了大量成就, 而藻类中植物激素的研究远远落后于高等植物。研究表明, 藻类中激素的情况比较复

杂, 藻类可能以自己特有的激素调节其生长发育, 也可能与附生植物和微生物合作完成。目前可靠的激素分析技术如气质联用 (GC/MS)、核磁共振 (NMR) 等已经建立。在生物检测法的基础上, 经过气相色谱 (GC) 或者高效液相色谱 (HPLC) 的分离纯化, 再通过气质联用 (GC/MS)、核磁共振 (NMR) 检测技术分析检测, 可以确定活性物质的化学结构, 从而可以进一步分析其激素性质。藻类中植物激素的研究取得了一定进展, 但是要确立藻类的激素体系, 必须有研究方法的更新和突破。

主要参考文献

- 1 Brault Mathias *et al.* . *Plant Physio . Bioche misty* , 1999 , 37 : 403 ~ 412
- 2 Chen C. W. . *Physiol . Plant* , 1997 , 101 : 665 ~ 673
- 3 Kambo j. *et al.* . *Plant Growth Regulation* , 1999 , 28 : 199 ~ 205
- 4 Stirk W. A. *et al.* . *J . Appl . Phycol .* , 1998 , 9 : 327 ~ 330
- 5 Bartak P. *et al.* . *J . chro ntogr . A.* , 1998 , 18 : 231 ~ 238
- 6 Masakova V. *et al.* . *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* . , 1998 , 17 : 39 ~ 44

(本文编辑:张培新)