

16 种海藻中植物生长素的提取、 分离纯化和含量测定*

韩丽君 范晓 袁兆惠

(中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

提要 以荧光分光光度检测法和小麦胚芽鞘切段生物试法对 16 种中国东部沿海生长的海洋藻类中的生长素含量进行了定量分析。结果表明,所测定的 16 种海藻,包括红、绿及褐藻中均有生长素(IAA)存在。海藻不同种类之间的含量变化较大,褐藻中的含量低于红藻和绿藻。小麦胚芽鞘切段生物试法对 IAA 测定的含量变化为 5.3—110.2 ng/g FW 之间,荧光分光光度检测法测定的含量变化为 1.1—46.9 ng/g FW。小麦胚芽鞘切段生物试法对 IAA 测定的含量明显高于荧光分光光度检测法测定的相同种含量。讨论结果认为,小麦胚芽鞘切段生物试法的测定结果虽然灵敏度高,但易受实验材料不均一性的制约,试验周期长,并受环境因子的干扰,适用于海藻中生长素的半定量分析;荧光分光光度检测法相对适合于海藻中生长素的定量分析,有很好的可行性。

关键词 海藻,植物生长素,荧光分光光度检测法,小麦胚芽鞘切段生物试法,含量分布
中图分类号 P931

海藻植物生长素 (Auxin) 是一类重要的内源植物激素,主要由吲哚类衍生物组成,例如吲哚乙酸(IAA)、吲哚甲酸(ICA)、吲哚丙酸(IPA)、吲哚丁酸(IBA)、吲哚乙腈(IAN)及萘乙酸(PAA)等。目前对海藻中生长素的研究报道很少(Stirk *et al.*, 1997),现有的报道也仅限于发现最早、研究最多的 3-吲哚乙酸。本文中作者将吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)作为生长素的主要代表性组分重点讨论。生长素虽然在海藻中的分布很广而且在不同海藻中的含量分布不同,但是总体比在高等植物中的含量要低得多,新鲜海藻中生长素的含量约为 0.1—100 ng/g (Maruyama *et al.*, 1989)。海藻中生长素的含量和分布的差异主要受海藻发育、部位和生长素存在形态的影响。生长素的合成一般在植物体的尖端,如根和茎的尖端、顶芽和腋芽等。由于其移动主要表现为向基移动,因此海藻中它的含量在顶芽中最高 (Van Overbeek, 1940a,b)。国内外已有的研究表明,由于生长素

是重要的植物内源激素,因而它对植物种子的萌芽和强壮根系发育生长有明显的促生长作用。国际上对这种内源植物激素的研究涉及到诸多方面,但是其中涉及到提取、纯化分离和测定方法的报道很少(Ashen *et al.*, 1999),而且不够系统和充分。本文中作者采用荧光分光光度检测法和小麦胚芽鞘切段生物试法对 16 种中国东部沿海生长的海洋藻类中的生长素含量进行了定量分析,从中确认了荧光分光光度检测法的可行性。本研究的目的在于探索海藻中植物生长素的含量分布状态和促细胞伸长活性作用的利用价值等。

1 采样与方法

1.1 采样

16 种海藻分别于 1999 年 4—5 月和 2000 年的 3—4 月采集于青岛太平角海域。

1.2 实验方法

1.2.1 海藻样品的处理 新鲜采集的海藻样

* 国家 863 高技术研究发展计划资助项目, 2001AA620503 和 2004AA625030 号; 中国科学院方向性创新项目, KZCX3-SW-215 号。韩丽君, 研究员, E-mail: ljhan@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2003-04-12, 收修改稿日期: 2004-08-16

品用干净的海水冲洗后,除去其表面附着的微小生物和杂质,用吸水纸将海藻表面的水分吸干,称取两份各 10g 海藻样品,将其中一份样品与 5mg 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT,作为抗氧化剂)以及 50ml 90% 甲醇溶液一起加入到组织破碎机中,破碎约 2min。破碎液转移至锥形瓶中,再加入 50ml 90% 甲醇溶液,锥形瓶用塞子密封后置于暗室中的磁力搅拌器上于 4℃ 搅拌,浸提 4h。另外一份未经破碎的样品置于另一锥形瓶中,加入 100ml 90% 甲醇溶液,用与上述同样的方法在暗室中 4℃ 搅拌,浸提 4h,获得提取液。

1.2.2 提取液的纯化分离过程 过滤浸提液,滤渣用 20ml 甲醇洗后弃去滤渣,≤35℃减压浓缩至 15ml 水相。石油醚萃取 3 次(1:1),弃去石油醚,保留水相。调 pH=8.0,正丁醇萃取 3 次(1:1),保留水相。调 pH=3,乙醚(0℃,C_{BHT}=100mg/L)萃取 3 次,弃去乙醚相。保留水相并调 pH=3,乙醚(0℃,C_{BHT}=100mg/L)萃取 3 次。乙醚减压蒸干用 50% 甲醇(0℃)1ml 洗出,加 C_{BHT}=100mg/L,过 DEAE 纤维素柱并用 0.05mol/L, pH=8.0 的缓冲液洗脱, C_{BHT}=100mg/L。弃去水相,调 pH=3.0,乙醚(0℃,C_{BHT}=100mg/L)萃取 3 次,乙醚相减压蒸干。获得的生长素提取物用于

定性、定量测定。

1.2.3 小麦胚芽鞘切段试法 是在 Nitsch 等(1955)方法的基础上结合 William 等(1985)的方法并加以改进。标准溶液的配制是以培养基为溶剂配制一定浓度的 IAA 标准溶液。海藻样品的测定是将纯化后的提取物用培养基稀释至 20ml 后,按照标准曲线的制备方法进行操作,获得相当于 IAA 的生长素含量。

1.2.4 荧光分光光度法 其基本原理是在催化剂的作用下 IAA 与乙酸酐形成具有荧光的物质,在特定的激发波长和发射波长条件下测定样品吸光值。吲哚 α 吡喃酮的最大激发波长为 450nm,发射波长为 480nm,但是为了避免高峰散射的影响,低浓度的测定选用最大激发波长为 440nm,发射波长为 490nm。在反应中止 60s 后用 850 荧光分光光度计在选定波长下测定 IAA 含量。

2 结果与讨论

2.1 小麦胚芽鞘切段生物试法测定的 IAA 含量
不同 IAA 标准浓度下培养小麦胚芽鞘的生长结果见表 1。小麦胚芽鞘切段生物试法标准曲线列于图 1,用此法测定的海藻样品中生长素含量相当于 IAA 的所有生长素总量(图 2)。

表 1 不同 IAA 标准浓度下培养小麦胚芽鞘的生长结果
Tab.1 The growth of wheat coleoptile in different IAA concentration

IAA 浓度(mg/L)	实验前芽鞘平均长度(mm)	20h 后芽鞘的平均长度(mm)	芽鞘的增长度(mm)	与空白对照增长(%)
0(空白)	4.08	6.53	2.45	100
8.67×10^{-4}	3.95	6.45	2.50	102
2.63×10^{-3}	4.18	7.03	2.85	116
8.67×10^{-3}	4.02	7.27	3.25	133
2.63×10^{-2}	3.90	7.42	3.52	144
8.67×10^{-2}	4.14	7.95	3.81	156
0.263	4.25	8.02	3.77	154
0.867	3.98	7.98	4.00	163
2.630	4.10	8.70	4.60	188

图 2 中的海藻样品 1—4 为褐藻,5—10 为红藻,11—12 为绿藻。由图 2 可以看出,褐藻中生长素含量低于红藻和绿藻,其分布范围在 5—20ng/g (海带的特殊结果例外)之间。红藻中的 IAA 含量

最高,一般在 5—120ng/g 之间,其中多管藻的含量最高,用小麦胚芽鞘切段生物试法可以达到 110.2ng/g FW。绿藻的含量一般介于褐藻和红藻之间。这种分布特点可能主要是由于种类之间的

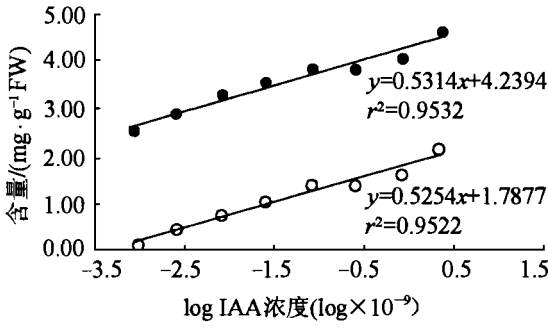


图1 小麦胚芽鞘切段试法的标准曲线

Fig. 1 The standard curve of wheat coleoptile biological detect

●为绝对伸长长度; ○为相对伸长长度

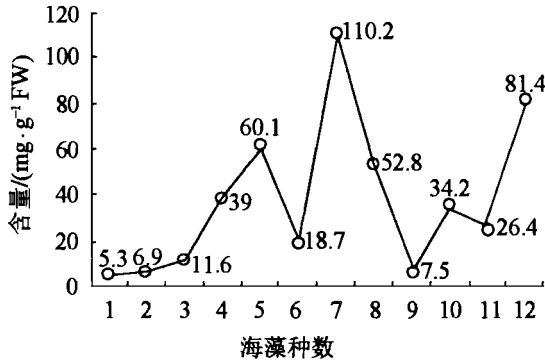


图2 小麦胚芽鞘切段试法获得样品中生长素的含量

Fig. 2 The IAA concentration of seaweeds with wheat coleoptile biological detect

1. 鼠尾藻; 2. 海黍子; 3. 裙带菜; 4. 海带; 5. 条斑紫菜; 6. 鸭毛菜; 7. 多管藻; 8. 蜈蚣藻; 9. 海头红; 10. 角叉菜; 11. 扁浒苔; 12. 孔石莼
1. *Sargassum thunbergii*; 2. *Sargassum kjellmanianum*; 3. *Undaria pinnatifida*; 4. *Laminaria japonica*; 5. *Porphyra yezoensis*; 6. *Symphycloalia latiuscula*; 7. *Polysiphonia urceolata*; 8. *Grateloupia filicina*; 9. *Plocamium telfairiae*; 10. *Chondrus senensis*; 11. *Enteromorpha compressa*; 12. *Uva pertusa*

差异、生长环境、生长期以及藻体实验部位的不同所决定的。

2.2 荧光分析法及其含量

荧光分析法的测定原理是基于样品中的 IAA 在浓酸催化剂的作用下, 与乙酸酐形成荧光物质, 用 850 型荧光分光光度计在操作波长下测定 IAA

含量。它的检测对象为 3' 位上有乙酸基的吲哚类化合物, 检测结果列于图 3。

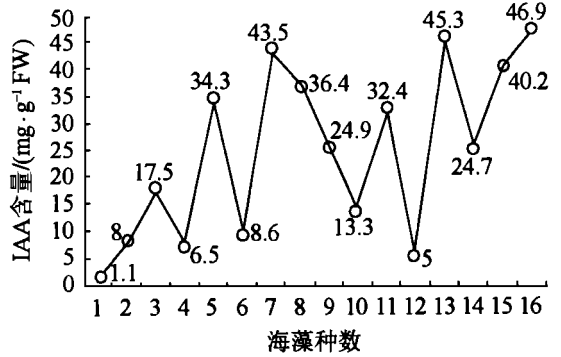


图3 荧光分析法测定的含量分布

Fig. 3 IAA concentration of seaweeds with indole- α pyrone fluorescence method

1. 鼠尾藻; 2. 海黍子; 3. 裙带菜; 4. 海带; 5. 条斑紫菜; 6. 鸭毛菜; 7. 多管藻; 8. 蜈蚣藻; 9. 亮管藻; 10. 小珊瑚藻; 11. 海头红; 12. 角叉菜; 13. 缘管浒苔; 14. 扁浒苔; 15. 孔石莼; 16. 绳藻
1. *Sargassum thunbergii*; 2. *Sargassum kjellmanianum*; 3. *Undaria pinnatifida*; 4. *Laminaria japonica*; 5. *Porphyra yezoensis*; 6. *Symphycloalia latiuscula*; 7. *Polysiphonia urceolata*; 8. *Grateloupia filicina*; 9. *Hyalosiphonia caespitosa*; 10. *Corallina pilulifera*; 11. *Plocamium telfairiae*; 12. *Chondrus senensis*; 13. *Enteromorpha linza*; 14. *Enteromorpha compressa*; 15. *Uva pertusa*; 16. *Chorda filum*

荧光分光光度法测定的海藻中 IAA 含量分布趋势与小麦胚芽鞘切段生物试法测定的趋势基本吻合。两种分析方法获得的海头红和角叉菜的含量差异很大, 由于分析的方法、检测的时间、海藻收集的时间是不相同的, 很难根据这个实验结果做出合理的解释。另外海带来源于市售商品, 虽然有大致的收集时间和地点, 但是很难掌握实验前的保存方法和时间。根据总的实验结果, 海藻中的 IAA 分布有几个主要的分布特点: (1) 16 种海藻中均测定到有 IAA 存在, 其含量分布范围在 1—110ng/g FW 之间。(2) 荧光分析方法测得的含量范围在 1.1—46.9ng/g FW 之间, 小麦胚芽鞘切段生物试法测定的含量范围在 5.3—110.2ng/g FW 之间, 小麦胚芽鞘切段生物试法测定的结果明显高于荧光分光光度分析方法测得的结果。(3) 两种不同检测方法测定海藻中生长素的含量趋势变化大致相同, 但具体含量的数值变化差异

较大。(4) 海藻种类之间的分布特点总是褐藻中的 IAA 含量较红藻和绿藻的含量低。导致海藻种类这种分布特点的原因是:(1) 海藻是生长在海洋中的低等海洋植物, 它的生长和组成特点受到生长介质、温度、季节、海区等众多环境因素的影响。实验中 1999 年春季采集的样品用于小麦胚芽鞘切段生物试法的分析, 而 2000 年春季的样品用于荧光分析方法的分析。虽然采集的样品尽量保持它们的对比可信度, 如相同的海藻种类、相同的海区、相同的采集季节等, 但仍然存在环境和温度等差异。(2) 分析方法本身存在差异。通常荧光分光光度法检测原理是利用 IAA 与荧光剂生成的荧光物质, 根据反应物的荧光强度定量反应物的含量变化。此方法经校正因子修正后可信度较好。小麦胚芽鞘切段生物试法是根据 IAA 在胚芽鞘生长中表现出的促生长的生理变化对样品进行定量。此方法标准曲线中胚芽鞘切段的毫米伸长对应着 IAA 的对数浓度的变化, 因此切段微小的伸长差异意味着 IAA 浓度的较大变化, 如切段 0.1mm 的差异对应 IAA 含量差约 1.5 倍, 所以此方法对含量之间的较小差异不能准确的测定出来。另外此方法实验周期比较长, 实验结果容易受到实验材料不均一性的制约和环境的干扰。

海藻生长素目前应用最广泛的是作为植物生长调节剂促进农作物的生长(García-Jimenez *et al.*, 1998), 对植物最明显的作用是促进细胞的伸长。

IAA 遇到热酸时会失去活性, 因此在用海藻制备植物生长剂时要特别注意 IAA 的失活。

参 考 文 献

- Ashen J B, Cohen J D, Goff L J, 1999. DG-SIM-MS determination and quantification of free indole-3-acetic acid in bacterial galls on the marine alga *Prionitis lanceolata* (Phodophyta). *J Phycol*, 35: 493—500
- García-Jimenez P, Rodrigo M, Robaina R R, 1998. Influence of plant growth regulators, polyamines and glycerol interaction on growth and morphogenesis of carposporelings of *Gracilariopsis* cultured in vitro. *J App Phycol*, 10: 95—100
- Leopold A C, 1955. *Auxin and Plant Growth*. California: University of California press, 13—20
- Maruyama A, Macda M, Simidu U, 1989. Microbial production of auxin indole-3-acetic acid in marine sediments. *Mar Ecol Prog Ser*, 58: 69—75
- Nitsch J P, Nitsch C, 1955. Studies on the growth of coleoptile and first internode section. *Plant Physiol*, 31: 94—111
- Stirk W A, Staden J V, 1997. Comparison of cytokinin- and auxin-like activity in some commercially used seaweed extracts. *J App Phycol*, 8: 503—508
- Van Overbeek J, 1940a. Auxin in marine algae. *Plant Physiol*, 15: 291—299
- Van Overbeek J, 1940b. Auxin in marine algae. *Botan Gaz*, 101: 940—974
- William P J, Falkenstein K, Hamilton R H, 1985. Nature and Amount of Auxin in algae. *Plant Physiol*, 78: 844—848

ISOLATION AND ESTIMATION OF AUXIN FROM MARINE ALGAE

HAN Li-Jun, FAN Xiao, YUAN Zhao-Hui

(*Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071*)

Abstract Auxin are important phytohormones. Many researches have showed that they are involved intensively in plant growth, development, and many other activities and functions. However, the study on auxin in marine algae in China was unfortunately rare. The main reason for not being able to study was the tiny amount of auxin in marine algae.

The present research shows that auxin exists in more than one forms in plant tissues, but the most important compound might be indole-3-acetic acid (IAA). IAA activity in seaweed extract was also found by Standerson in 1987 and confirmed that IAA in seaweed extract could increase crop yield, improve plant growth, and tolerate frost, fungal and insect attack.

Research in this paper included methods of IAA measurement, existence of IAA and its concentration in Chinese marine algae. The seaweed extract with IAA is promising to be used in agriculture as plant promoter.

According to Leopold (1955), a series of process including pigment reduction with petroleum benzene were used to extract and isolate auxin from marine algae. Wheat coleoptile by biological detection and indole- α -pyrone fluorescence methods were carried out to estimate the content and distribution of auxin in 16 Chinese seaweeds. The differences between the two methods were also discussed. The results shows that auxin are widely distributed in marine algae. In this experiment, auxin were detected in every alga sample, and the concentrations varied with species. The results measured by wheat coleoptile by biological detection and indole- α -pyrone fluorescence methods showed the same distribution pattern. Results also shows that indole- α -pyrone fluorescence method is better than the method of biological detection. The concentration of auxin in phaeophyta is lower than those in Phodophyta and Chlorophyta.

Key words Marine algae, Indole- α -pyrone, Fluorescence method, Wheat coleoptile by biological detect method, Content distribution