

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*

蔡西栗 邵旻玮 孙 雪 徐年军

(宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211;
宁波大学海洋学院海洋生物工程重点实验室 宁波 315211)

提要 以海洋红藻龙须菜为材料,建立了 5 种内源性植物激素吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、肉桂酸(RA)的 GC-MS 微量检测方法,并运用该方法初步研究了龙须菜中 5 种植物激素对不同浓度氮胁迫的响应规律。结果表明,最优的实验条件为:样品用正丙醇:水:HCl (2:1:0.002)提取,HLB 固相萃取柱纯化,三甲基硅烷基重氮甲烷衍生化,GC-MS 分析测定。5 种植物激素的线性方程的相关系数 r^2 为 0.9943—0.9998,加标回收率为 76.7%—104.3%,相对标准偏差为 1.4%—2.9%,方法检出限为 0.010—0.025 $\mu\text{g/ml}$ 。该方法简便、灵敏、准确、重现性好。与 Provasoli 正常培养基相比,低氮和高氮胁迫条件下龙须菜 IAA 含量均降低;而 ABA、JA 和 RA 含量均在胁迫前期含量迅速升高,后期逐渐下降;SA 含量在低 N 胁迫前期上升较快,后期逐渐下降;在高 N 胁迫下 SA 含量无显著变化。

关键词 龙须菜,植物激素,GC-MS,氮胁迫
中图分类号 Q946

龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)是红藻门江蓠属大型海藻,主要用于生产琼胶和作为鲍鱼的饵料。目前,龙须菜在我国已经成为继海带(*Laminaria*)、紫菜(*Porphyra*)、裙带菜(*Undaria*)之后的第 4 大栽培海藻(张学成等,2009)。龙须菜具有生长快、含胶量高、适温范围广、耐密植、适应环境能力强等优点,并能有效改善海洋生态环境,具有一定的经济效益(Yang *et al.*, 2006)。随着海藻胶工业的发展,对琼胶生产原料藻的需求也日益增加。目前龙须菜已在我国南方的广东、福建、浙江和北方的山东、辽宁等沿海地区大面积养殖,带动了一个新兴的大型海藻产业链。

植物激素是植物体内合成的、对植物生长发育具有显著作用的微量物质(韩春梅等,2009)。植物受到逆境胁迫时,植物体内的激素发生变化,从而通过影响植物的生理生化活动来产生抵御胁迫的能力

(Morillon *et al.*, 2001; Zeid, 2004)。植物激素不仅在高等植物中存在,在低等的海洋藻类中也具有多种生理作用,如藻体的生长和组织器官分化的调节,藻类逆境胁迫响应等过程中起着重要的作用(Tarakhovskaya *et al.*, 2007; Yokoya *et al.*, 2010)。目前海藻中植物激素检测方法主要有生物检测法、酶联免疫法、纸层析、薄层层析、气相色谱、高效液相色谱、气相色谱-质谱联用(GC-MS)和高效液相色谱-质谱联用(LC-MS)等(黄冰心等,2001)。樊扬等(2000)用免疫学的方法研究了龙须菜匍匐枝愈伤组织诱变过程中植物激素的变化规律。Stirk 等(2009)运用了 LC-MS 技术研究了裂片石莼(*Ulva fasciata*)和网地藻(*Dictyota humifusa*)中植物激素的季节性变化规律。Li 等(2007)运用大口径毛细色谱柱气相色谱分析和鉴定了海带(*L. japonica*)中的吲哚乙酸含量。本文首次建立了一次性检测

* 国家自然科学基金项目资助,31072229 号、40876073 号;浙江省钱江人才项目资助,2007R10038 号。蔡西栗, E-mail: 86hunter1117@163.com

通讯作者: 徐年军, 博士, 研究员, E-mail: xunianjun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2010-10-23, 收修改稿日期: 2010-12-26

龙须菜中吲哚乙酸(IAA)、脱落酸(ABA)、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)、肉桂酸(RA)等 5 种植物激素的微量 GC-MS 检测方法,并运用该方法研究了龙须菜内源植物激素对不同浓度 N 胁迫的响应规律。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验用龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)于 2009 年 4 月采于福建宁德养殖场(26°36'N, 119°42'E),在本实验室进行保种培养。实验前于 25℃ 预培养 1 周,每 2 天更换一次培养基。实验采用 Provasoli 培养基(Provasoli, 1968), 25℃, 光照强度 60 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$, 光周期 L : D (12h : 12h), 海水盐度 25。

1.2 主要仪器和试剂

气相色谱-质谱联用仪(岛津 QP2010); 分析天平(上海精密科学仪器有限公司); 固相萃取装置(美国 Supelco 公司)。IAA、JA、SA、RA 标准品、三甲基硅烷化重氮甲烷均购自 Sigma 公司; ABA、二氢茉莉酸(dhJA)购自东京化成工业株式会社(TCI); 甲醇、正己烷为色谱纯; 其余试剂均为分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 植物激素的提取与纯化 称取 1.0g 新鲜龙须菜样品,液氮充分研磨后,加入 4℃ 含 100mg/L BHT 的正丙醇 : 水 : HCl (2 : 1 : 0.002) 4ml 和二氢茉莉酸内标 100ng, 4 避光过夜。4000r/min 离心 15min, 取上清液, 残渣用 2ml 正丙醇 : 水 : HCl 再提取一次, 合并全部提取液, 加入 4℃ 含 100mg/L BHT 的二氯甲烷 4ml, 离心后取下层正丙醇/二氯甲烷相于 30℃ 旋转蒸发至 1ml。用 Oasis HLB 固相萃取柱纯化提取物, 步骤如下: 依次用 5ml 100% 甲醇和 5ml 去离子水淋洗 HLB 柱, 弃淋洗液后, 将上述样品提取液过柱, 用 5ml 5% 甲醇-水清洗, 弃去流出液后抽干, 最后用 3ml 100% 甲醇洗脱, 收集全部洗脱液。旋转蒸发浓缩至 1ml, 加入 20 μl 三甲基硅烷化重氮甲烷正己烷溶液(2mg/L), 盖紧混匀后在 30℃ 水浴中反应 1h, 用平缓氮气吹干, 色谱正己烷定容至 1ml, GC-MS 分析。

1.3.2 气相色谱-质谱条件 色谱条件: SPB1 聚二甲基硅氧烷非极性柱(30m \times 0.32mm \times 0.25 μm)分离。初始温度 40℃, 保持 3min, 以 20℃/min 升到 200℃, 保持 10min, 然后以 30℃/min 升到 280 , 保持 10min。进样口温度 250℃。以氦气作为载气, 纯度 99.999%, 流速为 1ml/min。分流进样, 分流比为 10 : 1。自动进

样, 进样量为 1 μl 。质谱条件: 电子轰击(EI)源, 电子能量 70eV, 离子源温度 200℃, 选择性离子检测模式(SIM)。

1.3.3 植物激素含量分析 以不同浓度的植物激素的峰面积与二氢茉莉酸峰内标面积之比 y ($A_{\text{激素}}/A_{\text{内标}}$) 对植物激素与二氢茉莉酸浓度之比 x ($C_{\text{激素}}/C_{\text{内标}}$) 作线性回归方程, 得出标准曲线的斜率, 用于植物激素的定量分析。计算公式为: 植物激素含量(ng/g) = ($A_{\text{激素}}/A_{\text{内标}}/a \times M$)/ W 。其中, A 为峰面积, a 为由标准回归方程的斜率, M 为内标加入量, W 为样品质量。

1.3.4 不同氮浓度的影响 Provasoli 培养基中 N 浓度为 115.4 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 其中海水中 N 浓度为 19.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 所加培养基中 N 浓度为 95.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。本实验设置不同 N 浓度为 0N、1N、2N、3N、4N, 对应 N 浓度分别为 19.7、115.4、211.1、306.5、402.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 五个浓度, 分别对龙须菜进行培养, 其它实验条件同实验材料部分, 每组 3 个平行, 培养 3d。分别于 0h、1h、3h、6h、10h、24h、48h、72h 取样, 所取的新鲜样品快速用去离子水冲洗, 再用滤纸吸去表面的水分, 液氮快速冷冻后于 -80℃ 冰箱中保存备用。

2 结果与分析

2.1 色谱柱、提取溶剂、衍生化试剂的选择

首先比较了 SPB-1、SPB-5、SPB-50 三种色谱柱对 5 种植物激素衍生化产物的分离效果。发现衍生化产物在弱极性柱 SPB-5 和中等极性柱 SPB-50 上的响应值不高, 峰形拖尾, 而在非极性柱 SPB-1 上检测峰形好, 出峰速度快, 灵敏度高。

比较了甲醇、丙酮、丙醇和正丙醇对 5 种植物激素的提取效果, 结果发现甲醇和丙酮极性较强, 对植物激素的提取效果较好, 但也提取出了龙须菜中大量的脂类和色素杂质, 给下一步净化带来困难。丙醇虽然提取的色素和脂类较少, 但植物激素的提取效率不高。正丙醇既能有效的提取植物激素又能减少脂类和色素的溶出, 经过优化后采用正丙醇 : 水 : HCl (2 : 1 : 0.002) 对龙须菜内源植物激素进行提取。

比较了三氟化硼衍生法、硅烷化衍生法和重氮甲烷甲基化法的衍生效果, 发现三氟化硼衍生法和硅烷化衍生法的衍生速度慢, 反应不完全。三甲基硅烷基重氮甲烷衍生化速度快、反应完全、干扰物质少。但重氮甲烷有一定的毒性和较强的挥发性, 而商品化的三甲基硅烷基重氮甲烷正己烷溶液(2.0mol/L)毒

性较小, 适合进行植物激素的衍生化。

2.2 保留时间的测定与离子峰的选择

分别制备 10 $\mu\text{g/ml}$ 植物激素标准品和二氢茉莉酸内标进行 GC-MS 分析, 记录单个植物激素色谱峰的保留时间和特征离子峰碎片的大小(表 1)。若检测样品的总离子流色谱图(TIC)中某个离子峰的出峰时间与标准样品出峰时间一致, 并且质谱图中所选择的

表 1 五种植物激素和内标的保留时间、选择离子峰
Tab.1 The retention time and selective ion peaks of five kinds of phytohormones and IS

| 植物激素名称 | 保留时间(min) | 选择离子峰(m/z) |
|--------|-----------|-------------|
| 水杨酸 | 8.943 | 92 120 152 |
| 肉桂酸 | 10.400 | 103 131 162 |
| 茉莉酸 | 12.332 | 83 151 224 |
| 二氢茉莉酸 | 12.389 | 83 153 226 |
| 吲哚乙酸 | 13.780 | 130 189 190 |
| 脱落酸 | 18.514 | 134 162 192 |

表 2 五种植物激素的回归方程和检测限

Tab.2 The regression equation and limit of detection of five kinds of phytohormones

| 植物激素 | 线性方程 | 相关系数 r^2 | 线性范围($\mu\text{g/ml}$) | 最低检测限($\mu\text{g/ml}$) |
|------|------------------------|------------|--------------------------|---------------------------|
| 水杨酸 | $y = 0.012x + 0.0018$ | 0.9987 | 0.1—50 | 0.020 |
| 肉桂酸 | $y = 0.166x + 0.0138$ | 0.9981 | 0.1—50 | 0.015 |
| 茉莉酸 | $y = 0.259x + 0.0153$ | 0.9998 | 0.1—10 | 0.025 |
| 吲哚乙酸 | $y = 1.504x + 0.2510$ | 0.9968 | 0.1—10 | 0.015 |
| 脱落酸 | $y = 0.0422x + 0.0131$ | 0.9943 | 0.1—10 | 0.010 |

表 3 五种植物激素的回收率和精密度($n=6$)

Tab.3 The recovery and accuracy of five kinds of phytohormones ($n=6$)

| 植物激素 | 已知值(ng) | 加入值(ng) | 回收率(%) | RSD(%) |
|------|---------|---------|------------|--------|
| 水杨酸 | 39.26 | 100 | 76.7—80.1 | 1.7 |
| | | 150 | 87.0—90.6 | 2.2 |
| | | 250 | 85.9—95.0 | 2.8 |
| 肉桂酸 | 45.63 | 100 | 82.4—89.7 | 1.4 |
| | | 150 | 80.6—92.1 | 2.6 |
| | | 250 | 85.3—101.2 | 3.1 |
| 茉莉酸 | 38.70 | 100 | 77.3—88.5 | 2.5 |
| | | 150 | 78.4—87.9 | 2.3 |
| | | 250 | 95.3—100.7 | 1.6 |
| 吲哚乙酸 | 145.49 | 100 | 89.7—93.6 | 1.7 |
| | | 150 | 92.7—100.2 | 2.1 |
| | | 250 | 92.5—103.7 | 2.3 |
| 脱落酸 | 24.33 | 100 | 84.2—97.4 | 2.1 |
| | | 150 | 91.7—104.3 | 2.5 |
| | | 250 | 93.3—101.3 | 2.2 |

离子峰均出现, 则判断样品中存在该种植物激素。反之, 未检测到相应植物激素。

2.3 线性关系

配制 5 种激素的混合标准溶液 1.0 mg/ml , 并依次稀释成 50.0、25.0、10.0、5.0、1.0、0.5、0.1 $\mu\text{g/ml}$ 八个浓度, 分别加入 1 μg 二氢茉莉酸内标, 得系列标准工作液, 将标准溶液加入脱激素处理的样品中, 按照优化的检测方法进行分析, 平行测定 6 次。结果如表 2 所示, 5 种植物激素的线性回归方程的相关系数均较高。最低检测限的范围在 0.01—0.025 $\mu\text{g/ml}$ 之间。

2.4 回收率和精密度测定

准确度验证采用添加回收法进行试验。将已知量的混合标准溶液分别加入 1.0g 龙须菜新鲜样品中, 进行回收率和精密度试验, 每个水平的试样重复 6 次, 结果见表 3。结果表明本方法的回收率范围为 76.7%—104.3%, 相对标准偏差为 1.4%—2.9%。

2.5 不同氮浓度胁迫下龙须菜内源植物激素的测定

从图 1A 可见, 龙须菜中 IAA 在不同 N 浓度培养时均表现了先升后降的趋势。N 浓度为 211.1 $\mu\text{mol/L}$ 时龙须菜 IAA 含量最高, 10h 时比正常 Provasoli 培养基(对照组)高 32.88%。低 N 浓度组(19.7 $\mu\text{mol/L}$)和高 N 浓度组(306.5 和 402.2 $\mu\text{mol/L}$)龙须菜的 IAA 含量均显著低于对照组。这一结果与龙须菜生长趋势相符, 表明 Provasoli 培养基中 N 含量偏低, 适当增加其 1 倍的 N 浓度最适于龙须菜的生长。

从图 1B 可见, 对照组龙须菜 ABA 含量相对较稳定。211.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组龙须菜 ABA 在培养前期较稳定, 后期有一定程度的升高, 24h 时达到最高, 比对照组高出 74.21%, 到 72h 时回落到正常水平。低 N 浓度组(19.7 $\mu\text{mol/L}$)和高 N 浓度组(306.5 和 402.2 $\mu\text{mol/L}$) ABA 含量在培养前期迅速升高, 分别在 6h 和 10h 达到最高, 比对照组分别高出 296.16%、119.23%、185.56% ($P<0.05$), 后期又迅速下降, 最终 72h 和对

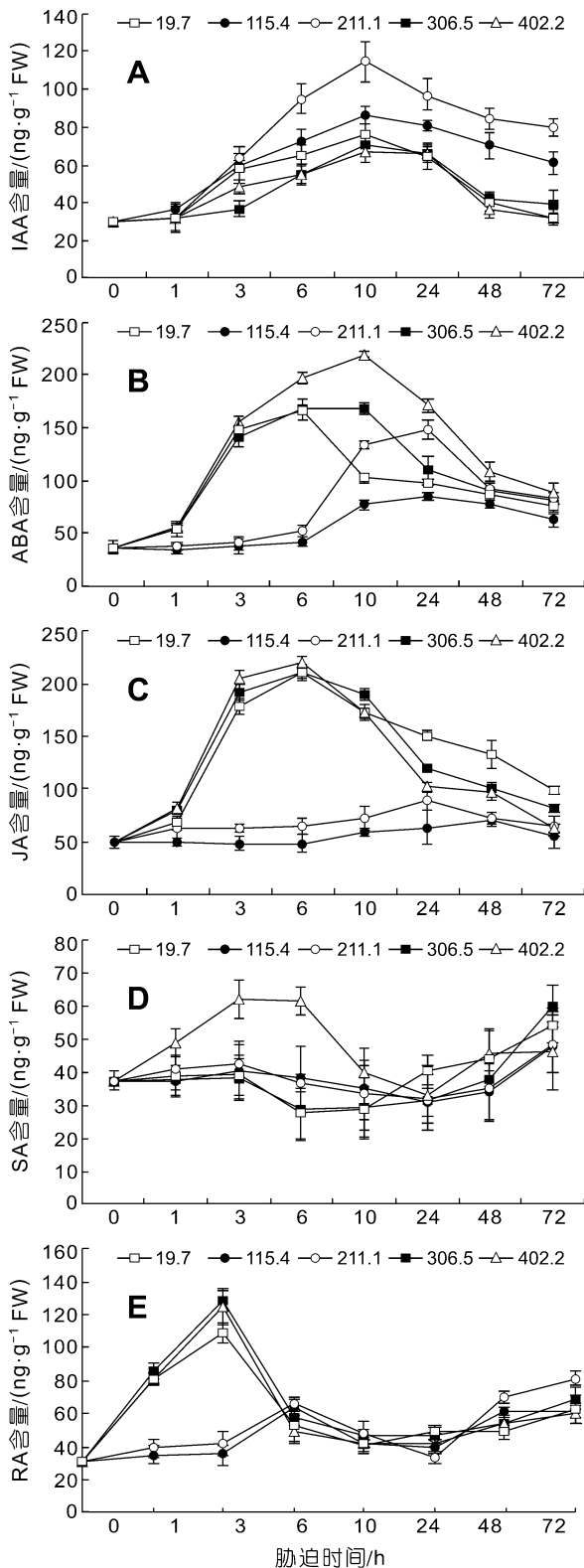


图1 不同N浓度对龙须菜体内5种植物激素含量的影响
Fig.1 Effects of different nitrogen concentrations on the content of five kinds of phytohormones of *G. lemaneiformis* (mean \pm SD)
A. 吲哚乙酸, B. 脱落酸, C. 茉莉酸, D. 水杨酸,
E. 肉桂酸

对照组接近。

图1C是5种N浓度对龙须菜JA含量的影响。211.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组龙须菜JA含量较稳定,与对照组趋势一致而略高。低N浓度组(19.7 $\mu\text{mol/L}$)和2种高N浓度组(306.5和402.2 $\mu\text{mol/L}$)龙须菜JA含量变化趋势一致,培养前期迅速升高,6h达到最高,分别比对照组高出332.63%、334.88%、355.15%,6h后缓慢回落,最终72h时与对照组差异不显著。

从图1D可见,211.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组龙须菜SA含量变化与对照组一致,总体较稳定,后期有一定程度的升高。低N浓度组(19.7 $\mu\text{mol/L}$)和高N浓度组(306.5 $\mu\text{mol/L}$)龙须菜SA含量略低于对照组。402.2 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组龙须菜SA含量在胁迫前期迅速增加,3—6h达到最高,比对照组高62%左右,6h后迅速回落并趋于稳定。

从图1E可见,211.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组龙须菜RA含量变化与对照组一致,总体较稳定。低N浓度组(19.7 $\mu\text{mol/L}$)和高N浓度组(306.5和402.2 $\mu\text{mol/L}$)龙须菜RA含量变化规律一致,从1h开始上升,3h达到最大值,分别比对照组高出203.46%、259.23%、248.02%,3h后迅速下降,最终与对照组比较差异不显著。

3 讨论

植物激素在海藻的生长生理和抗逆过程中具有重要的作用。如生长素能刺激羽藻(*Bryopsis plumosa*)假根的形成(Arendarchuk, 1974),还能调控大型红藻和褐藻中顶端叶状体进行分枝(Yokoya *et al*, 1996),吲哚乙酸(IAA)能减少藻体分枝的数量,而加入抑制生长素转化的物质后就能抵消这种作用(Moss, 1974)。在昆布属海藻的孢子中,脱落酸(ABA)的含量随季节的变化而变化,而这一变化又与藻体组织的复制相关(Nimura *et al*, 2002)。茉莉酸(JA)是墨角藻(*Fucus vesiculosus*)藻体受到病原体伤害后的主要防御物质(Arnold *et al*, 2001)。浓度为 10^{-4}mol/L 的SA可以提高小球藻(*Chlorella*)的生长速率和蛋白质含量(Czepak *et al*, 2002)。

GC-MS是植物激素微量分析的一种强有力的手段,具有高灵敏度、高分辨率、快速、高效、进样量少等优点。在高等模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中,Muller等(2002)运用GC-MS/MS技术同时检测了其中的IAA、ABA、JA和SA四种植物激

素。Schmelz 等(2003)建立了一套运用 GC-MS 技术同时检测 SA、IAA、ABA、JA 四种植物激素、植物杀菌剂和挥发性代谢产物的方法。但藻类中对多种植物激素的一次性检测方面的研究未见报道。本实验采用固相萃取技术和 GC-MS 相结合的技术建立了龙须菜藻体内吲哚乙酸、脱落酸、茉莉酸、水杨酸、肉桂酸 5 种植物激素的提取和微量检测技术, 获得了满意的分离效果, 5 种植物激素的加标回收率为 76.7%—104.3%, 方法的检出限在 0.010—0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之间, 可以用于浒苔等大型藻类微量样品的植物激素检测。

氮、磷等营养元素对藻类生长具有重要的影响(陈建中等, 2010)。龙须菜能够耐受一定范围的氮浓度的变化, 适当浓度的氮有助于龙须菜的生长, 过高和过低的氮都不利于龙须菜的生长和色素的积累(徐永健等, 2006)。本研究发现不同浓度 N 处理对龙须菜藻体植物激素含量具有较大的影响。当 N 浓度适量时(115.4 和 211.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$), 龙须菜藻体生长状况良好, IAA 含量处于较高水平, ABA、JA、SA 和 RA 含量相对较稳定, 虽然有一定的波动, 但总体趋势较稳定, 说明龙须菜生长状况良好。

低 N 胁迫(19.7 $\mu\text{mol}/\text{L}$)下龙须菜藻体生长状况生长缓慢, 藻体颜色较浅; IAA 在培养前期(3h)有所上升, 后期明显下降, 说明培养基中 N 缺乏限制了龙须菜的正常生长; ABA、JA 和 RA 在培养前期迅速升高, 到后期又迅速下降, SA 含量与对照组相比偏低。说明龙须菜收到了环境胁迫, 体内植物激素产生了应激性反应, 随着培养时间的延长, 这种应激性逐渐减低。

高 N 胁迫(306.5 和 402.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)下龙须菜藻体 IAA 含量显著低于对照组, ABA、JA 和 RA 含量均高于对照组, 表明其生长受到抑制, 藻体受到伤害, 藻体通过合成大量的植物激素来对抗高 N 逆境胁迫。从藻体形态看, 龙须菜在极高 N 胁迫下(402.2 $\mu\text{mol}/\text{L}$)生长状态非常差, 藻体外观发生显著的改变, 颜色变浅, 部分藻体顶端分枝开始发白和变软, 这一现象与 Yu 等(2008)的研究结果基本一致。而适当高的 N 源, 如 211.1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时, 龙须菜生长最好, 306.5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 时龙须菜生长即受到一定的抑制。

参 考 文 献

- 张学成, 费修纛, 王广策等, 2009. 江蓠属海藻龙须菜的基础研究与大规模栽培. 中国海洋大学学报(自然科学版), 39(5): 947—954
- 陈建中, 刘志礼, 李晓明等, 2010. 温度、pH 和氮、磷含量对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)生长的影响. 海洋与湖沼, 41(5): 714—718
- 徐永健, 钱鲁闽, 王永胜, 2006. 氮素营养对龙须菜生长及色素组成的影响. 台湾海峡, 25(2): 222—227
- 黄冰心, 韩丽君, 范晓, 2001. 海藻中的植物激素检测方法. 海洋科学, 25(10): 28—30
- 韩春梅, 刘建国, 张勇, 2009. 不同激素配伍对雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)细胞生长和虾青素累积的调节作用、藻株差异及应用. 海洋与湖沼, 40(4): 430—436
- 樊扬, 李幼芷, 2000. 龙须菜匍匐体类愈伤组织诱导及机制分析. 海洋与湖沼, 31(1): 29—34
- Arendarchuk V V, 1974. The effect of IAA on some blue-green algae. Plant Physiology, 64—69
- Arnold T M, Targett N M, Tanner C E *et al*, 2001. Evidence for methyl jasmonate-induced phlorotannin production in *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae). Journal of Phycology, 37(6): 1026—1029
- Czerpak R, Bajguz A, Gromek M *et al*, 2002. Activity of salicylic acid on the growth and biochemism of *Chlorella vulgaris* Beijerinck. Acta Physiologiae Plantarum, 24(1): 45—52
- Li T S, Wang C H, Miao J K, 2007. Identification and quantification of indole-3-acetic acid in the kelp *Laminaria japonica* Areschoug and its effect on the growth of marine microalgae. Journal of Applied Phycology, 19(5): 479—484
- Morillon R, Chrispeels M J, 2001. The role of ABA and the transpiration stream in the regulation of the osmotic water permeability of leaf cells. Proc Natl Acad Sci USA, 98(24): 38—43
- Moss B L, 1974. Morphogenesis. In: Stewart W D P ed. Algal Physiology and Biochemistry. Oxford Press, 788—813
- Muller A, DÜchting P, Weiler E W, 2002. 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*. Planta, 216(1): 44—56
- Nimura K, Mizuta H, 2002. Inducible effects of abscisic acid on sporophyte discs from *Laminaria japonica* Areschoug (Laminariales, Phaeophyceae). Journal of Phycology, 14(3): 159—163
- Provasoli L, 1968. Media and prospects for the cultivation of marine algae. Plant Physiology, 63—75
- Schmelz E A, Engelberth J, Alborn H T *et al*, 2003. Simultaneous analysis of phytohormones, phytotoxins, and volatile organic compounds in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 100(18): 10552—10557
- Stirk W A, Novák O, Hradecká V *et al*, 2009. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in *Ulva fasciata* (Chlorophyta) and *Dictyota humifusa* (Phaeophyta): towards understanding their biosynthesis and homeostasis. European Journal of Phycology, 44(2): 231—240
- Tarakhovskaya E R, Maslov Yu I, Shishova M F, 2007. Phytohormones in algae. Russian Journal of Plant Physiology,

- 54(2): 163—170
- Yang Y F, Fei X G, Song J M *et al*, 2006. Growth of *Gracilaria lemaneiformis* under different cultivation conditions and its effects on nutrient removal in Chinese coastal waters. *Aquaculture*, 254(2): 248—255
- Yokoya N S, Handro W, 1996. Effects of auxins and cytokinins on tissue culture of *Grateloupia dichotoma* (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 326/327(1): 393—400
- Yokoya N S, Stirk W A, Staden J V *et al*, 2010. Endogenous cytokinins, auxins and abscisic acid in red algae from Brazil. *Journal of Phycology*, 46(6): 1198—1205
- Yu J, Yang Y F, 2008. Physiological and biochemical response of seaweed *Gracilaria lemaneiformis* to concentration changes of N and P. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367(2): 142—148
- Zeid I M, 2004. Response of bean (*Phaseolus vulgaris*) to exogenous putrescine treatment under salinity stress. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7(2): 219—225

DETECTION OF MULTIPLE PHYTOHORMONES BY GC-MS TECHNIQUE IN *GRACILARIA LEMANEIFORMIS* AND THE RESPONSE TO NITROGEN STRESSES

CAI Xi-Li, SHAO Min-Wei, SUN Xue, XU Nian-Jun

(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Minister of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211; Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Oceanology, Ningbo University, Ningbo, 315211)

Abstract A highly sensitive method was developed for simultaneous determination of trace levels of endogenous phytohormones indole-3-acetic acid, abscisic acid, jasmonic acid, salicylic acid and cinnamic acid in marine red algae *Gracilaria lemaneiformis* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) technology, and the response of five kinds of phytohormones of *G. lemaneiformis* under different nitrogen stresses was studied. The optimized method was as followings: samples were extracted by 1-propanol/H₂O/HCl (2 : 1 : 0.002, V/V), and the extracts were purified by SPE with HLB column, then derived by trimethylsilyldiazomethane, finally detected by GC-MS with SIM model. By using this method, the correlation coefficient of five kinds of phytohormones ranged from 0.9943 to 0.9998, and the average recoveries varied from 76.7% to 104.3% with RSDs of 1.4%—2.9%, and LOD of 0.010—0.025 μg/ml. This method was showed to be a simple, sensitive, accurate, and reproducible method. When the *G. lemaneiformis* was stressed by low and high nitrogen concentration, the content of IAA was lower than the normal Provasoli medium group. But under low and high nitrogen stresses, the content of ABA, JA and RA increased sharply in the primary phase, then decreased gradually in the later phase. The content of SA under low nitrogen stress increased faster than the control group in the primary phase, but gradually declined in the later phase; the content of SA under high nitrogen stress showed no significant change than the control group.

Key words *Gracilaria lemaneiformis*, Phytohormones, GC-MS, Nitrogen stress