

荣福海带中内源植物激素含量的动态变化研究

王泽文^{1,2} 孙伟红¹ 刘 涛³ 翟毓秀¹ 邢丽红¹ 苗钧魁¹ 冷凯良^{1*}

(¹中国水产科学研究院黄海水产研究所, 青岛 266071)

(²中水集团远洋股份有限公司, 北京 100032)

(³中国海洋大学, 青岛 266100)

摘 要 以荣福海带为材料, 采用高效液相色谱法紫外检测不同时期和不同部位海带中内源植物激素含量的变化。结果表明, 在海带生长的幼嫩期、厚成期和成熟期, 吲哚乙酸 (IAA) 和脱落酸 (ABA) 呈递增的趋势; 玉米素 (ZT) 在海带成熟期达到最大值, 厚成期含量最少; 吲哚丁酸 (IBA) 在厚成期达到最大值, 幼嫩期含量最少。同一生长阶段的海带体内植物激素纵向分布规律为: 海带尖部的 IAA 含量较高, 中带部的 ZT 含量明显较高, 而基部的 IBA 和 ABA 的含量较高。

关键词 高效液相色谱 荣福海带 内源植物激素

中图分类号 S968.42+1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0094-05

Variations of endogenous hormones in Rongfu *Laminaria saccharia* at different development stage

WANG Ze-wen^{1,2} SUN Wei-hong¹ LIU Tao³ ZHAI Yu-xiu¹
XING Li-hong¹ MIAO Jun-kui¹ LENG Kai-liang^{1*}

(¹Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071)

(²CNFC Overseas Fishery Co. Ltd, Beijing 100032)

(³Ocean University of China, Qingdao 266100)

ABSTRACT The variations of endogenous hormones in different periods and different parts of Rongfu *Laminaria saccharia* were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with UV detector. It was found that the content of indole-3-acetic acid (IAA) and abscisic acid (ABA) increased significantly in three important periods of *L. japonica* (juvenile, grow-out, mature). The content of zeatin (ZT) reached the highest in the mature period, and the lowest in the grow-out period. The content of indolebutyric acid (IBA) reached the highest in the grow-out period, and the lowest in the juvenile period. At each development stage, different plant hormones were found at the highest contents in different parts of the *L. saccharia* blade; IAA showed the highest content in the top, while the highest contents of ZT was found in the middle, and both IBA and ABA were found in the bottom.

KEY WORDS HPLC Rongfu *Laminaria saccharia* Endogenous hormones

植物要维持正常协调的生长发育状态、适应外界环境的变化, 其各细胞、组织和器官之间必须进行及时有效的信息交流, 担负这种信息交流任务的化学信使之一就是植物激素 (Plant hormone) (武维华 2003)。20

国家科技支撑计划 (2007BAD62B03)、中央级科研院所基础科研经费 (2008-GY-08、2009-CB 02) 共同资助

* 通讯作者。E-mail: lengkl@ysfri.ac.cn, Tel: (0532)85836348

收稿日期: 2010-04-08; 接受日期: 2010-06-29

作者简介: 王泽文 (1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事水产品加工及质量安全检测工作。E-mail: wangzewen945@sohu.com, Tel: 13468295808

世纪以来,人们已经从植物体内发现了五大类植物激素,藻类中植物激素的深入研究是从20世纪70年代开始的,相对陆生植物而言,起步较晚,水平低。随着藻类的开发与应用,人们利用最新的色谱和色质联用技术以及细胞生物学和免疫学等手段,对藻类中激素的结构和性质以及生理生化代谢过程进行了系统的研究(侯和胜等1998;黄冰心等2001)。

海藻中植物激素研究主要集中于海藻中植物激素的定性研究、含量分布、生理活性和应用研究等几个方面,其中激素定性和含量变化的研究是重点。人们刚开始研究海藻中植物激素时采用生物试法, van Overbeek (1940)用燕麦试法从一系列海藻中检测到 IAA 的存在,并发现巨藻 *Macrocystis phyryfera* 等藻体内不同部位植物生长素存在明显的浓度差。1984年 Featoney-Smith 等用大豆试法在昆布 *Ecklonia maxima* 中检测到细胞激动素活性。1973年 Hussain 等用莴苣下胚轴生长法检测的脱落酸类似物存在于海带中。但是生物试法只是寻找藻类植物激素的第一步,随着各种分析手段的逐步成熟,色谱以及色质联用技术在分析藻类中植物激素的含量及组成方面,展示出极大的优势。黄冰心等(2002)采用 HPLC 成功分析了海带中细胞激动素,并对海带植物激素的提取及纯化方法进行了优化。韩丽君等(2005)对16种海藻中植物生长素的提取及分离纯化进行了研究,逐步确定了海藻中植物激素高效液相分析方法的处理过程。目前人们已经从藻类中发现了高等植物中含有的所有内源植物激素,并且可以利用 GC-MS 同时在一种海藻中检测到几种植物激素(Jacobs 1993)。

在海带成长过程中,各种植物激素含量及组成并不是一成不变的,而是呈现一个动态的变化过程,正是由于这一过程才导致了海带的孢子发育、幼苗成长、叶片厚成、成熟衰老等各种生命过程,因此对海带中各种植物激素的鉴定和含量变化进行着重分析有着重要的科学价值。目前对海带中生长素、脱落酸和细胞激动素的鉴定及含量测定已经有过一些报道(李铁松 2008),尤其是生长素和细胞激动素,它们在海带本身的生长发育过程中起着至关重要的作用,能促进藻类细胞的分裂、伸长和细胞内营养物质的运输,但是对于不同植物激素在海带不同生长时期以及不同生长部位的分布情况却鲜有报道,特别是利用高效液相色谱仪(HPLC)等现代分析技术对其进行研究报道较少。

海带藻体从小到大,一般分为6个发育阶段:幼苗期、凹凸期、幼嫩期、厚成期、成熟期和衰老期(方宗熙 1992)。其中幼嫩期、厚成期、成熟期是海带生长过程中最为关键的3个时期,幼嫩期是藻体长度和宽度生长最快的时期,又称为快速生长期;厚成期是干物质积累阶段,藻体厚而硬;成熟期的海带,叶片上逐渐出现孢子囊斑。本文采用高效液相色谱法对其3个关键生长阶段中海带藻体内4种内源植物激素的含量变化进行了检测,以期为海藻中植物激素的研究提供参考资料,也为海藻肥以及其他海藻化工行业提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 材料

荣福海带由中国海洋大学大型海藻种质库提供,于2009年4~8月分3次采于山东荣成俚岛湾。荣福海带属于种间杂交种(*Laminaria japonica* × *Laminaria saccharia*),藻体浓褐色、根系发达、柄扁平、基部圆平、藻体较宽、中带部明显,21℃下藻体形态完整。

采集的样品迅速整棵放入加冰袋的保温箱中,带回实验室。试验样品用蒸馏水洗掉表面泥沙后,按照叶片基部、中带部、尖部划分为3部分(图1),分别切割后用匀浆机打碎,混匀。以40g样品为单位分别包装,-18℃下冷冻保存。

1.2 仪器与试剂

安捷伦1100型高效液相色谱仪,包括四元泵、紫外检测器和色谱工作站;BT224S电子分析天平:法国沙多利斯公司;CR22G离心机:日本日立公司;KQ-600DE型数控超声波清洗器:昆山市超声仪器有限公司;旋转蒸发器 Laborota 4000:德国 Heidolph 公司;涡旋混合器、组织匀浆机 IKA-T18basic:德国 IKA 公司;Waters Oasis MCX 固相萃取小柱(混合型阳离子交换固相萃取小柱)60 mg/3 ml;Waters Oasis MAX 固相萃取小柱(混合型阴离子交换反相吸附固相萃取小柱)60 mg/3ml。

乙腈、甲酸、甲醇为色谱纯;冰乙酸为优级纯;石油醚、氨水为分析纯;吲哚乙酸(IAA,99%)、脱落酸(ABA,98%)、玉米素(ZT,98%)、吲哚丁酸(IBA,98%),标准品均为美国 Sigma Chemical 公司提供。实验中所有用水均为去离子水。

5%酸化甲醇:准确量取甲酸 5 ml,加入 95 ml 甲醇,充分混匀。

5%氨化甲醇:准确量取氨水 5 ml,加入 95 ml 甲醇,充分混匀。

1.3 色谱条件

ZORBAX Eclipse XDB-C18 色谱柱,250 mm×4.6 mm,5 μm,美国 Agilent 公司;流动相为甲醇:0.8%乙酸溶液=60:40;流速 0.8 ml/min;进样量 20 μl;柱温为 40 ℃。检测波长 260 nm,流动相用 0.22 μm 微孔有机相滤膜过滤并超声脱气。

1.4 内源激素的提取纯化

准确称取 40 g 鲜海带样品,剪切破碎后将样品研磨匀浆,加入 100 ml 甲醇,放于超声波清洗仪中提取 5 min。4 000 r/min 离心 5 min,上清液转移于 150 ml 鸡心瓶中,加入 10 ml 甲醇重复提取两次,合并上清液。将上清液于 35 ℃减压浓缩至 2 ml,向浓缩液中加入 0.2 g 聚乙烯吡咯烷酮(PVPP),充分涡旋振荡后过滤。调节滤液 pH 至 5,过 MAX 固相萃取小柱。MAX 固相萃取小柱先用 2 ml 甲醇和 2 ml 水活化,然后加入 2 ml 样液,待样液流净后,用 2 ml 5%氨水溶液和 2 ml 甲醇淋洗,最后用 2 ml 5%酸化甲醇洗脱,分别收集洗脱液、淋洗液和流出液。将淋洗液和流出液混合并浓缩至干,加入 2 ml 甲醇定容后,调节溶液 pH 至 6,过 MCX 固相萃取小柱。MCX 固相萃取小柱先用 2 ml 甲醇和 2 ml 水活化,然后加入 2 ml 样液,待样液流净后,用 2 ml 5%氨水溶液和 2 ml 甲醇淋洗,最后用 2 ml 氨化甲醇洗脱,收集洗脱液。合并两次洗脱液,于 35 ℃下减压浓缩至干。准确加入 1.0 ml 50%甲醇溶液涡旋振荡溶解残留物,经 0.22 μm 滤膜过滤后进样分析。

2 结果与分析

2.1 荣福海带中玉米素(ZT)含量的变化

玉米素属于细胞激动素的一种。据报道,一般在生长发育旺盛的时期(3~8月),海藻中非极性细胞激动素(玉米素核苷 ZR,玉米素 ZT)激素水平较高(刘永定等 2001)。

通过对荣福海带中各不同生长阶段 ZT 含量分析可以发现(图 2),成熟期时海带各部位中 ZT 含量最高,幼嫩期次之,厚成期最少。成熟期正是荣福海带配子释放高峰期和再生生长开始的时期,此时 ZT 含量明显增多,这与细胞激动素的促进细胞分裂和扩张、调节细胞分化以及形态构建的作用是相符合的。从叶片部位分析,海带的中带部和基部中 ZT 含量较高,其中成熟期海带中带部含量最高,达到了 44 μg/kg·FW(Fresh Weight, FW),这主要是由于基部和中带部有居间分生组织,是叶片中生长最快的地方,此处必然需要大量的细胞激素类物质,促进细胞的分裂、延长。从整体看,荣福海带在这 3 个关键时期内,ZT 含量在 8~44 μg/kg·FW 范围内波动。

2.2 荣福海带中吲哚乙酸(IAA)含量的变化

植物生长素在藻类中分布很广泛,作为一类促进植物生长发育的内源植物激素,植物生长素在藻类中的含

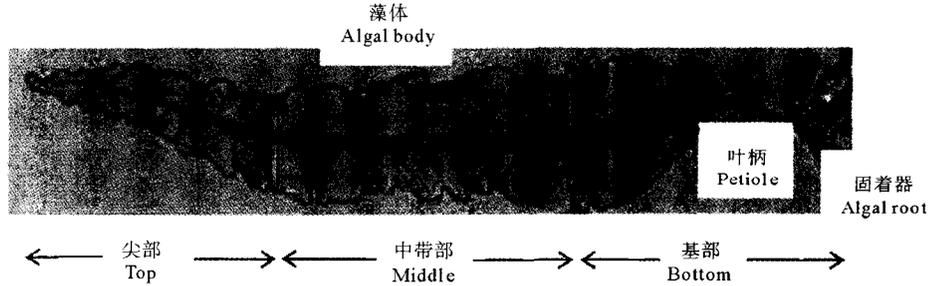


图 1 海带结构及分割示意

Fig. 1 Structure and subsection of kelp *Laminaria saccharia*

量变化与季节性的营养生长和发育有密切关系。一般来说处在生长发育阶段和生长季节的藻体中植物生长素的总体含量较高(刘永定等 2001)。

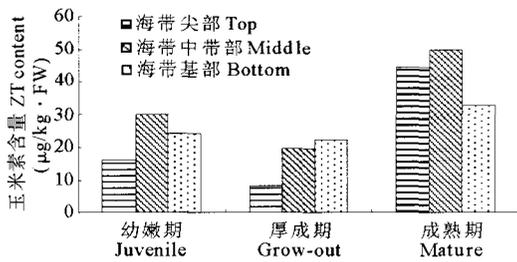


图 2 荣福海带中玉米素在不同时期各部位含量变化
Fig. 2 Variations of zeatin in different periods and parts of Rongfu *L. saccharia*

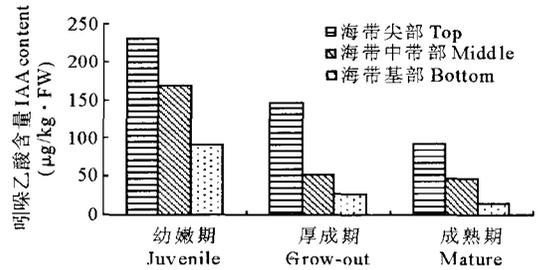


图 3 荣福海带中 IAA 在不同时期各部位含量变化
Fig. 3 Variations of IAA in different periods and parts of Rongfu *L. saccharia*

从图 3 可以看出,荣福海带中 IAA 含量在幼嫩期达到最大值,随后呈现明显的递减趋势,至成熟期时 IAA 含量已经很低,尤其是在基部,仅为 $15.35 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{FW}$ 。这说明在幼嫩期时,IAA 活动最剧烈,此阶段正是藻体快速发育的时期,藻体的长度和宽度有着迅速增加的需求,因此具有增加叶片生长、诱导分生组织形成、促进藻体细胞组织分裂作用的 IAA 便快速、大量地在藻体的顶芽(即尖部)形成。由于生长素是唯一具有极性运输性质的植物激素,因此在顶芽合成的 IAA 沿着海带的茎干(中带部)和根系(叶柄以下部位),形成一个上高下低的 IAA 浓度梯度,这也正印证了图 3 中 IAA 在海带中由上至下浓度递减的变化趋势。从整体看,荣福海带在这 3 个关键时期内,IAA 含量在 $15.35 \sim 229.46 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{FW}$ 范围内波动。

2.3 荣福海带中吲哚丁酸(IBA)含量的变化

长期以来 IBA 一直被看做是人工合成的植物生长调节剂,实质上它是植物体内天然存在的一种生长素。1954 年 Blommaert 首先从马铃薯的皮中发现了 IBA,后来又陆续从烟草、菜豆和豌豆等高等植物中发现了天然 IBA 的存在(江玲等 1999)。

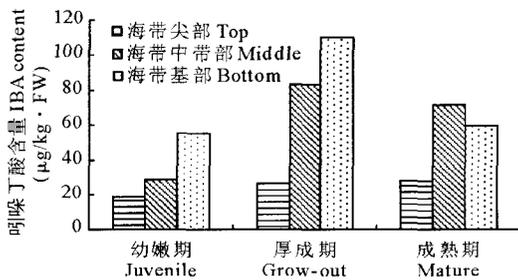


图 4 荣福海带中 IBA 在不同时期各部位含量变化
Fig. 4 Variations of IBA in different periods and parts of Rongfu *L. saccharia*

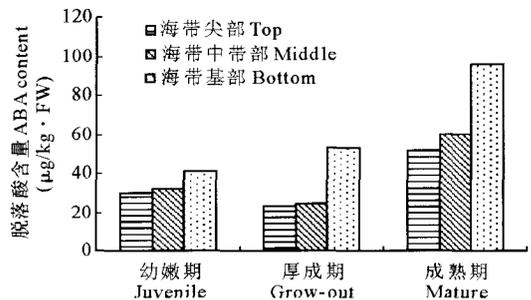


图 5 荣福海带中 ABA 在不同时期各部位含量变化
Fig. 5 Variations of ABA in different periods and parts of Rongfu *L. saccharia*

通过图 4 可以看出,IBA 在厚成期海带中含量达到了最高,尤其是在海带的基部,含量达到了 $109.72 \mu\text{g}/\text{kg} \cdot \text{FW}$ 。从 IAA 与 IBA 的不同时期的含量变化分析中,我们不难发现,随着 IAA 含量的减少,IBA 含量却有着逐渐增大的趋势。文献表明,高等植物中 IAA 与 IBA 可以相互进行转化,其中 IAA 转化为 IBA 是通过乙酰辅酶 A 在 IAA 的羧基上进行酰基化形成的(Wykes *et al.* 1995)。因此可以认为,在荣福海带生长的幼嫩期,顶芽部位同时产生 IAA 和 IBA 等具有生长素活性物质,由于海带此时生长需求旺盛,所以吲哚丁酸部分转化为 IAA 类物质,从而发挥促进海带叶片生长发育和营养物质积累的作用。在海带的厚成期,由于此时生长已经趋于平缓,大量的 IAA 类物质由于极性运输达到基部和中带部位,在此处经过一系列化学变化部分转化为 IBA,最终促进基部以及海带柄部的发育。

从图 4 中还可以看出,海带基部的 IBA 含量明显要高于其他两个部位,这与 IBA 能加速根的生长、诱导生

成不定根的作用是紧密相关的。从整体看,荣福海带在这3个关键时期内,IBA含量在 $18.75\sim 109.72\ \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{FW}$ 范围内波动。

2.4 荣福海带中脱落酸(ABA)含量的变化

ABA1967年国际植物生长物质会议正式被认定为植物内源植物激素,它广泛地存在于高等维管植物中。ABA在植物的种子发育、叶片衰老以及呼吸调节等过程中有重要作用。ABA是一种“胁迫激素”,在植物寒害、盐害、干旱等胁迫-感知-反应过程中起重要作用(Popova *et al.* 1996; Wu *et al.* 1997),有研究表明ABA可以提高金鱼藻抗胁迫能力(李小路等 2008)。

图5中ABA变化趋势表明,ABA在荣福海带中的分布随着海带的成长,呈现逐渐增大的趋势,在海带成熟期,ABA含量达到最高点。在同一海带的不同部位,ABA分布也不相同,在海带基部含量最高,海带中部部和海带尖部次之。成熟期以后的海带出现衰老腐烂以及停止生长发育的迹象,这与ABA的作用是密不可分的。从整体看,荣福海带在这3个关键时期内,ABA含量在 $23.14\sim 95.89\ \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{FW}$ 范围内波动。

3 结论

荣福海带中4种内源植物激素随着生长期以及生长部位的不同而改变,各种植物激素在以下范围内变化: ZT $8.06\sim 49.77\ \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{FW}$, IAA $15.35\sim 229.46\ \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{FW}$, IBA $18.75\sim 109.72\ \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{FW}$, ABA $23.14\sim 95.89\ \mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{FW}$ 。

生长素、细胞激动素和脱落酸在促进果实发育方面扮演着重要角色,在诱导细胞分裂、促进细胞伸长及营养物质向果实转移等方面都具有重要的生理作用。在海带尖部IAA和ZT含量处于较高水平,有利于孢子发育、叶片的快速生长和藻体细胞组织的分裂分化。在中部部IBA含量达到最大值,维持叶片发育需求以及营养物质的积累。在基部,ABA含量达到最大值,起到促进细胞的衰老及增强抗逆性的作用。

藻类植物由孢子发育成完整的植株,是一个复杂的形态建成过程,期间受到多种植物激素的共同作用(协同作用、抑制作用),该研究为进一步探讨荣福海带生长机理提供了一定的生理学依据,对海藻类植物的养殖、生产具有指导意义。

参 考 文 献

- 方宗熙. 1992. 海藻养殖. 北京: 海洋出版社
- 刘永定, 范 晓, 胡征宇. 2001. 中国藻类学研究. 武汉: 武汉出版社
- 江 玲, 周 雯. 1999. 植物体中的吡啶丁酸(IBA). 生命科学, 6(3): 135~136, 101
- 李小路, 潘慧云, 徐 洁, 鲜启鸣, 高士祥, 尹大强, 邹惠仙. 2008. 外源脱落酸提高金鱼藻抗铜绿微囊藻胁迫能力的研究. 农业环境科学学报, 27(5): 1 980~1 984
- 李铁松. 2008. 海带中两种植物激素的分离及其活性研究. 见: 大连理工大学博士学位论文
- 武维华. 2003. 植物生理学. 北京: 科学出版社
- 侯和胜, 吴超元. 1998. 藻类中植物激素的研究进展. 海洋科学集刊, 10(40): 167~174
- 黄冰心, 范 晓, 韩丽君. 2002. 海带中细胞激动素的纯化分离方法. 海洋与湖沼, 5(33): 509~514
- 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
- 韩丽君, 范 晓, 袁兆惠. 2005. 16种海藻中植物生长素的提取、分离纯化和含量测定. 海洋与湖沼, 36(2): 167~171
- Jacobs, W. P. 1993. A search for some angiosperm hormones and their metabolites in *Caulerpa paspaloides*. Phycol. 29: 595~600
- Wykes, S. M., and Nelson, J. E., Visscher, D. W., Djakiew, D., and Krawetz, S. A. 1995. Coordinate expression of the PRM1, PRM2, and TNP2 multigene locus in human testis. DNA and Cell Biology, 14(2): 155~161
- Popova, L. P., Tsonev, T. D., Lazova, G. N., and Stoinova, Z. G. 1996. Drought-and ABA-induced changes in photosynthesis of barley plants. Physiol. Plant. 89(4): 623~629
- van Overbeek, J. 1940. The summer meetings of the American Society of Plant Physiologists. Science, 91(2 363): 351
- Wu, Y., Kuzma, J., Mar chal, E., Graeff, R., Lee, H. C., Foster, R., and Chua, N. H. 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. Science, 278(5 346): 2 126~2 130