



## 专论与综述

## 微藻胞间植物激素甄别方法与研究进展

彭石子<sup>1</sup> 陈从立<sup>1</sup> 李小双<sup>1</sup> 周奕含<sup>2</sup> 王建伟<sup>2</sup> 周丹丹<sup>\*1</sup><sup>1</sup> 东北师范大学 吉林省水污染控制与资源化工程实验室 吉林 长春 130000<sup>2</sup> 中国科学院长春应用化学研究所 国家电化学和光谱研究分析中心 吉林 长春 130022

**摘要:** 植物激素是一类微量的内源化合物,可能是微藻生命活动过程中的通用“语言”。植物激素甄别是认知微藻群体感应和胞间通讯机制的关键。然而,由于植物激素具有超微量、性质复杂和干扰物质共存的特点,选择适宜的提取浓缩方法、提高检测灵敏度、减小基质效应和区分同分异构体仍是甄别植物激素的难点问题。本文综述了植物激素提取与检测的研究现状,关注了各类样品制备植物激素的方法和案例,重点阐释了固相萃取法、液液萃取法、磁性固相萃取法、液液微萃取法等提取方法以及液相色谱、液相色谱串联质谱、毛细管电泳等检测方法的优缺点,展望了利用串联固相萃取法从藻液提取痕量植物激素的前景,以及采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱检测植物激素的方法,以期对藻际微生物生态相关研究提供方法参考。

**关键词:** 微藻, 植物激素, 萃取, 甄别, 液质联用

## Identification of plant hormones in intercellular microalgae cells and prospects of future studies

PENG Shizi<sup>1</sup> CHEN Congli<sup>1</sup> LI Xiaoshuang<sup>1</sup> ZHOU Yihan<sup>2</sup> WANG Jianwei<sup>2</sup> ZHOU Dandan<sup>\*1</sup><sup>1</sup> Engineering Laboratory for Water Pollution Control and Resources Recovery in Jilin Province, Northeast Normal University, Changchun, Jilin 130000, China<sup>2</sup> National Analytical Research Center of Electrochemistry and Spectroscopy, Changchun Institute of Applied Chemistry Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130022, China

**Abstract:** Plant hormones is one of trace endogenous compounds, which probably are the universal “languages” among microalgae cells. The screening and identification of plant hormones play a significant role in understanding the quorum sensing and intercellular communication mechanisms of microalgae cells. However, these hormones are usually in ultra-trace levels, with various species, complicate properties, and coexist with complex matrices. Thus, it is still very challenging to develop an effective method to identify the plant hormones, which includes verifying extraction procedures, improving detection sensitivity, reducing matrix effects and distinguishing isomers. In this work, we reviewed the

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (51722803, 52070036); Fundamental Research Funds for the Central Universities (2412018ZD042)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-431-85262618; E-mail: zhouddandan415@163.com

**Received:** 29-09-2020; **Accepted:** 05-12-2020; **Published online:** 25-02-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(51722803, 52070036); 中央高校基本科研业务费专项资金(2412018ZD042)

**\*通信作者:** Tel: 0431-85262618; E-mail: zhouddandan415@163.com

**收稿日期:** 2020-09-29; **接受日期:** 2020-12-05; **网络首发日期:** 2021-02-25

present research status of plant hormones extraction and detection, especially focused on the methods and strategies on preparing plant hormones from various samples. The advantages and disadvantages of these pretreatment methods were systematically elaborated, from aspects of solid phase extraction, liquid extraction, magnetic solid phase extraction, liquid-liquid microextraction, etc. The detection methods, such as liquid chromatography, liquid chromatography tandem mass spectrometry, capillary electrophoresis, etc., were also compared. Then, we look forward to the prospects of tandem solid phase extraction method on extracting trace amounts of plant hormones from algae slurry. We considered that UPLC-LTQ-Orbitrap-MS method would be a promising technology for plant hormones detection. We aimed to provide some method references for the study of inter-algal microbial ecology.

**Keywords:** microalgae, plant hormones, extraction, identification, LC-MS

植物激素一般指由植物合成的一系列结构不同的小分子有机化合物,它们参与调控植物的每个生命过程,既可以调控植物自身的生长发育(如种子萌发、细胞增殖、细胞分化、器官形成、茎的形成和衰老等),又通过与植物生长的外部环境相互作用来适应环境(如对光照、营养不良、干旱、昆虫或病原体攻击等)<sup>[1]</sup>。藻类与高等植物的发育具有相似性<sup>[2]</sup>。20世纪60年代至70年代,在绿藻、褐藻和红藻中发现了一系列具有激素活性的生长素、异戊烯基腺嘌呤(Riboprime, iP)、赤霉素(Gibberellins, GAs)和月桂酸(Lauric Acid, LA);20世纪80年代中期,发现在环境胁迫下植物激素具有调节微藻代谢途径从而影响其生长的功能<sup>[3]</sup>。可见,植物激素是提高微藻生物量和物质资源产量的重要影响因素<sup>[4]</sup>。

植物激素也可能具有调节藻类与其他微生物之间的跨界胞间通讯作用,即对藻际微生物生态特征具有重要影响;这一科学假说可以从近年来发现的藻类与细菌的相互作用得到理论支持;微藻物质富集困难是微藻物质培养与废水处理耦合技术的关键瓶颈问题,同时微藻和细菌之间的关系决定了微藻物质能源与废水处理耦合技术体系的稳定性与效率;从本质上来说,藻-菌之间的相互作用取决于胞间通讯行为<sup>[5]</sup>。周丹丹团队<sup>[6-7]</sup>提出了以氮饥饿手段进行藻-菌共培养的策略,该策略同步控制并解决了细菌过量增长和微藻富集困难的问题;在此过程中发现了真核微生物微藻具有感知细菌的“语言”——酰基高丝氨酸内酯

(Acyl Homoserine Lactones, AHLs)的能力,从而促进微藻聚集与颗粒化。该团队进一步探讨了废水中细菌信号分子(Quorum Sensing Molecules, QSMs)对微藻物质油脂产量的影响及相关机制,发现在QSMs的刺激下,藻细胞油脂合成途径的关键酶普遍上调,编码乙酰辅酶A羧化酶和脂肪酸合成酶等在内的14个酶的40个转录本表达上升了2-8倍,微藻的油脂产率和油脂产量分别提高了88%和84%<sup>[8]</sup>。以上研究突破了细菌污染对微藻物质转化负面影响的传统认知。

深入认知植物激素的作用需要明晰、精准甄别植物激素的方法。植物激素种类繁多、性质纷杂、赋存量低,提取与检测方法虽然取得了显著进展,但仍面临相当严峻的挑战。本文综述了植物激素提取与检测的研究现状,关注了各类样品制备植物激素的方法和案例,重点阐释了固相萃取法、液液萃取法、磁性固相萃取法、液液微萃取法等提取方法以及液相色谱、液相色谱串联质谱、毛细管电泳等检测方法的优缺点,展望了利用串联固相萃取法从藻液提取痕量植物激素的前景,以及采用超高效液相色谱-线性离子阱-静电场轨道阱组合式高分辨质谱(UPLC-LTQ-Orbitrap-MS)检测植物激素的方法,以期对藻际微生物生态相关研究提供方法参考。

## 1 植物激素及其在微藻生长代谢中的调节作用

### 1.1 植物激素研究进展

1880年,Darwin提出植物体内存在影响其生

长的化学物质,直到1928年,荷兰科学家Went将该类物质命名为生长素<sup>[9]</sup>。随后陆续在46种微藻中发现了吲哚-3-乙酸(Indole-3-Acetic Acid, IAA)、吲哚-3-丁酸(Indole-3-Butyric Acid, IBA)、吲哚-3-丙酸(Indole-3-Propionic Acid, IPA)、吲哚-3-乙酰胺(Indole-3-Acetamide, IAM)等生长素<sup>[10]</sup>。

生长素被发现后,许多小的化学物质陆续被鉴定为植物激素<sup>[11]</sup>。1955年,Miller等<sup>[12]</sup>在鲱鱼精子的DNA水解产物中发现了一种小分子化合物,因其具有促进细胞分裂和不定芽形成效果,被命名为激动素(Kinetin, KT);不久后,研究者在未成熟玉米种子的胚乳中分离得到一种KT类似物——玉米素(Zeatin, ZT)<sup>[13]</sup>。后续发现了多种类似物,包括玉米素核苷(trans-Zeatin-Riboside, ZR)、二氢玉米素(Dihydrozeatin, DHZ)、二氢玉米素核苷(Dihydrozeatin Riboside, DHZR)、iP等属于植物体内天然的游离态细胞分裂素;甲硫基玉米素、甲硫基异戊烯基腺苷、异戊烯基腺苷(Isopentenyl Adenosine, iP)属于结合态细胞分裂素;6-苄基腺嘌呤(6-Benzylaminopurine, 6-BA)、多氯苯甲酸属于人工合成的细胞分裂素<sup>[14]</sup>。

随着植物学的发展,越来越多的植物激素被逐渐发现,包括乙烯(Ethylene)、GAs、脱落酸(Abscisic Acid, ABA)、油菜素甾醇类物质(Brassinosteroids, BRs)等,它们在植物的生长过程中有着精细的分工<sup>[15]</sup>,比如促进根茎生长、叶片衰老、雄蕊发育、花瓣生长、细胞伸长分裂、花粉管伸长而保持雄性育性,以及加速组织衰老、维持顶端优势和种子萌发等生理作用。表1给出了一些经典植物激素的理化性质。

## 1.2 植物激素的作用

### 1.2.1 对微藻生长的影响

植物激素对微藻的生长具有显著的影响<sup>[16]</sup>。IAA、IPA和IBA使小球藻细胞密度提高11–19倍,1-萘乙酸(1-Naphthylacetic Acid, NAA)使小球藻生物量产量提高2.2倍<sup>[17]</sup>。周丹丹团队<sup>[18]</sup>在氮饥饿胁迫下发现高浓度磷促进了小球藻中植

物激素的产生,使微藻生物量产量达到4.53 g/L,与充足氮条件的效果相当,过量的磷促进与微藻生长相关的基因*rot3*、*bas1*、*cyp735a*、*fbp*、*got2*和*aoc3*上调。越来越多的证据表明,生长素与非生物胁迫处理相结合可以进一步提高微藻的生产力,特别是当氮源减少到40%时,微藻的生物量提高了54%–69%<sup>[19]</sup>。在微藻培养中,外源GAs可显著缩短滞后期,促进细胞分裂和对数期生长,也有研究表明GAs主要参与细胞的伸长,而不参与细胞的分裂<sup>[2]</sup>。综上所述,植物生长素、NAA和GAs均对微藻生长产生不同的影响,可见不同的植物激素可以维持藻类细胞的生长,促进代谢物的合成。

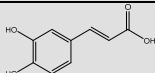
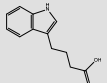
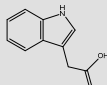
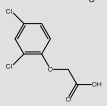
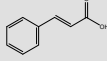
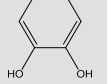
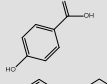
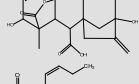
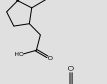
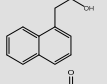
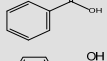
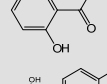
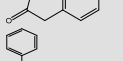
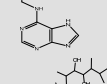
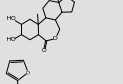
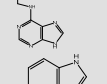
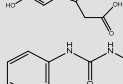
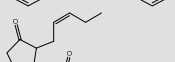
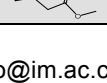
以上研究表明植物激素可能是诱导微藻发生群体感应的信号分子。群体感应是微生物间信息交流的行为。微生物在不同生态系统中产生特征性的信号分子,形成由多种“语种”构成的语言体系(图1)<sup>[20]</sup>。目前,群体感应在细菌、真菌领域已经被广泛报道。微藻是除了细菌、真菌之外的另一类重要的微生物,在自然界中分布广泛并与它们共生。理论上,微藻也会分泌一些胞外物质,影响藻际环境中的其他藻类、细菌和植物的生长,以维持自身优势地位。其中,植物激素可以提高微藻在非生物胁迫下氧化应激的能力,调节生物量和生产有价值的期望产品<sup>[21]</sup>。

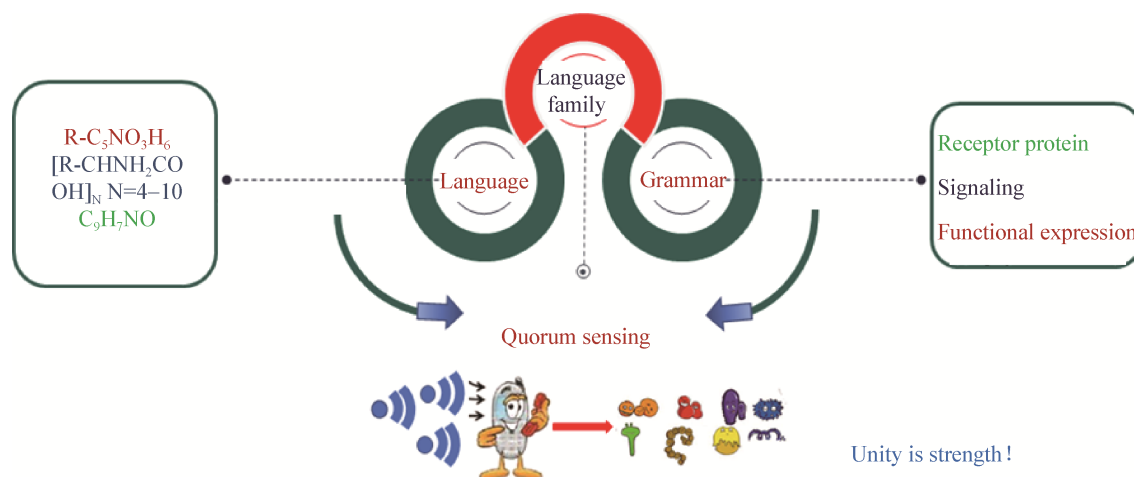
### 1.2.2 对微藻胞内组分的影响

植物激素对微藻胞内组分也具有重要影响。植物激素能提高微藻中色素、可溶性蛋白质和胞内脂肪酸的含量。外源赤霉素(Gibberellin A3, GA<sub>3</sub>)可促进微藻胞内色素和蛋白质的积累<sup>[22]</sup>,己酸二乙氨基乙醇酯(DA-6)能够抑制棕榈酸的积累、促进亚油酸的积累,IAA、DA-6可抑制油酸积累<sup>[23]</sup>。综上所述,不同含量的GA<sub>3</sub>、IAA、DA-6均对微藻中色素、可溶性蛋白质、油脂和胞内脂肪酸的含量产生不同的影响。植物激素对真核微藻的生长和胞内组分具有调节作用,是因为高等植物激素系统是由微藻的一级代谢系统演化而来,因此微藻与高等植物具有相似的植物激素合成机制<sup>[17]</sup>。

表 1 经典植物激素的理化性质

Table 1 Physicochemical properties of some classical plant hormones

Name	Structural formula	Molecular formula	Molecular mass	Chemical abstracts service
Caffeic acid		C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	180.16	331-39-5
Indole-3-butyric acid		C <sub>12</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	203.23	133-32-4
Indole-3-acetic acid		C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	175.18	87-51-4
2,4-dichlorophenoxyacetic acid		C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	221.03	94-75-7
Cinnamic acid		C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	148.15	621-82-9
Catechol		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	110.11	120-80-9
p-hydroxybenzoic acid		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.12	99-96-7
Gibberellin		C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	346.37	77-06-5
Jasmonic acid		C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	210.12	3572-66-5
1-naphthylacetic acid		C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>	186.20	86-87-3
Benzoic acid		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	122.12	65-85-0
Salicylic acid		C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	138.12	69-72-7
4-hydroxyphenylacetic acid		C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	152.15	205-851-3
6-benzylaminopurine		C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	191.18	54-16-0
Brassinolide		C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	480.67	72962-43-7
Kinetin		C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> O	215.21	525-79-1
5-hydroxyindole-3-acetic acid		C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>3</sub>	210.27	3572-66-5
N,N'-diphenylurea		C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	212.24	102-07-8
Methyl jasmonate		C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub>	224.30	1211-29-6

图 1 胞间通讯机制<sup>[20]</sup>Figure 1 Intercellular communication mechanism<sup>[20]</sup>

## 2 植物激素提取的预处理方法

为了有效地从复杂的微藻藻液中提取植物激素, 需要根据藻液性质选择样品消耗量少、灵敏度高、富集能力强的提取技术。然而, 由于植物激素在微藻中含量极低且种类繁多, 同时微藻藻液基质复杂, 前处理方法仍是制约痕量植物激素甄别的一个技术瓶颈<sup>[24]</sup>。因此, 发展高效的样品前处理技术, 结合分离检测技术, 建立高选择性、高灵敏度、高可靠性的植物激素甄别方法, 是推动微藻胞间通讯深入研究的关键。根据提取方式的不同, 植物激素常用的前处理方法可分为经典提取法和微提取法, 包括液液萃取法(Liquid-Liquid Extraction, LLE)、固相萃取法(Solid Phase Extraction, SPE)、串联固相萃取法、液液微萃取法(Liquid Phase Micro-Extraction, LPME)、固相微萃取法(Solid Phase Micro-Extraction, SPME)、磁性固相萃取法(Magnetic Solid Phase Extraction, MSPE)和化学标记法(Chemical Labeling, CL)等<sup>[25-35]</sup>。表 2 为植物激素的各种提取方法概述。

随着植物激素在微藻中的深入研究, 目前现有提取植物激素的方法为发展藻液植物激素的预处理方法提供了一定的参考和依据, 但从

藻液这一特有的介质中提取植物激素仍然面临严峻的挑战。

### 2.1 藻间植物激素化学提取方法

目前从藻液提取植物激素的方法主要为化学法, 其基本原理是采用化学试剂破坏细胞结构以提取目标组分。蔡西栗等<sup>[36]</sup>采用化学法提取了海洋红藻中的植物激素: 首先充分研磨藻细胞, 然后用体积比为 2:1:0.002 的正丙醇:水:氯化氢萃取, 以 HLB 固相萃取柱纯化, 再经三甲基硅烷基重氮甲烷衍生化后, 成功提取了 5 种内源性植物激素 IAA、ABA、茉莉酸(Jasmonic Acid, JA)、水杨酸(Salicylic Acid, SA)和肉桂酸(Cinnamic Acid, RA)。这种预处理方法回收率高(76.7%–104.3%)、提取方法简便且重现性好。Gupta 等<sup>[37]</sup>采用的提取方法更为简便, 他们将离心后的海藻(*M. oxyspermum*)在液氮中研磨后, 在提取缓冲液(甲醇:水:甲酸=15:4:1, 体积比)中提取, 再将混合溶液离心并收集上清液, 最后将残余物进行 2–3 次重复萃取, 该方法回收率为 80%–120%。Lu 等<sup>[38]</sup>进一步优化了化学提取法, 将液氮研磨后的藻粉加入含 1 mmol/L 丁基化羟甲基苯抗氧化剂的 80%甲醇溶液中, 混合物超速离心并收集上清液, 残留物用甲醇冲洗并再萃取, 将目标分析物和含 NaCl 的溶液混合,

表 2 植物激素的各种提取方法概述

Table 2 Summary of various extraction methods of plant hormones

Extraction method	Advantage	Disadvantage	Scope of application	Sample preparation	References
Liquid-liquid extraction	Selective extraction and separation efficiency are controllable	Complex operation and large amount of organic solvent	The mixture contains volatile components, and the boiling point of each component in the liquid mixture is close	Organic extracts, such as MeOH, CHCl <sub>3</sub> , H-COOH, etc	[25-26]
Solid phase extraction	High preparation speed, good reproducibility and high flux	Single-layer adsorbent can not be chromatographic analysis, double-layer adsorbent synthesis is difficult	Solid particles in SPE column were selected according to different physicochemical properties of plant hormones	Silica solid phase extraction column, C18, Oasis HLB, and ion exchange and adsorption column, etc	[26-28]
Series solid phase extraction	High recovery rate	Large amount of solvent, high cost	Suitable for acidic and alkaline targets	Anion exchange column and cation exchange column	[29]
Liquid phase micro-extraction	Easy to operate and environment friendly	It is easily affected by turbulent flow in solution	Suitable for micro and unstable objects	Single-drop liquid-liquid-liquid microextraction column (SD-LLLME), etc	[30]
Solid phase micro-extraction	Simple, fast, selective, sensitive, solvent-free, cheap and repeatable	It depends on the coating material	Suitable for a single species of plant hormones	Fiber needle solid phase microextraction column, extraction capillary column, adsorption extraction agitator, etc	[31-32]
Magnetic solid phase extraction	Easy to operate, easy to separate, time saving, high enrichment rate	Magnetic nanomaterials directly affect the extraction efficiency and sensitivity	The analyte can be combined with a magnetic adsorbent and adsorbed by an external magnet	Magnetic porous polymeric adsorbent, magnetic hollow mesoporous silica ball, etc	[33]
Chemical labeling	High sensitivity and low detection limit	Susceptible to interference, some substances are not easily ionized/detected by UV or fluorescence detectors	Appropriate derivatization reagents combined with other extraction methods	Derivative reagent DEED, etc	[34-35]

然后与 CHCl<sub>3</sub> (作为萃取溶剂)和丙酮(作为分散溶剂)混合, 这种分散液-液微萃取(Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME)法成功检测到4种植物生长素(IAA、IPA、IBA 和 NAA), 回收率为 94.7%–116.0%。Li 等<sup>[39]</sup>将虎尾藻在液氮下磨碎, 在含 5%丁基化羟基甲苯(BHT)的甲醇:水:甲酸(15:4:1, 体积比)溶液中提取植物激素, 该方法可同时提取虎尾藻中 9 种植物激素, 包括 IAA、iP、iPA、ZR、ZT、ABA、SA、GA<sub>3</sub> 和 JA, 回收率为 67%–95%。Yalçın 等<sup>[40]</sup>将海藻在 75%甲醇水溶液中提取, Oasis HLB 萃取柱纯化植物激素(IAA、ABA、GA 和 ZT)回收率为 82.8%–98.9%。综上, 尽管植物激素提取和富集的方法已日趋成熟, 但是操作程序仍较复杂, 并且残留了大量的有毒有害萃取剂。

2.2 藻间植物激素提取新方法概述与挑战

固相萃取法是应用较为广泛的植物激素前处理方法。因吸附剂不同, 其萃取效果有显著差异。根据藻液中植物激素电离常数的大小选择适合的固相萃取柱, 同时优化 pH、洗脱液对甄别藻间植物激素至关重要。固相萃取柱结合其他萃取技术也可运用于植物激素提取, Cui 等<sup>[41]</sup>将 Oasis MCX 固相萃取柱与乙酸乙酯液液萃取相结合, 成功建立了一种从油菜叶片中同时测定 3 种 GAs (GA<sub>1</sub>、GA<sub>3</sub> 和 GA<sub>4</sub>)的方法, 回收率为 80%–115%。

微萃取因其能克服传统前处理方法的缺点, 在植物激素提取中也有应用。但采用固相微萃取进行前处理时, 藻间植物激素的萃取效率与固相微萃取纤维头涂层的体积直接相关, 涂层体积太小会导致藻间植物激素萃取效率低, 涂层体积太

大则会导致萃取平衡的时间延长, 扩大涂层的有效表面积是解决该问题的方法。液相微萃取法是在液液萃取法的基础上发展而来, 包括液-液微萃取和液-液-液微萃取等。液液微萃取法具有溶剂消耗量少、操作简单快速、回收效率高等优点, 由于该方法只能提取部分植物激素, 在多种植物激素提取方面受到一定限制<sup>[32]</sup>。然而, 液液微萃取由于其绿色化学的优点, 可以结合其他前处理技术来提高提取多样性, 具有成为检测藻间植物激素主流前处理方法的潜力。

磁性固相萃取因其分散萃取模式, 为萃取剂与藻液提供了较大的接触面积, 有利于植物激素的传质, 进而缩短了萃取时间。例如植物激素 BR 包含多个羟基, 具有亲水性。根据此特性, 结合亲水性相互作用的磁性固相萃取-原位衍生 (MSPE-ISD) 方法检测藻液中的内源性植物激素 BR; 该方法将亲水性磁性材料同时用作微萃取吸附剂和“微反应器”, 将萃取和衍生化过程整合, 大大简化了分析过程<sup>[28]</sup>。

化学标记因其灵敏度高成为植物激素前处理的新型方法, 该方法提高了被标记植物激素的稳定性、检测的灵敏度。但由于化学标记法近年来才兴起, 许多标签试剂的合成仍然无法规模化生产。综上所述, 目前已经建立了多种关于植物激素样品前处理的方法, 也得到了长远的发展。

### 2.3 植物激素检测方法现状与挑战

由于植物激素种类繁多, 以及同分异构体的存在, 使得准确甄别植物激素仍十分困难。20 世纪 70 年代初, 液相色谱被广泛应用于痕量植物激素的检测。液相色谱联用检测器包括紫外可见检测器、荧光检测器、质谱检测器, 其中质谱检测器是植物激素分析中最常用的检测器。质谱检测器的核心是质量分析器, 如四极杆质量分析器、飞行时间质量分析器、傅立叶变换离子回旋共振、离子阱质量分析器或静电场轨道阱。综上所述, 随着提取技术以及仪器检测的不断发展, 微藻胞间植物激素快速、准确甄别将成为一项必然

工作。

## 3 藻间植物激素甄别的方法与挑战

### 3.1 微藻产生植物激素的检测方法现状

通过前处理方法可消除藻液中脂质和其他干扰化合物, 但由于藻液中的植物激素含量极低且种类多样, 多数植物激素又具有相似的结构特征。因此, 针对特有的结构、性质等特征甄别植物激素是获取微藻内源植物激素信息的关键。这些信息是深入研究微藻胞间植物激素调节作用的依据。目前有关甄别植物激素的方法, 如生物鉴定法、免疫学方法、现代仪器分析法, 为发展藻液植物激素的检测技术提供了一定的参考和依据。

#### 3.1.1 生物鉴定法(Bioassay, BA)

BA 是最早用来检测植物激素含量的经典方法, 该方法以植物激素的生理活性为依据, 通过测定植物激素作用于植株或离体器官所产生的反应强度, 从而推算植物激素含量的方法。1928 年, 荷兰科学家 Fritz 根据生长素在燕麦胚芽鞘和琼脂中运输的特点, 首次使用燕麦胚芽鞘弯曲测定法检测生长素<sup>[42]</sup>。1933 年, Thimann 和 Bonner 进一步优化 BA, 并命名该方法为燕麦叶鞘切断伸长法, 使生物鉴定法在操作上较为简单, 之后陆续建立了小麦胚芽鞘切断抑制法检测 ABA、烟草愈伤组织分析法鉴定 CTK、大麦胚芽鉴定法鉴定 GAs 等<sup>[43]</sup>。尽管 BA 被认为是检测植物激素生物活性的唯一手段, 但由于 BA 专一性较差、灵敏度不高, 并且微藻中含有生长素类似物, 需要在前处理时尽可能纯化组分, 导致过程复杂、工作量大。因此, 生物鉴定法可以用于微藻粗提取液中植物激素的生理活性检测, 检测结果往往是寻找微藻藻液植物激素的第一步, 确定了植物激素生理活性后, 进一步纯化和检测藻间植物激素。

#### 3.1.2 免疫学方法

与生物鉴定法相比, 免疫学方法具有特异性强、灵敏度高、前处理简单等优点, 被认为是一种应用前景广阔的植物激素检测技术。酶联免疫吸附法 (Enzyme Linked Immunosorbent Assay,



ELISA)是最常用的免疫学技术,其基本原理是通过未标记抗原与抗体优先结合进而抑制酶标抗原与抗体免疫复合物的形成,最后通过显色反应来检测植物激素生理活性。该方法成功应用于检测CTK、JA、ABA、GAs、IAA<sup>[44]</sup>。免疫学与现代科技相结合,使植物激素检测得到进一步发展。李巍<sup>[45]</sup>通过优化电流免疫传感器进而检测植物激素ABA,该传感器具有较高的灵敏性、良好的重现性和稳定性。免疫学法结合聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)有希望在细胞水平上检测植物激素的含量。但是,免疫学测定法目前因抗体制备复杂,而且植物激素需与其他物质偶联后才能作为抗原,因而仍有一些局限性<sup>[46]</sup>。

### 3.1.3 理化检测分析法

随着现代仪器的发展,理化检测分析法已成为植物激素分析的主流,主要包括光谱法、电化学法和色谱法。最早的光谱法是用比色法测定IAA,该方法灵敏度较差<sup>[47]</sup>。虽然红外吸收光谱法、紫外吸收光谱法和荧光法等检测技术使光谱法在检测植物激素的灵敏度上得以提升,但仍存在专一性差的缺点。目前光谱法主要应用于植物激素的定性分析,在定量分析上存在很大不足。在以上光谱法的基础上,新的光谱检测方法应运而生。米娟等<sup>[48]</sup>在多聚磷酸(Polyphosphoric Acid, PPA)介质中,发现IAA对高良姜素-高锰酸钾体系的发光有很强的增敏作用,据此建立了固相萃取-流动注射化学荧光检测IAA的新方法。但是,荧光法对荧光试剂的纯度和实验过程要求严格,而且测定结果准确性不高<sup>[11]</sup>。

毛细管电泳色谱(Capillary Electrophoresis, CEC)结合了毛细管电泳(Capillary Electrophoresis, CE)的高效性和液相色谱(Liquid Chromatography, LC)高选择性的优点,近年来在植物激素检测上发展迅速。为了提高CEC方法的选择性和灵敏度,毛细管电泳-激光诱导荧光检测(Capillary Electrophoresis-Laser Induced Fluorescence, CE-LIF)被开发用于同时测定单个或多个植物激

素。Chen等<sup>[49]</sup>首先使用6-氧-(乙酰哌嗪)荧光素衍生处理香蕉样品,再经CE-LIF检测含羧基的植物激素(GA、IAA、ABA、JA、IBA和1-NAA),检出限为1.6–6.7 nmol/L。与毛细管电泳色谱-紫外(CEC-UV)和CEC-LIT方法相比,毛细管电泳色谱-质谱(CEC-MS)在植物激素分析中具有更高的选择性和灵敏度。由于进样量有限,即便采用高灵敏度的质谱作为检测器,CEC分析植物激素的灵敏度依然较低,同时CEC法用于植物激素检测的研究刚刚起步,因此限制了CEC对藻液中植物激素的分析。

高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)因其不受样品挥发性的限制,减少了衍生化过程中目标物的损失,同时提供更高的灵敏度和更低的检出限,成为检测植物激素的热门方法。液相色谱包括毛细管液相色谱(Capillary Liquid Chromatography, CLC)、纳流液相色谱(Nanoflow Liquid Chromatography, NLC)和UPLC<sup>[50]</sup>,UPLC因其高分离度、高灵敏度和快速分析,在检测植物激素上备受关注。HPLC还包括离子交换色谱(Ion Exchange Chromatography, IEC)、亲水作用色谱(Hydrophilic Interaction Chromatography, HILIC)等。但是单用HPLC方法检测植物激素易受基质效应干扰,影响检测结果,不能满足从藻液中甄别植物激素的要求。因此液相色谱与检测灵敏更高的质谱联用技术是目前应用最广泛的检测多类植物激素的分析方法<sup>[51]</sup>。

液相色谱联用质谱技术逐渐成为了植物激素检测的主要技术手段,其中包括液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-二级质谱法(LC-MS/MS)、超高效液相色谱-二级质谱法(UPLC-MS/MS)等。MS在高真空状态下使被测物质在离子源中发生电离,生成不同质荷比( $m/z$ )的离子,在加速电场和磁场作用下,通过质谱分析器获得离子的质荷比。质量分析器包括离子阱质量分析器(IT)<sup>[52]</sup>、四极杆质量分析器(Q)<sup>[24]</sup>、飞行时间质量分析器(TOF)<sup>[53]</sup>。Chen等<sup>[54]</sup>使用液相色谱-三重四级杆质



谱法(LC-TQMS)检测水稻叶片中 7 种酸性植物激素 GA<sub>3</sub>、IAA、ABA、JA、IBA、NAA 和 2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 2,4-D)的含量,检出限为 1.05–122.4 pg/mL。飞行时间质谱(TOF-MS)与 LC 结合可以甄别手性植物激素,以探究手性异构体在微藻生长、发育和对非生物胁迫中的分子机制。Han 等<sup>[55]</sup>首先以 4-甲基苯甲酸酯作为手性固定相,再经液相色谱-四极杆飞行时间质谱法(NPLC-QTOF-MS)检测,成功甄别 4 种 JA 立体异构体: (-)-JA、(+)-(3S,7S)-JA[(+)-JA]、(-)-(3S,7R)-JA[(-)-epi-JA] 和 (+)-(3R,7S)-JA[(+)-epi-JA],检出限为 0.5 ng/mL。可见液相色谱串联质谱是一种高性能检测植物激素的方法。与全扫描 MS 模式相比,选择反应检测(Selected Reaction Monitoring, SRM)、单离子检测(Single Ion Monitoring, SIR)以及多反应检测(Multiple Reaction Monitoring, MRM)模式各有优势。其中 MRM 模式对于大多数小分子植物激素具有良好的选择性,即使在复杂或基质干扰大的藻液中都可排除干扰, Pan 等采用液相色谱串联三重四级杆质谱,在 MRM 模式下对拟南芥组织中的生长素、CTK、ABA、GA 和 JA 植物激素进行定量分析,检出限在 0.01–0.1 ng/mL 之间<sup>[56]</sup>。液相色谱法及其相关的方法在未来微藻胞间植物激素的检测领域有巨大的发展空间。

在现代仪器方法中,除了上述的 3 类方法之外,电化学分析法和生物传感器方法在检测植物激素方面都得到了一定的运用。郭志慧等<sup>[57]</sup>以 KT 对纳米管电极上物质的光信号有增强的作用,建立了一种电化学发光的检测技术,该方法的检出限为 0.2 ng/L。李春香等<sup>[58]</sup>在绿豆芽叶片上研制了 IAA 生物传感器,通过循环伏安法检测 IAA 的含量,方法检出限为 4.2 μg/mL。随着现代仪器方法的不断发展,会出现更多优良的检测手段并更好地运用在微藻胞间植物激素的分析检测中。

## 3.2 藻间植物激素甄别的瓶颈问题

### 3.2.1 藻间植物激素提取的瓶颈问题

植物激素含量极低、基质效应复杂、化学特

性不同这些因素极大地影响了甄别微藻胞间植物激素分析结果的准确性,是有效分析微藻胞间植物激素的主要障碍。微藻胞间植物激素含量通常为 ng/g 或 pg/g 水平,因此植物激素甄别受到提取效率的限制<sup>[59]</sup>。同时,基质效应对分析微藻胞间植物激素通讯网络的过程有显著干扰,容易造成分析结果的假阳性。除了以上因素外,植物激素化学特性的复杂性,使多类植物激素同时提取面临困境。

### 3.2.2 藻间植物激素检测的瓶颈问题

同分异构体的存在使甄别微藻胞间植物激素需要高灵敏度的检测技术。生物鉴定法、色谱法、酶联免疫法和放射免疫法各有优点,但都不能甄别植物激素同分异构体。

超高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)联用技术适用于极性、热不稳定、难气化物质的分析,同时也适用于同分异构体的分离检测<sup>[60]</sup>,利用超高效液相色谱-多级串联质谱法(UPLC-MS<sub>n</sub>)可区分微藻胞内不同结构的植物激素<sup>[61–62]</sup>。目前应用最为广泛的检测手段是 LC-MS/MS 法,该方法具有灵敏度高、重现性好和定量准确等优势,但是对于未知化学物质(无标准样品)的检测具有一定的局限性,一般需要用植物激素的标准样品建立 MRM 方法后才能进行准确的定性、定量分析。因这一特性,使得 LC-MS/MS 在实际样品中检测种类纷杂的植物激素时,需要花费大量的投资和建立方法。

## 3.3 微藻产生植物激素检测方法的展望

线性离子阱-静电场轨道阱(LTQ-Orbitrap)高分辨质谱仪是新兴的一种组合式高分辨质谱仪,其分辨率可高达 100 000,高质量精度偏差在 2 μg/L 以内,在全扫描模式下仍具有很好的灵敏度(可达皮克水平)。利用筛查式的检测大大缩短了 MRM 模式的工作量,并且缩小了目标范围。高分辨质谱仪由进样系统、离子源、离子透镜系统、质量分析器、检测器、数据系统以及真空系统组成。高分辨质谱分析基本原理是样品通过进样系统引入离子源,在离子源完成离子化,形成带电离

子, 经过离子传输装置的聚焦、传输以及加速等过程, 进入到质谱分析器中, 将不同质荷比的离子分离并被检测器检测, 经过信号的放大、数据系统的采集和分析处理, 得到质谱图信息<sup>[54]</sup>。Orbitrap 的分辨率与采集时间成正比, 即采集时间越长, 分辨率越高。0.4 s 的采集时间可提供 30 000 的质量分辨率, 即在 10 s 基线处的宽度峰上转化为大约 25 个数据点<sup>[63]</sup>。高分辨质谱的高质量准确度为化合物的靶向分析提供了可能性, 使用选择性质荷比可更有效地区分已知化合物的定量差异<sup>[64]</sup>。利用 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 质谱技术, 在 Full MS/dd-MS<sub>2</sub> 扫描模式下采集质谱数据, 同时将已知植物激素特征断裂碎片应用于实际样品定向筛查技术中, 可实现植物激素的快速、定向筛查, 为全面有效地鉴定液体体系中的植物激素提供了技术保障, 从而对理解细菌的群体感应、揭示细菌种群生态的调控机理奠定基础。

## 4 微藻产生植物激素的生态学意义与展望

### 4.1 微藻产生植物激素的生态学意义

在自然界中发现的微藻很少有足够的生物量、含油量和环境耐受性来维持具有成本竞争力的生产。微藻产生植物激素除促进生长和增加脂质外<sup>[16,19]</sup>, 还能提高微藻中糖类、可溶性蛋白、油脂和胞内脂肪酸的含量<sup>[22-23]</sup>。因此, 微藻被认为是生物燃料的潜在原料, 是应对能源危机和发展绿色环保产业的潜在对象。人们可以利用外源植物激素促进微藻油脂含量或者生物量的增长<sup>[65]</sup>, 提高生物柴油的制备从而解决能源危机, 收割藻体制备水产饲料用于鱼虾的饲养、打造生态渔业等。研究表明, 植物激素的产生与环境因素(如温度、盐、pH 值、氮、磷、碳等)直接相关<sup>[66-67]</sup>, 同时两者之间存在间接关联<sup>[68]</sup>, 如微藻爆发性生长造成的水华现象有可能由植物激素造成。从植物激素诱导胞间通讯原理出发, 加入植物激素淬灭剂形成群体淬灭的效果, 是治理或预防水华的有效途径<sup>[4]</sup>。

目前对微藻中植物激素代谢和作用机制的调控还处于起步阶段, 以往的实验主要集中在外源添加上。例如, 含有多种植物激素的海藻提取物被用作生物刺激剂, 以促进高等植物的生长, 减少非生物和生物胁迫<sup>[69]</sup>。然而, 已有一些报道证实了外源植物激素如生长素、GAs、ABA 和 CKs 对藻类生长<sup>[70]</sup>或对微藻细胞应激反应(可溶性糖、脂类、脂肪酸、油脂、粗多糖的变化)<sup>[61,71]</sup>的影响。通过建立的高等植物植物激素检测方法, 如利用超高效液相串联多级质谱法(UPLC-MS<sub>n</sub>)<sup>[72]</sup>分离检测微藻中 5 种细胞分裂素(cZT、tZT、ZR、DHZR 和玉米蛋白- $\alpha$ -葡萄糖苷)。截至目前, 人们对植物激素在微藻中的作用知之甚少, 需要进一步对微藻内源性植物激素进行研究。参考高等植物激素甄别、路径传导、作用机制等方面取得的科研进展和方式经验, 为微藻胞间植物激素相关研究提供了值得借鉴的工作思路。

### 4.2 藻间植物激素研究展望

随着微藻中植物激素研究的深入, 仍有很多问题值得进一步深入: (1) 开发和建立有效萃取及检测微藻胞间植物激素的方法, 探明微藻胞间通讯的藻际微生物生态机制, 揭示微藻胞间植物激素的分子水平及其生理生态调节作用, 对提高微藻培养工艺中微藻产量和水华预防与控制等具有重要意义。(2) 深入研究功能性植物激素对微藻合成生物质资源的分子生物学机制, 利用多组学(如转录组、蛋白质组、代谢组、相互作用组)联合手段, 系统研究植物激素刺激下微藻细胞代谢过程的响应和调控机制。这是基于代谢工程和生物合成调控生物质资源生产的契机。(3) 植物激素调节, 辅助微藻菌种筛选、微藻基因工程、光生反应器的设计、微藻分离回收以及后续油脂提取纯化等工艺优化, 构建微藻生物经济产业链, 以推动低碳绿色生态化产业化。

## REFERENCES

- [1] Liu Y, Fang XA, Chen GS, Ye YX, Xu JQ, Ouyang GF, Zhu F. Recent development in sample preparation techniques for plant hormone analysis[J]. TrAC Trends in Analytical

- Chemistry, 2019, 113: 224-233
- [2] Romanenko KO, Kosakovskaya IV, Romanenko PO. Phytohormones of microalgae: biological role and involvement in the regulation of physiological processes. Pt II. Cytokinins and gibberellins[J]. International Journal on Algae, 2016, 18(2): 179-201
  - [3] Mutale-Joan C, Redouane B, Najib E, Yassine K, Lyamlouli K, Laila S, Zeroual Y, Hicham EA. Screening of microalgae liquid extracts for their bio stimulant properties on plant growth, nutrient uptake and metabolite profile of *Solanum lycopersicum* L.[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 2820-2832
  - [4] Salama ES, Hwang JH, El-Dalatony MM, Kurade MB, Kabra AN, Abou-Shanab RAI, Kim KH, Yang IS, Govindwar SP, Kim S, et al. Enhancement of microalgal growth and biocomponent-based transformations for improved biofuel recovery: a review[J]. Bioresource Technology, 2018, 258: 365-375
  - [5] Zhou DD, Zhang CF, Fu L, Xu L, Cui XC, Li QC, Crittenden JC. Responses of the microalga *Chlorophyta* sp. to bacterial quorum sensing molecules (*N*-acylhomoserine lactones): aromatic protein-induced self-aggregation[J]. Environmental Science & Technology, 2017, 51(6): 3490-3498
  - [6] Fu L, Yan G, Li YB, Li QC, Zhou DD. Phosphorus supply via a fed-batch strategy improves lipid heterotrophic production of *Chlorella regularis*[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(25): 31677-31685
  - [7] Fu L, Cui XC, Li YB, Xu L, Zhang CF, Xiong RH, Zhou DD, Crittenden JC. Excessive phosphorus enhances *Chlorella regularis* lipid production under nitrogen starvation stress during glucose heterotrophic cultivation[J]. Chemical Engineering Journal, 2017, 330: 566-572
  - [8] Zhang CF, Li QC, Fu L, Zhou DD, Crittenden JC. Quorum sensing molecules in activated sludge could trigger microalgae lipid synthesis[J]. Bioresource Technology, 2018, 263: 576-582
  - [9] Hagen G. Auxin signal transduction[J]. Essays in Biochemistry, 2015, 58: 1-12
  - [10] Van Overbeek J. Auxin in marine algae[J]. Plant Physiology, 1940, 15(2): 291-299
  - [11] Duan N, Jia YK, Xu J, Chen HL, Sun P. Research progress on plant endogenous hormones[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(2): 159-165 (in Chinese)  
段娜, 贾玉奎, 徐军, 陈海玲, 孙鹏. 植物内源激素研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(2): 159-165
  - [12] Naseem M, Othman EM, Fathy M, Lqbal J, Howari FM, Remeithi FA, Kodandaraman G, Stopper H, Bencurova E, Vlachakis D, et al. Integrated structural and functional analysis of the protective effects of kinetin against oxidative stress in mammalian cellular systems[J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-10
  - [13] Kadlecová A, Maková B, Artal-Sanz M, Strnad M, Voller J. The plant hormone kinetin in disease therapy and healthy aging[J]. Ageing Research Reviews, 2019, 55: 100958
  - [14] Wybouw B, De Rybel B. Cytokinin: a developing story[J]. Trends in Plant Science, 2019, 24(2): 177-185
  - [15] Poudel AN, Holtsclaw RE, Kimberlin A, Sen S, Zeng S, Joshi T, Lei ZT, Sumner LW, Singh K, Matsuura H, et al. 12-Hydroxy-jasmonoyl-L-isoleucine is an active jasmonate that signals through CORONATINE INSENSITIVE 1 and contributes to the wound response in arabidopsis[J]. Plant and Cell Physiology, 2019, 60(10): 2152-2166
  - [16] Kozlova TA, Hardy BP, Krishna P, Levin DB. Effect of phytohormones on growth and accumulation of pigments and fatty acids in the microalgae *Scenedesmus quadricauda*[J]. Algal Research, 2017, 27: 325-334
  - [17] Kokkiligadda S, Pandey B, Ronda SR. Effect of plant growth regulators on production of alpha-linolenic acid from microalgae *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Sadhana-Academy Proceedings in Engineering Sciences, 2017, 42(10): 1821-1824
  - [18] Li QC, Fu L, Wang Y, Zhou DD, Rittmann BE. Excessive phosphorus caused inhibition and cell damage during heterotrophic growth of *Chlorella regularis*[J]. Bioresource Technology, 2018, 268: 266-270
  - [19] Sulochana SB, Arumugam M. Influence of abscisic acid on growth, biomass and lipid yield of *Scenedesmus quadricauda* under nitrogen starved condition[J]. Bioresource Technology, 2016, 213: 198-203
  - [20] Li QC. Effects of phosphates on the growth of microalgae and intercellular effects induced by phosphates[D]. Changchun: Master's Thesis of Northeast Normal University, 2019 (in Chinese)  
李倾城. 磷酸盐对微藻生长的影响机制及其诱导下的胞间作用[D]. 长春: 东北师范大学硕士学位论文, 2019
  - [21] Lu YD, Tarkowská D, Turečková V, Luo TW, Xin Y, Li J, Wang QT, Jiao NZ, Strnad M, Xu J. Antagonistic roles of abscisic acid and cytokinin during response to nitrogen depletion in oleaginous microalga *Nannochloropsis oceanica* expand the evolutionary breadth of phytohormone function[J]. The Plant Journal, 2014, 80(1): 52-68
  - [22] Zhao YT, Li DF, Xu JW, Zhao P, Li T, Ma HX, Yu XY. Melatonin enhances lipid production in *Monoraphidium* sp. QLY-1 under nitrogen deficiency conditions via a multi-level mechanism[J]. Bioresource Technology, 2018, 259: 46-53
  - [23] Hua K. Effects of hormone-like substance on the culture of *Chlorella*[D]. Beijing: Master's Thesis of Beijing University of Chemical Technology, 2015 (in Chinese)  
花凯. 激素类物质对小球藻培养的影响研究[D]. 北京: 北京化工大学硕士学位论文, 2015
  - [24] Luo XT, Cai BD, Yu L, Ding J, Feng YQ. Sensitive

- determination of brassinosteroids by solid phase boronate affinity labeling coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1546: 10-17
- [25] Eggert K, Von Wirén N. Response of the plant hormone network to boron deficiency[J]. *The New Phytologist*, 2017, 216(3): 868-881
- [26] Liu YY, Wei JH, Zhang Y, Yuan SK. Determination of penoxsulam and metamifop in water by ultra performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2018, 39(5): 51-55 (in Chinese)  
刘雁雨, 魏京华, 张燕, 袁善奎. 超高效液相色谱—串联质谱法同时检测水中五氟磺草胺和噁唑酰草胺[J]. *农药科学与管理*, 2018, 39(5): 51-55
- [27] Delatorre C, Rodríguez A, Rodríguez L, Majada JP, Ordás RJ, Feito I. Hormonal profiling: development of a simple method to extract and quantify phytohormones in complex matrices by UHPLC-MS/MS[J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1040: 239-249
- [28] Reyes-garcés N, Gionfriddo E. Recent developments and applications of solid phase microextraction as a sample preparation approach for mass-spectrometry-based metabolomics and lipidomics[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2019, 113: 172-181
- [29] Cao ZY, Sun LH, Mou RX, Zhang LP, Lin XY, Zhu ZW, Chen MX. Profiling of phytohormones and their major metabolites in rice using binary solid-phase extraction and liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1451: 67-74
- [30] Bai Y, Zhang JL, Bai Y, Liu HW. Direct analysis in real time mass spectrometry combined with single-drop liquid-liquid-liquid microextraction for the rapid analysis of multiple phytohormones in fruit juice[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403(8): 2307-2314
- [31] Aresta A, Zamboni C. Simultaneous determination of salicylic, 3-methyl salicylic, 4-methyl salicylic, acetylsalicylic and benzoic acids in fruit, vegetables and derived beverages by SPME-LC-UV/DAD[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 121: 63-68
- [32] Wang X, Ma Q, Li M, Chang CL, Bai Y, Feng YQ, Liu HW. Automated and sensitive analysis of 28-epihomobrassinolide in *Arabidopsis thaliana* by on-line polymer monolith microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1317: 121-128
- [33] Ding J, Wu JH, Liu JF, Yuan BF, Feng YQ. Improved methodology for assaying brassinosteroids in plant tissues using magnetic hydrophilic material for both extraction and derivatization[J]. *Plant Methods*, 2014, 10(1): 1-11
- [34] Cai WJ, Yu L, Wang W, Sun MX, Feng YQ. Simultaneous determination of multiclass phytohormones in submilligram plant samples by one-pot multifunctional derivatization-assisted liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2019, 91(5): 3492-3499
- [35] Hao YH, Zhang Z, Wang L, Liu C, Lei AW, Yuan BF, Feng YQ. Stable isotope labeling assisted liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry for quantitative analysis of endogenous gibberellins[J]. *Talanta*, 2015, 144: 341-348
- [36] Cai XL, Shao MW, Sun X, Xu NJ. Detection of multiple phytohormones by GC-MS technique in *Gracilaria lemaneiformis* and the response to nitrogen stresses[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2011, 42(6): 753-758 (in Chinese)  
蔡西栗, 邵旻玮, 孙雪, 徐年军. 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[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(6): 753-758
- [37] Gupta V, Kumar M, Brahmabhatt H, Reddy CRK, Seth A, Jha B. Simultaneous determination of different endogenous plant growth regulators in common green seaweeds using dispersive liquid-liquid microextraction method[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2011, 49(11): 1259-1263
- [38] Lu QM, Chen LH, Lu MH, Chen GN, Zhang L. Extraction and analysis of auxins in plants using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(5): 2763-2770
- [39] Li Y, Zhou CX, Yan XJ, Zhang JR, Xu JL. Simultaneous analysis of ten phytohormones in *Sargassum horneri* by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 2016, 39(10): 1804-1813
- [40] Yalçın S, Okudan EŞ, Karakaş Ö, Önem AN, Başkan KS. Identification and quantification of some phytohormones in seaweeds using UPLC-MS/MS[J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2019, 42(15/16): 475-484
- [41] Cui KY, Lin YY, Zhou X, Li SC, Liu H, Zeng F, Zhu F, Ouyang GF, Zeng ZX. Comparison of sample pretreatment methods for the determination of multiple phytohormones in plant samples by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. *Microchemical Journal*, 2015, 121: 25-31
- [42] Wen J, Kong WJ, Luo HM, Wang J, Yang MH. Progress in detection of plant endogenous hormones[J]. *Central South Pharmacy*, 2014, 12(1): 47-52 (in Chinese)  
文静, 孔维军, 罗红梅, 王建, 杨美华. 植物内源激素检测方法新进展[J]. *中南药学*, 2014, 12(1): 47-52
- [43] Dierckx S, Van Puyvelde S, Venken L, Eberle W,

- Vanderleyden J. Design and construction of a whole cell bacterial 4-hydroxyphenylacetic acid and 2-phenylacetic acid bioassay[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3: 88-96
- [44] Porfirio S, Da Silva Mdr, Peixe A, Cabrita MJ, Azadi P. Current analytical methods for plant auxin quantification: A review[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 902: 8-21
- [45] Li Wei, Xiao Langtao. Research of optimization of ABA determination conditions of a new amperometric immunosensor[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2008(3): 186-189 (in Chinese)  
李巍, 萧浪涛. 一种新型电流型免疫传感器的 ABA 最优测定条件研究[J]. *生物技术通报*, 2008(3): 186-189
- [46] Oklestkova J, Tarkowská D, Eyer L, Elbert T, Marek A, Smržová Z, Novák O, Fránek M, Zhabinskii VN, Strnad M. Immunoaffinity chromatography combined with tandem mass spectrometry: a new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroid plant hormones[J]. *Talanta*, 2017, 170: 432-440
- [47] Popa C. Ethylene measurements from sweet fruits flowers using photoacoustic spectroscopy[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1144-1154
- [48] Ding GW, Li H, He Q. Progress in study of endogenous hormones detection methods in plant[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(5): 1258-1265 (in Chinese)  
丁广文, 李华, 何桥. 植物内源激素检测技术的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(5): 1258-1265
- [49] Chen H, Guo XF, Zhang HS, Wang H. Simultaneous determination of phytohormones containing carboxyl in crude extracts of fruit samples based on chemical derivatization by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2011, 879(20): 1802-1808
- [50] Nahar L, Onder A, Sarker SD. A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010-2019)[J]. *Phytochemical Analysis*, 2020, 31(4): 413-457
- [51] Dasharath PO, Kaushik B. Multiresidue analysis of plant growth regulators in grapes by triple quadrupole and quadrupole-time of flight-based liquid chromatography/mass spectrometry[J]. *Journal of AOAC International*, 2011, 6(94): 1715-1721
- [52] Lu QM, Zhang WM, Gao J, Lu MH, Zhang L, Li JR. Simultaneous determination of plant hormones in peach based on dispersive liquid-liquid microextraction coupled with liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B*, 2015, 992: 8-13
- [53] Montero R, Abad-García B, Garate J, Martín-Saiz L, Barceló-Coblijn G, Fernández JA. Improving spatial resolution of a LTQ orbitrap MALDI source[J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2020, 31(8): 1755-1758
- [54] Chen ML, Fu XM, Liu JQ, Ye TT, Hou SY, Huang YQ, Yuan BF, Wu Y, Feng YQ. Highly sensitive and quantitative profiling of acidic phytohormones using derivatization approach coupled with nano-LC-ESI-Q-TOF-MS analysis[J]. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, 905: 67-74
- [55] Han Y, Zhou Z, Wu H, Nie HG, Lei R, Bai Y, Liu HW. Simultaneous determination of jasmonic acid epimers as phytohormones by chiral liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry and their epimerization study[J]. *Journal of Chromatography A*, 2012, 1235: 125-131
- [56] Pan X, Welti R, Wang X. Simultaneous quantification of major phytohormones and related compounds in crude plant extracts by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Phytochemistry*, 2008, 69(8): 1773-1781
- [57] Guo ZH, Tang LJ, Zhang ZJ. Electrochemiluminescence determination of kinetin with carbon Nanotube/Nafion-Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup> modified electrode[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2009, 37(1): 13-18 (in Chinese)  
郭志慧, 唐隆健, 章竹君. 碳纳米管/Nafion-吡啶钌修饰电极电化学发光法测定激动素[J]. *分析化学*, 2009, 37(1): 13-18
- [58] Li CX, Li J, Xiao LT, Shen GL, Yu RQ. Study on the electrochemical biosensor for photohormone indole 3-acetic acid[J]. *Journal of Analytical Science*, 2003, 19(3): 205-208 (in Chinese)  
李春香, 李劲, 萧浪涛, 沈国励, 俞汝勤. 植物激素吲哚乙酸电化学生物传感器的研究[J]. *分析科学学报*, 2003, 19(3): 205-208
- [59] Rodrigues AM, António C. Standard key steps in mass spectrometry-based plant metabolomics experiments: instrument performance and analytical method validation[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2018, 1778: 19-31
- [60] Song XY, Ha W, Chen J, Shi YP. Application of  $\beta$ -cyclodextrin-modified, carbon nanotube-reinforced hollow fiber to solid-phase microextraction of plant hormones[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1374: 23-30
- [61] Danezis GP, Anagnostopoulos CJ, Liapis K, Kopparis MA. Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography-MS/MS in various food matrices[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2016, 942(26): 121-138
- [62] Yi Y, Tang X, Lin XH, Liu YS, Lin L, Xu CA. Simultaneous determination of 4 kind of plant hormones in sargassum by

- ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2016, 44(1): 124-130 (in Chinese)
- 易勇, 唐旭, 林锡煌, 刘源森, 林凌, 徐长安. 超高效液相色谱串联质谱法同时测定马尾藻中 4 种内源性植物激素[J]. 分析化学, 2016, 44(1): 124-130
- [63] Muntel J, Xuan Y, Berger ST, Reiter L, Bachur R, Kentsis A, Steen H. Advancing urinary protein biomarker discovery by data-independent acquisition on a quadrupole-orbitrap mass spectrometer[J]. Journal of Proteome Research, 2015, 14(11): 4752-4762
- [64] Zhao KX, Chai MJ, Song X, Liu Y, Ge BK. Determination of antihypertensive drugs in health food by liquid chromatography-quadrupole-orbitrap high resolution mass spectrometry[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2019, 10(11): 3481-3487 (in Chinese)
- 赵孔祥, 柴铭骏, 宋旭, 刘旸, 葛宝坤. 液相色谱-四级杆-静电轨道阱高分辨质谱法测定保健食品中降压类药物[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(11): 3481-3487
- [65] Hossain N, Mahlia TMI, Saidur R. Latest development in microalgae-biofuel production with nano-additives[J]. Biotechnology for Biofuels, 2019, 12(1): 125-141
- [66] Zhao YT, Wang HP, Han BY, Yu XY. Coupling of abiotic stresses and phytohormones for the production of lipids and high-value by-products by microalgae: a review[J]. Bioresource Technology, 2019, 274: 549-556
- [67] Suzuki N. Hormone signaling pathways under stress combinations[J]. Plant Signaling & Behavior, 2016, 11(11): 459-476
- [68] González-Garcinuño Á, Sánchez-Álvarez JM, Galán MA, Del Valle EMM. Understanding and optimizing the addition of phytohormones in the culture of microalgae for lipid production[J]. Biotechnology Progress, 2016, 32(5): 1203-1211
- [69] Gimpel JA, Henríquez V, Mayfield SP. In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 1376-1390
- [70] Sharma S, Kaur M. Plant hormones synthesized by microorganisms and their role in biofertilizer: a review article[J]. International Journal of Advanced Research, 2017, 5(12): 1753-1763
- [71] Yu XJ, Sun J, Sun YQ, Zheng JY, Wang Z. Metabolomics analysis of phytohormone gibberellin improving lipid and DHA accumulation in *Aurantiochytrium* sp.[J]. Biochemical Engineering Journal, 2016, 112: 258-268
- [72] Žižková E, Kubeš M, Dobrev PI, Příbyl P, Šimura J, Zahajská L, Drábková LZ, Novák O, Motyka V. Control of cytokinin and auxin homeostasis in cyanobacteria and algae[J]. Annals of Botany, 2017, 119(1): 151-166