《**植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 指示植物法**》

(征求意见稿)

编制说明

**一、任务来源**

本国家标准的制定任务列入国家标准化管理委员会2017年第三批国家标准制修订计划，项目编号“20171817-T-424”。本项任务由中国标准化研究院提出并归口，定于2019年完成。本标准起草工作组由中国计量大学等单位共同组成。

**二、标准制定目的及意义**

植物激素是植物细胞接受特定环境信号诱导产生的、低浓度时可调节植物生理反应的活性物质，因其在调节植物生长发育时表现出微量、精准的调控模式，因此陆续被开发为植物生长调节剂，其使用浓度低，效果好，在农业上应用十分广泛，统计表明我国农产品收益的相当比例来自于植物生长调节剂的正确合理使用。因此植物激素的研究一直受到科研领域、工业生产和农业应用收到密切关注。

植物激素种类繁多，国外针对植物激素活性研究继而开发的植物生长调节剂中有效成分多达100多种，且剂型丰富，而我国对植物激素类次生代谢产物研究起步较晚，总体处于跟跑阶段，且产品同质化严重，有效成分物质少，剂型单一、研制进度慢，田间复配药剂出现药害概率高等问题，缺乏核心竞争力。主要原因是其活性测定和功效评价缺乏统一的试验方法和标准，以植物激素类次生代谢物为主要活性成分的产品质量控制缺乏统一的标准和先进的技术等。因此，本课题拟在前期工作基础上，研究建立植物激素类活性物质的活性测定、功效评价技术等相关标准。研究结果将为以植物激素类次生代谢产物为主要活性成分的活性评价、产品研发和质量控制提供强大的技术保障，有效推动次生代谢物产业的发展。

植物体内产生的激素有五大类，即生长素、赤霉素、细胞分裂素、脱落酸和乙烯，存在多种具有类似生物活性的化合物，活性不一，其中吲哚乙酸（IAA）为主要的天然生长素，但是其极不稳定，从而通过人工合成了萘乙酸（NAA）、4-氯-IAA、5-羟-IAA等结构功能类似物，主要作用于于细胞的生长，特别是细胞的伸长；玉米素（ZT）是主要的天然细胞分裂素，主要作用于细胞分裂及分化，除玉米素外，植物中至今已发现了十几种具有类似生理活性的物质，以此为基础，人工合成开发了6-糠基氨基嘌呤、6-苄基氨基嘌呤等结构功能类似物；脱落酸（ABA）是主要的植物天然生长调节剂，主要导致休眠和促进脱落，天然活性脱落酸的提取成本较高，而传统的化学合成法生产的脱落酸不仅成本高，且生理活性与天然的存在显著差异，至今只有美国等发达国家应用于大规模农业生产；赤霉酸（GA3）是活性最高的天然赤霉素，可以加速细胞伸长，促进细胞扩大，大部分通过赤霉菌发酵液分离提取，至今已分离鉴定出近百种生理活性类似的物质。由于同类激素中存在多种结构类似物，且结构、生产方式或剂型等不同，其生理活性则会产生差异，因此植物激素的生理活性很单纯难以浓度、纯度等进行判定。而生理活性差异则会直接导致产品质量参差不齐，使用效果不一。因此，对产品的生理活性进行测定评价是控制产品质量、保障使用效果的关键，也是促进新产品开发的基础。鉴于此，建立统一的生物活性评价标准具有重要意义，是植物生长调节激素类产品质量控制的保障，同时为新产品的开发鉴定提供标准指导。

鉴于产品使用效果的重要性，相关科研人员也从植物生长调节剂在促进或抑制植物生根、发芽、生长、开花、结果等方面展开了大量研究，国家也从农作物生长发育为出发点规定了植物生长调节剂用于调节小麦、水稻、棉花、玉米、黄瓜、番茄、葡萄、大豆生长以及在马铃薯抑芽调控，促进苹果着色、提高苹果果形指数、促进果树成花与坐果的田间药效小区试验的方法和基本要求，作为登记用的药效评价标准。而其余标准只规范了植物激素的测定方法，包括免疫法、薄层色谱、液相色谱等，都只能定量测定激素含量，而激素有效成分复杂，各成分间结构不同活性差异大，因此有必要制定统一的植物激素活性测定评价标准，以规范植物激素类产品的生产和使用，保障和促进该领域的健康发展。但是目前国内外均没有相关激素的活性检测标准。

**三、标准制定原则和依据**

本标准遵循GB/T1.1-2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》进行标准编写，标准内容参考了与植物激素活性检测相关问下，标准参照了 GB/T6379.1-2004《测量方法与结果的准确度（正确度与精密度）》第1部分总则与定义和 GB/T 6379.2-2004《测量方法与结果的准确度》第2部分确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法。

标准的制定过程中采用文献调查法、专家座谈法、科学试验法等多种研究方法，确保方法的科学先进，过程周密严谨，保障数据真实可信、结果明确。

本标准是为相关组织对提取或合成的植物激素类次生代谢产物进行活性检测提供技术支撑，考虑到科研、生产、监管等不同需求，在方法选择上，主要基于产业现状、现有成熟的技术以及试验结果验证基础确定的，因此实用性较强。

已知小麦胚芽鞘切段对生长素类活性物质具有特异性反应，细胞分裂素类物质特异性响应尾穗苋中苋红素的合成，赤霉素类活性物质能特异性激发大麦种子糊粉层中α-淀粉酶活性，因此早已开展了大量这些指示植物来评价各类激素活性的研究，但是由于对材料、方法缺乏统一的标准，且由于植物生长的特异性，批次间没有可比性，因此并没有达成共识；研究发现同一类激素不同结构的活性物质在同等质量或浓度条件下各物质的生物活性不同，因此激素活性不能由物质质量或浓度来直接衡量，但是同批次实验中，指示植物对同一类激素不同结构的活性物质浓度的响应具有一致性。本研究以此为理论基础，规范了指示植物材料的获取、测定方法要求等要素，同时以每类激素中活性高、稳定性强的天然活性物质或类似物为标准物，引入当量活性作为生物活性评价指标，即以单位浓度的植物激素类次生代谢产物与其相对应的标准物促进或抑制植物生长、发育与休眠能力的相对值来评价不同物质的活性。

**四、标准工作过程**

4.1、组成标准起草小组

根据国家标准制修订有关程序和要求，召开标准制定研讨会，组成了标准起草工作组，明确了任务要求，安排了工作进度，成立了标准起草工作小组，会议研究讨论了标准初稿，对起草小组在标准起草过程中的一些思考及难点问题进行了深刻讨论，各单位代表就标准内容及方法选择进行了讨论。

4.2、开展相关调研情况

该标准属于生物产业领域的标准，是支撑科研开发以及生产方、第三方组织开展产品评价的技术依据。起草工作小组首先针对科研、生产和检测开展了大量的调研工作。从满足实际检测需要出发，开展了国内外相关资料的收集和确认工作，资料的检索和信息的收集过程中，分析比较了大量的国内外文献方法。

4.3、标准起草完善过程

在广泛调查研究的基础上，标准起草单位组织相关技术人员对项目进行了预研，课题组成员广泛收集了国内外植物激素活性测定/评价的标准、文献，了解了国内外相关技术动态，并且明确了工作思路和进程安排，分析了通过前期的实验摸索、反复论证，确定了本标准方法设定的重要参数，开展了实际样品的检测。然后依据GB/T 1.1—2000《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则》、GB/T 1.2—2002《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容的确定方法》等标准编制要求，对本标准开展了起草工作。于2018年6月中旬，起草工作小组完成了《植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 指示植物法》国家标准（草案）。2018年12月，在杭州组织有关单位和专家分别召开了标准草案讨论会，重点对各个激素活性评价的重要指标选取提出了完善建议。同时对方法进行了验证，针对验证所出现的问题，在2019年2月22组织专家对标准逐字逐句进行了讨论完善，形成了《植物激素类次生代谢产物的生物活性测定 指示植物法》国家标准征求意见稿。

**五、主要技术内容**

**5.1、生长素测定**

5.1.1 小麦胚芽鞘切段获取过程和材料优化

理论研究发现小麦胚芽鞘切段对生长素类活性物质具有特异性反应，且在一定浓度范围内，小麦胚芽鞘切段伸长量与生长素活性成正比。因此选用小麦胚芽鞘切段作为试验材料。

实验过程中发现湿度、温度、萌发时间及内源生长素均会影响胚芽鞘生长及胚芽鞘切断的生长，干扰实验结果，因此我们对比了22℃、25℃、28℃三个温度下小麦的萌发情况，发现25℃萌发效果最好，且湿度越高，胚芽鞘伸长得越多，而光照会促进芽的生长从而为胚芽鞘的获取带来困难，为保障后续实验需求，我们需要足量胚芽鞘，经试验发现，当选用萌发率在90%以上的小麦种子萌发时，然后放置在底层铺有湿润滤纸的托盘上排列整齐，覆膜加盖后在无光照的生化培养箱中培养3天左右效果最好，可以获得满足单次试验用量的材料。

由于小麦胚芽鞘的伸长能力、整齐度等会干扰试验，不同小麦品种的胚芽鞘长度、弯曲度、发芽生长3天左右的整齐度不同，我们首先参考文献“72份冬小麦品种（系）胚芽鞘长度的聚类分析”，筛选出长胚芽鞘的品种（长麦6135、蓝糯0801和中优9944）以便增强处理效应，对这三个品种按上述条件培养3天后进行胚芽鞘长度观测，发现三者长度无显著差异，但是长麦6135（2.73±0.38 cm）的整齐度好于蓝糯0801（2.65±0.63 cm）和中优9944（2.79±0.58 cm），因此我们选择长麦6135作为试验材料的来源。

为进一步保障材料的统一性，减小材料个体差异带来的误差，我们选择长度近似的幼苗，经试验发现长度为25~30 mm的幼苗株其胚芽鞘长度比较合适，过长时胚芽鞘容易弯曲，过短则取胚芽鞘困难。依据文献报道，胚芽鞘顶端含有大量生长素类物质，因此，需从基部取下芽鞘，切去3~5 mm顶端，而胚芽鞘上半部分对生长素比较敏感，越靠近顶端伸长能力越强，考虑到可操作性，我们推荐切取接下来的约6 mm的切段作为试验材料。

我们对比了光照条件下准备材料、处理，以及切段的获取需在绿光暗室中进行。为除去材料中可能含有的本底生长素，需将6 mm切段放入盛有磷酸-柠檬酸缓冲液的大培养皿中以除去切段中的内源激素。为减少处理时间不同所带来的影响，鉴于1 h左右可以基本去除内源生长素，我们规定放进摇床摇1.5 h，每半小时换一次溶液，一定的转速可以使材料与缓冲液充分接触，便于内源生长素的渗出，而太高的转速会加大材料碰撞的概率，对材料有一定的伤害，经观察，80 r/min及以下的转速不会造成材料的剧烈碰撞。

为确定光照以及材料中含有的内源激素对试验的影响，我们切取60个胚芽鞘，15个为一组，分别经0.5 h、1 h、1.5 h和2 h的磷酸-柠檬酸缓冲液洗涤后加入磷酸-柠檬酸缓冲液培养24 h，按胚芽鞘长度测量方法测定胚芽鞘的实际伸长长度ΔL，结果发现1.5 h（1689±123 μm）和2 h（1702±145 μm）处理后的ΔL显著小于处理0.5 h（2314±746 μm）和1 h（2164±437 μm）的实验组，且两者间数值和稳定性均无显著差异，而光照条件下培养则个体间伸长长度的差异显著增加（1746±527 μm）。一定的转速可以使材料与缓冲液充分接触，便于内源生长素的渗出，而太高的转速会加大材料与容器碰撞的概率，对材料有一定的伤害，经观察，小于80 r/min的转速即可，因此建议全程无光照，且将试验材料放入盛有磷酸-柠檬酸缓冲液的大培养皿中，置于摇床中摇1.5 h（≤80 r/min），每半小时换一次溶液，以除去内源生长素。

5.1.2 胚芽鞘长度测量过程及条件优化

为减小实验材料的个体差异带来的影响，我们选取单个胚芽鞘作为一个试验单元，分别放置到冷冻盒的不同格子中，将该冷冻盒中的不同格子作为不同的试验重复，分别在每格底部标记（如1~16），由于生物材料差异大，我们试验发现15个以上重复才能获得满足分析需要的足量分析数据（取重复测试结果绝对差值不超过算术平均值的20%的至少5组数据），因此推荐使用16格的50 mL离心管的冷冻盒。

为了保障试验环境和措施对结果的影响，我们首先观测发现充足的空气有利于胚芽鞘的伸长生长，我们推荐每个格子加入5 mL的标准品工作液或试样溶液保障胚芽鞘能悬浮于处理溶液，同时留出足够大的空间。再者因为切段比较短，而且用器具固定会造成损伤，不适合用游标卡尺等长度测量工具，因此我们推荐使用体式显微镜下测量长度。此外，我们比较了10-5 mg/mL NAA处理12 h，24 h，36 h，48 h后胚芽鞘伸长量（ΔL）与对照处理的小麦胚芽鞘伸长量（ΔL0）的比值（ΔLn/ΔL0），由图1可知，24 h前生长素诱导使胚芽鞘伸长比较显著，因此我们推荐使用最适生长温度25℃的生化培养箱培养24 h为宜。

图1 10-5mg/mL NAA处理不同时间胚芽鞘伸长量ΔL与对照ΔL0的比值

5.1.3活性的计算方法及检出限

试验发现同一浓度梯度的NAA处理不同批次的胚芽鞘切段，其伸长量与对照的比值（ΔLn/ΔL0）不一致（图2A），因此无法单纯以胚芽鞘切段的伸长量来评价生长素的生理活性。且不同批次间，NAA在10-6~10-4 mg/mL范围内，小麦胚芽鞘切段伸长量（ΔL）与对照中小麦胚芽鞘伸长量（ΔL0）的比值（ΔLn/ΔL0）与NAA浓度的对数值均存在显著的线性关系（图2B），而同一批次小麦胚芽鞘切段用不同的生长素活性的激素处理后，浓度在10-6~10-4 mg/mL范围内，麦胚芽鞘切段伸长量（ΔL）与对照中小麦胚芽鞘伸长量（ΔL0）的比值（ΔLn/ΔL0）均与浓度成正比，且斜率无显著差异（图2C），说明单批次试验中小麦胚芽鞘切段对生长素活性物质浓度的响应具有一致性，而批次间胚芽鞘切段伸长量的差异可能和环境有关，因此我们引入当量的理念，用活性较高的生长素类标准物作为参照，计算与试样中有效成分对小麦胚芽鞘切段的伸长作用相当的标准物的量，作为试样中有效成分的生长素生物活性。

由图1A所知，天然活性的生长素IAA和稳定的IAA结构类似物NAA的活性无显著差异（图2A），但是IAA容易降解，不利于试验的稳定性，因此本实验采用NAA作为标准物来评价生长素类物质的生物活性。



图2不同浓度生长素处理后胚芽鞘伸长量ΔL与对照ΔL0的比值

5.1.4 试样的制备

由于检测对象包含商品化的植物生长调节剂或生产研发过程中的未知物质，存在液体、固体等多种状态，为了便于统一，我们将单位浓度（mg/mL）的有效物质或未知物质的生物活性来计算生长素活性。试验发现NAA浓度在10-8~10-3 mg/mL范围内，小麦胚芽鞘切段伸长与NAA浓度成正比，小于该浓度范围作用不明显，大于该浓度范围则浓度越高反而不利（见图2A），因此我们需要多个梯度的试样进行观测，以排除高浓度的干扰。同时多次试验验证，NAA浓度在10-6~10-4 mg/mL范围内，小麦胚芽鞘切段伸长量与NAA浓度存在显著的线性关系，因此建议试验样品进行10倍梯度稀释，并至少取3个稀释浓度以便观察数据变化趋势，保证至少有一个试样浓度在线性作用范围内。

**5.2、细胞分裂素测定**

5.2.1 尾穗苋幼苗获取过程和材料优化

研究表明：细胞分裂素类物质特异性响应尾穗苋中苋红素的合成。尾穗苋幼苗在光下能合成一种红色色素（苋红素），在暗中发芽的尾穗苋子叶不能合成苋红素，子叶呈白色。若供给细胞分裂素和酪氨酸，暗中萌发的尾穗苋子叶也能合成苋红素，且在一定浓度范围的细胞分裂素中，苋红素的合成量与细胞分裂素活性成线性关系。因此选用尾穗苋子叶作为试验材料。

尾穗苋颜色有红色、紫色、黄色、白色等，其中颜色的变化主要关系其苋红素合成能力，颜色越红苋红素含量越高，因此推荐使用红色品系的尾穗苋的种子。

进一步我们对实验环境及操作条件进行了考察，发现实验过程中湿度、温度及萌发时间均会影响种子萌发及子叶中苋红素的形成，干扰实验结果。首先我们试验了22℃、25℃、28℃三个温度下种子的萌发情况，发现25℃种子萌发率比22℃和28℃至少高5%，因此选择25℃条件每天观察种子萌发状态，发现萌发3天的子叶可满足试验要求，时间过短则子叶偏小或展开不充分，为缩短试验进程，我们推荐25℃萌发3天左右的黄化苗进行试验。其次非同一环境萌发的幼苗对后期结果的重复性影响较大，因此我们规定一个生物学重复的样品需来源于同一个培养环境，单次试验最少需300颗黄化苗，考虑到萌发率及其它因素的影响，约需400颗种子（大约2 g）。最后我们发现吸胀处理过久或萌发时湿度过大会产生偏红的子叶（非黄化苗），因此我们为了筛选合适的萌发湿度环境，将种子统一在铺有两层定性滤纸的18 cm大培养皿中，再往里面加入适量的水，在萌发3天时比较不同的水量及不同吸胀时间对种子萌发率、苗生长整齐度及非黄化苗产生率的影响（表1）。结果显示：当选用萌发率在90%以上的尾穗苋种子萌发时，2 g左右的尾穗苋种子在吸胀5 h后散铺放于两层消毒滤纸的18 cm大培养皿中，加入9 mL蒸馏水，25℃黑暗培养72 h发芽效果最好，可以获得足量符合实验要求的黄化苗。最后从中选取子叶大小均一的黄化幼苗作为试验材料，减少试验材料的误差。

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 表1 吸胀时间和发芽培养加水量对尾穗苋种子萌发状态的影响 | | | | | |
|  |  | 种子萌发率 | 生长整齐度 | 非黄化苗产生率 |
| 吸胀时间 （h） 培养皿中水量为9 mL | 3 | 87%±4% | 一般 | 1%以下 |
| 5 | 95%±2% | 好 | 1%以下 |
| 7 | 96%±3% | 好 | 20%以上 |
| 培养皿中加水量 （mL） 吸胀5 h时 | 7 | 75%±7% | 差 | 1%以下 |
| 9 | 95%±2% | 好 | 1%以下 |
| 11 | 97%±1% | 好 | 10%以上 |

5.2.2 苋红素浓度测量过程及条件优化

由于尾穗苋子叶小，单个子叶产生的苋红素在后续提取测量中存在困难，因此考虑将多个个体的子叶混合进行苋红素的提取，以此来减少试验过程误差及实验材料的个体差异带来的误差。由于后续处理过程中可能会出现少量生长缺陷或子叶对细胞分裂素反应不灵敏等情况的个体，因此我们推荐选取30株黄化苗进行处理，最终选取大小和颜色相对均一的40个子叶进行苋红素的测定。

同样，为减少湿度引起的本身子叶发红的影响，我们推荐使用两层滤纸的6 cm培养皿加入1 mL的处理溶液，使滤纸的湿润度与前面筛选用于发芽的湿润度一致。经25℃处理我们发现，24~48 h是苋红素合成的快速增长期，48 h后苋红素含量增加不明显，而由于生长空间的局限性，子叶生长状态会变差，因此我们推荐处理48 h后进行苋红素合成量的检测。

我们试验了冻融法、超声破碎法和震荡破碎法提取苋红素的效果，10-4 mg/mL ZT处理后，选取大小、颜色均一的子叶360个，随机分成9组，每组40个子叶，分别采用冻融法、超声破碎法和震荡破碎法提取苋红素，结果冻融法提取的三次值（OD534–OD650）分别为0.205、0.279、0.166，超声破碎法提取的三次值（OD534–OD650）分别为0.312、0.286、0.257，震荡破碎法提取的三次值（OD534–OD650）分别为0.279、0.265、0.287，结果表明震荡破碎法（0.277±0.011）和超声破碎法（0.285±0.028）提取量较冻融法（0.217±0.057）高，两者没有显著差异，但是超声破碎法提取的标准误大于震荡破碎法，因此鉴于方法的稳定性，我们推荐使用震荡破碎法。对震荡破碎条件进行摸索，我们发现加入适量（10~20颗）小直径的研磨珠可以促进细胞破碎；震荡时间过短或震荡频率过低会导致样品破碎不充分而震荡时间过长或震荡频率过高会导致样品过热，破坏苋红素，我们选择了30 Hz、40 Hz、50 Hz、60 Hz四个震荡频率以及破碎5 min、10 min、15 min三个时间，发现同样的频率下5 min即可满足要求，而50 Hz、60 Hz破碎后苋红素的含量高且无显著差异，即50 Hz，5 min可用于破碎细胞提取苋红素（表2）。根据文献报道，我们用紫外分光光度计在波长为534 nm和650 nm处分别读取光密度值OD534和OD650，记录相减的差数，即苋红素浓度的光密度值D（OD534–OD650）。

表2 不同的震荡频率和时间对尾穗苋提取的影响

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 时间  频率 （min）  （Hz） | 5 | 10 | 15 |
| 30 | 0.169±0.024c | 0.172±0.021c | 0.171±0.023c |
| 40 | 0.196±0.018b | 0.201±0.015b | 0.197±0.014b |
| 50 | 0.278±0.012a | 0.279±0.011a | 0.283±0.017a |
| 60 | 0.283±0.009a | 0.286±0.015a | 0.276±0.016a |

5.2.3活性的计算方法

试验发现同一浓度梯度的ZT处理不同批次的尾穗苋幼苗，苋红素合成量不一致（图3A），因此无法单纯以苋红素合成量来评价细胞分裂素的生理活性。且不同批次间，ZT浓度在10-5~10-3mg/mL范围内，处理的光密度值（D）与ZT浓度的对数值均存在显著的线性关系（图3B），而同一批次尾穗苋幼苗用不同细胞分裂素活性的激素处理后，浓度在10-5~10-3mg/mL范围内，处理的光密度值（D）与激素浓度的对数值均存在显著的线性关系，且斜率无显著差异（图3C），说明单批次试验中苋红素的合成对生长素活性物质浓度的响应具有一致性，而批次间的差异可能和环境有关，因此我们引入当量的理念，用活性较高的细胞分裂素类标准物作为参照，计算与试样中有效成分对苋红素的合成作用相当的标准物的量，作为试样中有效成分的细胞分裂素生物活性。







图3 不同浓度细胞分裂素处理后苋红素的合成量

试验中，我们选择了天然细胞分裂素（ZT）、人工合成的激动素（KT）、6-苄基氨基嘌呤（6-BA）进行测试比较，发现尾穗苋子叶中苋红素的合成对ZT更为敏感（图3C），因此本实验采用ZT作为标准物来评价细胞分裂素类物质的生物活性。

5.2.4 试样的制备

由于检测对象包含商品化的植物生长调节剂或生产研发过程中的未知物质，存在液体、固体等多种状态，为了便于统一，我们将单位浓度的有效物质或未知物质的生物活性来计算细胞分裂素活性。试验发现ZT浓度在10-5~10-2 mg/mL范围内，苋红素的合成量与ZT浓度成正比，小于该浓度范围作用不明显，大于该浓度范围则浓度越高反而不利（见图3A），因此我们需要多个梯度的试样进行观测，以排除高浓度的干扰。多次试验验证，ZT浓度在10-5~10-3 mg/mL范围内，苋红素的合成量与ZT浓度存在显著的线性关系，因此建议试验样品进行10倍梯度稀释，并至少取3个稀释浓度以便观察数据变化趋势，保证至少有一个试样浓度在线性作用范围内。

**5.3、赤霉素类物质生物活性的室内测定**

5.3.1 无胚大麦半粒种子获取过程和材料优化

赤霉素类活性物质能特异性激发大麦种子糊粉层中α-淀粉酶活性，α-淀粉酶释放不受植物天然提取物中其它非赤霉素类物质和溶剂中杂质的影响。大麦种子在吸水后从胚中产生赤霉素，去胚的大麦种子不能产生赤霉素，因此选用无胚的大麦半粒种子来作为试验材料。

由于不同小麦品种α-淀粉酶的活性不同，我们参考文献“中国大麦地方品种的α-淀粉酶酶活性研究”，选择α-淀粉酶活性较高的品种二棱大麦，以便增强处理效应。

实验过程中发现吸胀时间会影响α-淀粉酶活性，干扰实验结果，因此我们对比了大麦半胚在吸胀0 h、24 h、48 h、72 h后，经10-4mg/mL的GA3诱导后，按活性测定步骤测定指示α-淀粉酶活性的OD580值，结果发现吸胀48 h（1.891±0.158）和72 h（1.803±0.215）处理后的OD580显著高于不吸胀0 h（0.564±0.415）和吸胀24 h（1.359±0.314）的实验组，且吸胀48 h的结果更为稳定，因此推荐吸胀处理48 h。

为确定洗涤时间以减少材料中含有的内源激素对α-淀粉酶活性的激活作用，我们切取120个大麦无胚半粒种子，10个为一组，分别经0.5 h、1 h、1.5 h和2 h的洗涤后加入乙酸缓冲液震荡培养24 h，按活性测定步骤测定指示α-淀粉酶活性的OD580值，结果发现1.5 h（1.891±0.158）和2 h（1.903±0.145）处理后的OD580显著小于处理0.5 h（1.24±0.108）和1 h（1.591±0.213）的实验组，且两者间数值和稳定性均无显著差异，而一定的转速可以使材料与缓冲液充分接触，便于内源激素的渗出，而太高的转速会加大材料碰撞的概率，对材料有一定的伤害，经观察，大于50 r/min可以使离心管中的种子有一定的摆幅，而小于100 r/min的转速不会引起种子间剧烈碰撞，因此建议将吸胀48 h后的半粒种子放进50 mL离心管中，以50~100 r/min揺1.5 h，每0.5 h换一次水。

5.3.2 α-淀粉酶活性测量测量过程及条件优化

为减小实验材料的个体差异带来的影响，我们选取10个大麦无胚半粒种子作为一个试验单元。依据文献，采用碘能使淀粉变蓝的原理，我们用淀粉作为底物，用I2-KI溶液检测处理后淀粉的剩余量，来指示α-淀粉酶活性：活性越高，淀粉越少，则溶液呈现的蓝色越浅，在通过紫外分光光度计在波长为580 nm处检测得到的光密度值则越小。为了便于操作和标准化，我们对该检测体系中的量值进行了规定：从处理后的离心管中吸取上清液0.4 mL至新的10 mL离心管中，加入1.6 mL 0.1%淀粉溶液，混匀，30℃水浴10 min进行淀粉水解反应。再加入I2-KI溶液2 mL，蒸馏水定容至5 mL，充分摇匀（溶液呈蓝色），采用紫外分光光度计读取每管中溶液的OD580值。

5.3.3活性的计算方法及检出限

试验发现同一浓度GA3处理不同批次的大麦无胚乳半粒种子，α-淀粉酶活性不一致（图4A），因此无法单纯以α-淀粉酶活性来评价赤霉素的生理活性。且不同批次间，GA3浓度在10-5.5~10-3mg/mL范围内，处理的光密度OD580值与GA3浓度的对数值均存在显著的线性关系（图4B），而同一批次大麦无胚乳半粒种子用不同赤霉素活性的激素处理后，浓度在10-5~10-3mg/mL范围内，处理的光密度OD580值与激素浓度的对数值均存在显著的线性关系，且斜率无显著差异（图4C），说明单批次试验中α-淀粉酶活性对赤霉素类活性物质浓度的响应具有一致性，而批次间α-淀粉酶活性的差异可能和环境有关，因此我们引入当量的理念，用赤霉素类标准物作为参照，计算与试样中有效成分对α-淀粉酶活性作用相当的标准物的量，作为试样中有效成分的赤霉素生物活性。



图4不同浓度赤霉素处理后α-淀粉酶活性

试验中，我们选择了赤霉酸GA3，GA2，GA1来进行测试比较，发现α-淀粉酶活性对GA3更为敏感（图4C），因此本实验采用GA3作为标准物来评价生长素类物质的生物活性。

5.3.4 试样的制备

由于检测对象包含商品化的植物生长调节剂或生产研发过程中的未知物质，存在液体、固体等多种状态，为了便于统一，我们将单位浓度（mg/mL）的有效物质或未知物质的生物活性来计算赤霉素活性。试验发现GA3浓度在10-6~10-3 mg/mL范围内，α-淀粉酶活性与GA3浓度成正比，小于该浓度范围作用不明显，大于该浓度范围则浓度越高反而不利（见图4A），因此我们需要多个梯度的试样进行观测，以排除高浓度的干扰。同时多次试验验证，GA3浓度在10-5.5~10-3 mg/mL范围内，α-淀粉酶活性与GA3浓度存在显著的线性关系，因此建议试验样品进行10倍梯度稀释，并至少取3个稀释浓度以便观察数据变化趋势，保证至少有一个试样浓度在线性作用范围内。

六、**验证情况及结果分析**

三种激素活性测定的标准物线性浓度范围见下表3

表3 测定方法中所用标准物的线性浓度范围

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 序号 | 激素 | 可检测范围 |
| 1 | 生长素 | 10-6~10-4 mg/mL |
| 2 | 细胞分裂素 | 10-5~10-3 mg/mL |
| 3 | 赤霉素 | 10-5.5~10-3 mg/mL |

为了验证方法的重复性，每种激素选择了一种产品（生产厂家为四川润尔科技有限公司）分别委托杭州师范大学、浙江理工大学、浙江工商大学三家单位进行了验证，结果如下：

表4对氯苯氧乙酸钠（可溶性粉剂）的生长素活性测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 委托单位 | 杭州师范大学 | 浙江理工大学 | 浙江工商大学 | 标准研制单位 |
| 生长素活性  （单位：E） | 0.130  0.155 | 0.154  0.134 | 0.147  0.157 | 0.140  0.149 |
| 0.153 | 0.140 | 0.153 | 0.127 |
| 平均值 | 0.146±0.014 | 0.143±0.010 | 0.152±0.005 | 0.139±0.011 |

重复性低于25%。

表5氯吡脲（可溶液剂）的细胞分裂素活性测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 委托单位 | 杭州师范大学 | 浙江理工大学 | 浙江工商大学 | 标准研制单位 |
| 细胞分裂素活性  （单位：E） | 0.0183  0.0185 | 0.0179  0.0188 | 0.0159  0.0161 | 0.0169  0.0157 |
| 0.0178 | 0.0183 | 0.0165 | 0.0155 |
| 平均值 | 0.0182±0.0004 | 0.0183±0.0005 | 0.0162±0.0003 | 0.0160±0.0008 |

重复性低于20%。

表6 赤霉酸（可溶性粉剂）的赤霉素活性测定结果

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 委托单位 | 杭州师范大学 | 浙江理工大学 | 浙江工商大学 | 标准研制单位 |
| 赤霉素活性  （单位：E） | 0.809  0.743 | 0.761  0.735 | 0.741  0.852 | 0.757  0.687 |
| 0.813 | 0.759 | 0.848 | 0.756 |
| 平均值 | 0.788±0.039 | 0.752±0.014 | 0.814±0.063 | 0.733±0.040 |

重复性低于25%。

**七、与有关的现行法律、法规和强制性国家标准的关系**

本标准符合国家现行法律、法规、规章和强制性国家标准的要求。本标准的实施不涉及对现行标准的废止情况。

**八、标准属性的建议**

本标准为推荐性国家标准。

**九、贯彻国家标准的要求和措施建议**

标准发布实施后，建议由标准编制单位组织有关生产、检验、设计等单位进行宣传贯彻。

**十、其他应予说明的事项**

无其他事项说明。