

利用高效液相色谱筛选产植物激素细菌

连翠飞^{1,2}, 蒋继志¹, 李社增², 鹿秀云², 晁春燕¹, 马平²,

(1. 河北大学, 河北保定 071002; 2. 河北省农林科学院植物保护研究所, 河北保定 071000)

摘要: 利用 C₁₈ 色谱柱, 以甲醇、水、冰乙酸 (45:54.8:0.2) 为流动相于 255 nm 检测细菌培养液提取物, 根据 HPLC 检测结果快速筛选得到既产赤霉素 (GA₃) 又产生长素 (IAA) 的细菌 1 株 CX-5-2, 并利用 HPLC 进一步研究并明确了该菌株不产植物激素的适宜条件。同时明确了该菌株对小麦生长具有促进的潜力。

关键词: 高效液相色谱; 细菌; 植物激素; 赤霉素; 生长素

中图分类号: S476 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)02-0066-04

Screening Bacterium Producing Auxin Through High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

LIAN Cui-fei^{1,2}, JIANG Ji-zhi¹, LI She-zeng²,
LU Xiu-yun², CHAO Chun-yan¹, MA Ping²

(1. Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Baoding 071000, China)

Abstract: The auxin including GA₃ and IAA in the culture broth of 300 bacterial isolates were measured through HPLC in this study, and an isolate CX-5-2 were screened and determined to produce GA₃ and IAA. Simultaneously, the optimum conditions of strain CX-5-2 to produce auxin were studied through HPLC. The results from the experiment on effects of strain CX-5-2 culture broth on the growth of wheat seedlings determined that this bacterial strain has the potential ability of plant growth-promotion.

Key words: HPLC; Bacterium; Auxin; GA₃; IAA

植物激素是一类在植物体内含量极少, 使用时浓度极低的次生代谢产物; 但它对调节植物生长、新陈代谢、生长发育等方面具有重要作用; 对植物生命活动和栽培领域的研究有重要的意义。植物激素不仅仅由植物产生, 而且许多细菌也可以产生赤霉素、生长素、细胞分裂素等多种植物激素类物质而具有促进植物生长的作用, 因此对这类细菌的筛选和研究有重要理论和应用价值。

由于植物激素的含量少、使用浓度极低, 所以需要高灵敏度的检测手段。目前常用的检测方法主要有酶联免疫法和高效液相色谱法 2 种。高效液相色谱 (High performance liquid chromatography, HPLC) 是一

种高效快速的分离检测手段, 其高效、快速、精确的特点使其在各个研究领域得到广泛应用。自 20 世纪 70 年代开始, HPLC 广泛应用于除乙烯以外的其余四类植物激素的测定, 与 ELISA 等常用检测手段相比具有定量精确、准确度高、重复性好的特点^[1]。本试验将这种检测手段引入产植物激素类细菌的筛选及性质的研究, 不仅提高了筛选的效率, 加快了分析速度, 还为目的菌的实际应用提供了依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试的 300 株细菌由河北省农林科学院植物保

收稿日期: 2006-01-20

基金项目: 河北省农林科学院重点项目资助 (A03-1-03-09)

作者简介: 连翠飞 (1981-), 女, 河北石家庄人, 在读硕士, 主要从事植物病害生物防治研究工作; 马平为通讯作者。

护研究所植病生防实验室提供。

标准品: 吡啶-3-乙酸(IAA), 美国 Sanland 公司; 赤霉素(GA₃), 江西核工业瑞丰公司。

KB(King's B)培养基: 用于假单胞菌的培养。

LB(Luria-Bertani)培养基: 用于其他细菌的培养。

1.2 HPLC 条件优化

色谱分析条件: Shimadzu(日本岛津) LC-6A 型高效液相色谱仪; 色谱柱为依利特(Hypersil) ODS2 型色谱柱(柱号: 13150990797); Shimadzu C-RBA 型记录仪; 检测器为 Shimadzu SPD-6AV UV-VIS 型紫外可见分光光度计, 检测波长为 255 nm; 流速: 1 mL/min。以甲醇、水、冰乙酸为流动相^[2], 通过设定不同的溶液配比, 摸索适宜分离 GA₃ 和 IAA 的流动相比例。

1.3 GA₃ 和 IAA 标准曲线的制作

按照文献[3]的方法制作吡啶-3-乙酸(IAA)和赤霉素(GA₃)的标准曲线, 利用 HPLC 检测得到各浓度标准品的峰面积, 用 origin 6.0 软件分析绘制标准曲线得到回归方程及线性相关系数。

1.4 利用 HPLC 检测细菌培养液中 GA₃ 和 IAA

将待测菌株接种于 KB 和 LB 固体斜面培养基上进行活化培养, 后接种于 KB 和 LB 培养液中, 28℃, 170 r/min 培养 48 h。培养好的菌液用 2 倍体积的乙酸乙酯萃取, 重复 3 次; 合并萃取液室温下晾干。再用少量乙酸乙酯复溶, 重复 3 次, 合并复溶液移至 40 mL 烧杯中, 晾干; 再用少量流动相溶解、定容, 经细菌过滤器($\phi = 0.2 \mu\text{m}$)过滤后于 4℃ 避光保存。将处理好的样品, 进样 25 μL , 可以得到样品中各种物质的保留时间和峰面积, 与激素标准品溶液的保留时间相比较, 保留时间基本相同的样品为可以产生相应激素的菌株。

1.5 不同条件下细菌菌株 CX-5-2 产激素 GA₃ 和 IAA 的研究

1.5.1 在不同培养液中菌株 CX-5-2 产激素 GA₃ 和 IAA 检测 取活化好的菌株 CX-5-2 单菌落转入 KB 培养液中培养 24 h(170 r/min 28℃)后, 取 100 μL 该细菌培养液分别转入 LB 和 KB 培养液中进行培养(170 r/min 28℃), 分别于培养 24, 120 h 后取样, 应用 HPLC 检测两种培养液中菌株 CX-5-2 所产激素含量。

1.5.2 不同温度培养条件下菌株 CX-5-2 产 IAA 检测 取活化好的菌株 CX-5-2 单菌落转入 KB 培养液中培养 24 h(170 r/min 28℃)后, 取 100 μL 该细菌培养液转入 KB 培养液中, 分别于 25, 28, 35℃ 培养

(170 r/min)。72 h 后取样, 应用 HPLC 检测菌株 CX-5-2 产激素含量。

1.6 菌株 CX-5-2 对小麦幼苗刺激生长作用的测定

将菌株 CX-5-2 活化培养后选取单菌落转接 KB 培养液中, 28℃ 170 r/min 培养 48 h, 培养液离心(4 500 r/min)25 min, 收集菌体, 用无菌水稀释成 10⁹ cfu/mL 的细菌悬浮液; 另取菌株 CX-5-2 培养液进行稀释, 制成 5, 10, 15, 20, 100 倍的稀释液。

选择子粒饱满, 大小均匀的小麦种子, 经表面消毒(0.1% 升汞)后用上述不同浓度的菌株 CX-5-2 的稀释液及原液浸种 5 h, 以无菌水浸种为对照。然后播种于垫有湿润灭菌滤纸的培养皿中, 20℃/12 h 光照培养; 另选取无菌水浸种发芽良好、长势均匀的小麦, 于培养 4, 6 d 时分别用上述不同浓度的菌株 CX-5-2 的稀释液浇苗, 继续培养(20℃/12 h 光照)。14 d 后测量苗高。每皿 30 株麦苗, 每处理重复 3 次。

1.7 数据分析

本试验中有关数据分析采用 SAS8.1 版本软件(SAS Institute Inc)进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 HPLC 检测 GA₃ 和 IAA 优化条件

为了使被检测物质在尽可能短的检测时间内达到良好的分离效果, 对流动相中甲醇、水、冰乙酸的比例进行了研究, 分别以甲醇: 水: 冰乙酸三者比例为 25:74:1, 35:64:1, 45:54:1, 55:44:1, 45:54.2:0.8, 45:54.4:0.6, 45:54.6:0.4, 45:54.8:0.2 及甲醇: 水 = 45:55 为流动相检测 GA₃ 和 IAA 纯品, 结果表明, 以甲醇: 水: 冰乙酸 = 45:54.8:0.2 为流动相时, 2 种被检测物质检测时间最短、分离效果最好(图 1)。所以确定利用 HPLC 检测 GA₃ 和 IAA 的适宜流动相为甲醇: 水: 冰乙酸(v/v/v = 45:54.8:0.2)。

2.2 产 GA₃ 和 IAA 的细菌菌株筛选

应用 HPLC 方法, 对 300 株细菌产 GA₃ 和 IAA 的情况进行了检测, 筛选出既可以产 IAA 又可以产 GA₃ 的菌株 1 株及只产生 GA₃ 的细菌 2 株。菌株 CX-5-2 在保留时间为 4.013 和 9.167 处有 2 个峰, 2 峰峰型良好、分离完全(图 2), 与 GA₃ 和 IAA 标准品(图 1)峰的保留时间相似。以 2 种标准品为内标加入样品中再次检测, 样品中原来的 2 个峰明显加高, 峰面积明显加大(图 3), 证明菌株 CX-5-2 既可以产生 IAA 又可产生 GA₃。

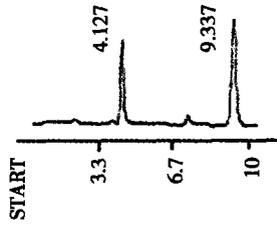


图1 GA₃, IAA 纯品色谱图

Fig.1 The chromatogram of GA₃ and IAA

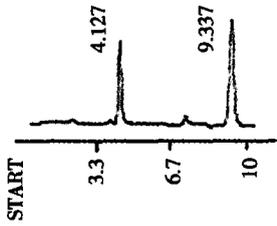


图2 菌株 CX-5-2 色谱图

Fig.2 The chromatogram of strain CX-5-2

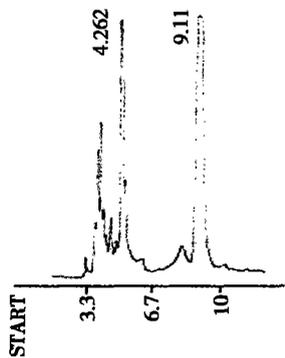


图3 以 GA₃, IAA 纯品为内标的菌株 CX-5-2 色谱图

Fig.3 The chromatogram of strain CX-5-2 adding GA₃ and IAA

2.3 利用 HPLC 定量检测菌株 CX-5-2 的激素产量

2.3.1 制作 GA₃ 和 IAA 标准曲线 将 IAA 和 GA₃ 标准品稀释成不同浓度溶液, 利用 HPLC 检测得到各浓度标准品的峰面积, 用 origin 6.0 软件分析得到标准曲线回归方程。

GA₃ 10 ~ 100 mg/L 标准曲线回归方程: $y = -1054.94595 + 766.83468x$ (y 为峰面积; x 为浓度), 线性相关系数为 0.99835;

GA₃ 100 ~ 2000 mg/L 标准曲线回归方程: $y = 15882.87783 + 559.38552x$, 线性相关系数为 0.99906;

IAA 1.5 ~ 30 mg/L 标准曲线回归方程: $y = 9768.02716 + 23542.30456x$, 线性相关系数为 0.99913。

2.3.2 不同培养液中菌株 CX-5-2 的 GA₃ 和 IAA 产

量 研究表明, 菌株 CX-5-2 在 KB 培养液中生长速度快, 长势好, 激素产量明显高于 LB, 其中 24 h 的 LB 培养液因其 IAA 含量太小, 低于线性范围而无法精确定量(表 1)。该结果说明 KB 培养基适宜菌株 CX-5-2 产激素 GA₃ 和 IAA。

表 1 菌株 CX-5-2 在不同培养液中激素 GA₃ 和 IAA 的积累情况

Tab.1 GA₃, IAA accumulation of strain CX-5-2 cultured with different culture medium

培养基 Culture medium	GA ₃ (mg/L)		IAA(mg/L)	
	24 h	120 h	24 h	120 h
LB	8.5341	13.5225	<0.05	0.1683
KB	60.0938	108.6298	0.8323	1.1889

2.3.3 不同温度培养时菌株 CX-5-2 的 IAA 产量

研究表明, 菌株 CX-5-2 在 25, 28, 35℃ 3 个温度下均生长良好, 在 25℃ 和 28℃ 的培养液含菌量明显低于 35℃ 下的培养液, 但产 IAA 检测结果表明, 菌株 CX-5-2 在 25℃ 和 28℃ 下时 IAA 产量明显高于 35℃, 其中在 28℃ 产量最高(表 2)。该结果说明, 28℃ 为菌株 CX-5-2 产 IAA 的适宜温度。

表 2 不同温度培养时菌株 CX-5-2 的 IAA 积累情况

Tab.2 IAA accumulation of strain CX-5-2 at different culture temperature

培养温度(℃) Culture temperature	25	28	35
IAA(mg/L)	1.6789	2.2503	1.1378

2.4 菌株 CX-5-2 及其培养液对小麦幼苗刺激生长作用的测定

试验结果表明, 与水处理的对照相比, 应用 CX-5-2 菌株培养液的 10 倍稀释液浇苗处理对小麦苗的促生作用最为显著, 而 CX-5-2 菌体及培养液的稀释液对小麦种子的浸种处理及浇苗处理对小麦没有刺激生长作用(表 3)。该结果表明, CX-5-2 菌株对小麦具有潜在促生作用。

表 3 不同方法处理小麦后菌株 CX-5-2 对小麦株高的影响

Tab.3 Length of wheat seedlings treated with strain CX-5-2

处理方法 Treatment	苗高(mL) Seedling length(cm)	处理方法 Treatment	苗高(mL) Seedling length(cm)
水	12.97 BCD	100 倍培养液浸种	13.41BC
100 倍培养液浇苗	13.31 BC	20 倍培养液浸种	11.87EFG
20 倍培养液浇苗	13.59BA	10 倍培养液浸种	11.45G
15 倍培养液浇苗	13.64BA	5 倍培养液浸种	11.47FG
10 倍培养液浇苗	14.68A	菌体浸种(10 ⁹ cfu/mL)	12.69BCD
5 倍培养液浇苗	13.50BC		

3 讨论

自 20 世纪 50 年代至今高效液相色谱已被广泛

应用于蛋白质、核酸、维生素及激素等生物物质的分离检测, 但将高效液相色谱应用于快速筛选产激素类细菌, 目前还很少见报道; 本实验将这种准确度高、灵敏性强、选择性、重复性好、分析速度快的检测手段用于这类细菌的筛选; 避免了常用的 RIA(放射免疫法) 和 ELISA(酶联免疫法) 等测定激素含量的技术存在的准确度低、重复性差等方面的问题^[4]。试验表明, 利用高效液相色谱可以快速找到产激素的目的菌株, 试验步骤简单, 重复性好; 随后对目的菌株所产激素进行的定量分析, 快速精确, 对于实际应用有重要意义。本试验只尝试了用高效液相色谱筛选产赤霉素和生长素两种激素的菌株, 其余几种植物内源激素产生菌的 HPLC 筛选分析尚需进一步探讨。

对目的菌 CX-5-2 的部分性质进行初步研究表明, 该菌激素的积累量与细菌培养条件有关, 在 KB 培养液中的激素积累情况要明显好于 LB 培养液; 温度较高时不利于 IAA 的积累, 若以产生 IAA 为目

的应选择 28℃ 左右培养。为了更有效的利用该目的菌应进一步对其性质进行摸索研究。本试验初步检测了菌株 CX-5-2 平皿促生效果与对照相比差异显著, 今后实验应选用多个测量指标进一步证明其促生效果。

参考文献:

- [1] 陈小鹏, 王秀峰, 孙小镭, 等. 高效液相色谱测定黄瓜条中赤霉素和脱落酸含量[J]. 山东农业科学, 2005, (1): 65 - 67.
- [2] 杜咏梅, 郭承芳, 商 耀, 等. 烤烟成熟过程中主要内源激素的动态变化研究初报[J]. 中国烟草科学, 1998, (4): 41 - 43.
- [3] 何 林, 余继英, 吴正中, 等. 反相高效液相色谱法测定血浆中的单硝酸异山梨酯[J]. 色谱, 2005, 23(5): 528 - 530.
- [4] 冷怀琼, 刘 畅, 刘咏梅. 苹果潜隐病毒的研究 III—茎沟槽病毒对苹果内源激素的影响[J]. 四川农业大学学报, 1991, 9(2): 190 - 194.