

$i^6\text{Ade}$ 和 Hi^6Ade 对芸扁豆和棉豆愈伤组织细胞分裂素氧化酶的影响*

黄学林
(生物学系)

摘 要

异戊烯基腺嘌呤($i^6\text{Ade}$)和异戊烷基腺嘌呤(Hi^6Ade)均可诱导棉豆和芸扁豆愈伤组织中细胞分裂素氧化酶(CKO)的活性,但有差异。对芸扁豆愈伤组织带饱和侧链的 Hi^6Ade 对CKO的诱导效应比带非饱和侧链的 $i^6\text{Ade}$ 强2—3倍,而对棉豆愈伤组织这两个化合物的诱导效应却很相似。表明这两个化合物在促进愈伤组织生长中所显示的结构—活性差异性与其诱导CKO活性差异有着一定的联系。

关键词 棉豆, 芸扁豆, 愈伤组织, 细胞分裂素氧化酶, 异戊烯基腺嘌呤, 异戊烷基腺嘌呤

Chatfield和Armstrong(1986)研究了芸扁豆愈伤组织中细胞分裂素氧化酶(CKO)的一些特性,发现外源的细胞分裂素如 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 等可以诱导该愈伤组织的细胞分裂素氧化酶,但棉豆愈伤组织中该酶的研究尚未见报导。为了探明芸扁豆和棉豆愈伤组织的生长对细胞分裂素反应的差异是否与其体内的CKO诱导性差异有关,本文研究了 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 对棉豆愈伤组织的CKO活性的影响,并与芸扁豆愈伤组织的该酶诱导活性作了比较。

1 材料和方法

1.1 材料 芸扁豆(*Phaseolus vulgaris* L. cv. Great Norther)和棉豆(*P. lunatus* L. cv. Kingston)愈伤组织按文献[1]方法,各自从萌发5天后的幼苗胚轴切段诱导而成并进行培养。

1.2 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 处理愈伤组织的方法

当愈伤组织鲜重每瓶约达10克时(50ml培养基植入3块愈伤组织,培养约3周),

本文1988年1月29日收到

● 本研究完成于美国俄勒岗州立大学, Dr. Armstrong实验室

略语: CKO 细胞分裂素氧化酶 Cytokinin oxidase

$i^6\text{Ade}$: 异戊烯基腺嘌呤[$\text{N}^6-(\Delta^2\text{-isopentenyl})\text{adenine}$], Hi^6Ade : 异戊烷基腺嘌呤[$\text{N}^6\text{-isopenyl adenine}$], Ade: 腺嘌呤[adenine], PvPP: 聚乙烯聚吡咯烷酮[Polyvinylpolypyrrolidone], Polyminp: 一种聚环乙亚胺[Polyethylenminé]

按每克愈伤组织鲜重加0.1ml 100m mol/l H^6Ade 或 i^6Ade 水溶液的比例,将处理溶液直接滴在愈伤组织的表面上^[2],经若干小时后(27°C,光下)用于细胞分裂素氧化酶提取。

1.3 细胞分裂素氧化酶的提取

参考文献[2]方法适当修改后提取细胞分裂素氧化酶。

1.4 细胞分裂素氧化酶的活性测定

CKO酶活性的分析是基于细胞分裂素氧化酶氧化带不饱和侧链的细胞分裂素——异戊烯基腺嘌呤产生腺嘌呤的原理而进行的,酶活性分别以每小时每mg酶蛋白质转化底物成腺嘌呤的n mol数表示,底物——1,8- ^3H 标记的异戊烯基腺嘌呤按文献^[2]方法合成。

所提取的酶蛋白溶于0.1ml/1咪唑缓冲液(pH6.5)。每次酶分析的总体积为50微升;其中含0.01m mol/l的咪唑缓冲液,在37°C水浴中反应30分钟后,加2体积冰冻的95%乙醇,终止反应。冰浴10分钟后,离心,取上清液(100 μl)点样于 C_{18} -硅酸薄层板上(5×8cm)以分离经酶作用后的底物。经点样的层析板用47%乙醇(内含0.15 mol/l NaCl)展开,然后在紫外灯下检测,可见两条蓝色色谱带,其中 R_f 为0.70的是腺嘌呤,而 R_f 为0.28的为异戊烯基腺嘌呤。将相应的色谱带定量地转移到液闪瓶内(含5ml Lipoflour 闪烁液)用Packard model 2405 液闪仪测定各自的放射强度,最后换算出被酶分解所得的1,8- ^3H 标记的腺嘌呤mol数。

1.5 蛋白质的测定

酶蛋白溶液与等量的冷三氯醋酸溶液(20% w/v)混合,冰浴30分钟后,离心(20000g, 10分钟),沉淀用0.1N NaOH溶解,用Folin-酚试剂法^[9]测定蛋白质含量。以上每个测定有2—4个重复,数据以平均值±SE表示。

2 结果

2.1 处理时间长短对细胞分裂素依赖型棉豆愈伤组织CKO活性的影响

为便于与芸扁豆同类型愈伤组织相比较, H^6Ade 和 i^6Ade 的使用浓度为100m mol/l^[2]直接滴加在愈伤组织表面。不同处理时间对CKO活性影响见图1,经2小时后CKO活性开始明显上升,此后,随着处理时间的增长而继续提高。处理4小时后分别增加了11%和24%,继续处理4小时后在原有基础上分别增加21%和16%。可见,在处理的一个4小时内酶活性增加幅度较大,因此下述实验均采用4小时处理。

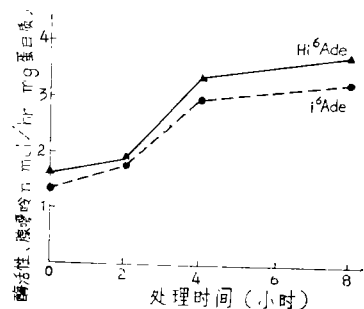


图1 处理时间对CKO活性的影响

2.2 对细胞分裂素依赖型芸扁豆和棉豆愈伤组织CKO活性的影响

100m mol/l H^6Ade 和 i^6Ade 分别滴在愈伤组织表面,4小时后测定CKO活性,结果如表1所示。

从表 1 可知, Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 都可以诱导提高这两种愈伤组织中CKO酶水平。在棉豆愈伤组织中经 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 处理后, CKO酶活性水平相接近; 而在芸扁豆愈伤组织中, Hi^6Ade 对CKO的活性却比 $i^6\text{Ade}$ 要高 3 倍左右。

表 1 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 对细胞分裂素依赖型芸扁豆和棉豆愈伤组织CKO活性的影响
Tab.1 Effect of exogenous application of Hi^6Ade and $i^6\text{Ade}$ on cytokinin oxidase activity in phaseolus vulgaris L. cv. Great Northern and P. Lunatus L. cv. Kingston callus tissue(cytokinin-dependent growth)

处 理 (4hr.)	细胞分裂素氧化酶活性 (n mol Ade /hr. mg protein)	
	棉豆愈伤组织	芸扁豆愈伤组织
对照(H_2O)	1.54±0.07	0.47±0.05
Hi^6Ade	2.18±0.1	1.41±0.05
$i^6\text{Ade}$	2.14±0.13	0.58±0.07

2.3 对细胞分裂素自主型的芸扁豆和棉豆愈伤组织中CKO活性的影响

实验结果如表 2 所示, Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 均能诱导细胞分裂素自主型的芸扁豆和棉豆愈伤组织中的CKO活性, 但在芸扁豆愈伤组织中, Hi^6Ade 对CKO活性的诱导作用强于 $i^6\text{Ade}$, 而在棉豆愈伤组织中, 两者诱导作用较接近。另外, 从表 1 和表 2 可知, 细胞分裂素自主型的棉豆愈伤组织原有酶水平活性较低, 而 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 对自主型的愈伤组织中细胞分裂素氧化酶活性的影响均大于依赖型。

表 2 Hi^6Ade 和 $i^6\text{Ade}$ 对细胞分裂素自主型芸扁豆和棉豆愈伤组织中CKO活性的影响
Tab. 2 Effect of exogenous application of Hi^6Ade and $i^6\text{Ade}$ on cytokinin oxidase activity in Phaseolus vulgaris L. cv. Great Northern and P. lunatus L. cv. Kingston callus tissue(cytokinin-autonomous growth)

处 理 (4hr.)	细胞分裂素氧化酶活性 (n mol Ade/hr. mg Protein)	
	棉豆愈伤组织	芸扁豆愈伤组织
对照(H_2O)	0.23±0.04	0.45±0.02
Hi^6Ade	2.35±0.15	1.46±0.08
$i^6\text{Ade}$	2.24±0.2	0.88±0.07

3 讨 论

细胞分裂素氧化酶已分别从培养的烟草组织和玉米籽粒、芸扁豆愈伤组织中分离纯化。带饱和侧链的细胞分裂素(二氢玉米素、 Hi^6Ade 等)可以抵抗该酶的攻击, 而带不饱和侧链的细胞分裂素(玉米素、 $i^6\text{Ade}$ 等)则极易被酶所氧化^[2,4,6]。有实验证明二氢玉米素是芸扁豆幼苗中主要细胞分裂素之一, 这种还原型的玉米素的存在被认为是为了防止细胞分裂素过多地被破坏的机制之一^[5]。对于解释 Hi^6Ade 对促进芸扁豆愈伤组

织生长活性要比 $i^8\text{Ade}$ 的活性强许多,而在棉豆愈伤组织中则很接近的现象^[1],一种推测认为这可能是与带不饱和侧链的 $i^8\text{Ade}$ 引起芸扁豆愈伤组织CKO活性升高,结果使这一带不饱和侧链的化合物在体内代谢过程中受CKO的作用而降解^[5]。然而实验表明:在芸扁豆愈伤组织中带饱和侧链的 Hi^8Ade 对该酶的诱导作用要比 $i^8\text{Ade}$ 大2—3倍,而在棉豆愈伤组织中,这两个化合物对该酶的诱导作用则差别不大。显然这种诱导作用有别于一般的酶底物的诱导作用,因为在芸扁豆中,CKO的底物——带不饱和侧链的 $i^8\text{Ade}$ 对该酶的诱导作用却低于 Hi^8Ade 。Chatfield和Armstrong(1986)认为,这一现象可能是由于这两个化合物诱导酶活性的结构要求不同于作为酶底物功能的结构要求^[2],然而这一解释仍需要进一步实验的证实。

细胞分裂素对促进愈伤组织生长的结构—活性的差异可能包括:这些组织对细胞分裂素的吸收、体内的运输以及分解代谢的差异。酶诱导实验表明,这两个化合物在促进愈伤组织生长所显示的结构—活性的差异性与其诱导CKO活性差异有着一定的联系,它们之间内在联系仍需进一步阐明。

代谢研究揭示在植物中还存在着另一些细胞分裂素侧链裂解的代谢途径,如外喂苜蓿基腺嘌呤给小萝卜(rabish)、白羽扇豆幼苗、大豆、烟草愈伤组织和外喂激动素给槭树细胞,都会产生这两个化合物侧链断裂的衍生物^[6,7]。另外还发现长春花冠瘿瘤中CKO与玉米中的CKO无论在分子量或动力学参数(V_{\max} 、 K_m)方面均存在差别。因此要弄清 Hi^8Ade 和 $i^8\text{Ade}$ 在促进芸扁豆和棉豆愈伤组织生长的结构—活性差异性有必要进一步研究它们在体内代谢途径、运输模式以及有关酶的特异性。

参 考 文 献

- [1] Mok M C et al., *Plant Physiol.*, 61(1978), 72—75
- [2] Chatfield J M et al., *Plant Physiol.*, 80(1986), 493—499
- [3] Peterson G L, *Methods Enzymol.*, 91(1983), 95—119
- [4] Whity C D et al., *Can. J. Biochem.*, 52(1974), 789—799
- [5] Armstrong D J et al., *Guern. Metabolism and Molecular Activities of cytokinins*, J. and Pcaud-Lenoel, C.,(ed), Springer-verleg Berlin Heicelberg, 1981, 97—104
- [6] Letham D S et al., *Biochem. Biophys. Acta*, 399(1975), 61—70
- [7] Fox J E et al., *Plant Physiol.*, 52(1973), 627—632

Effect of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenine and N^6 -isopentyladenine on Cytokinin Oxidase in *Phaseolus* Callus Tissues

Huang Xuelin*

Abstract

To understand the differential structure-activity of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenine and N^6 -isopentyladenine in promoting *Phaseolus* callus tissues growth, the comparison of induction effects of these two compounds on cytokinin oxidase activity in callus tissues of *P. Vulgaris* L. cv Great Northern and *P. Lunatu* L. cv Kingston was conducted.

It was found that both of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenine and N^6 -isopentyladenine were effective in inducing elevated level of cytokinin oxidase activity in the callus tissues, in Great Northern callus tissues N^6 -(Δ^2 -isopentenyl) adenine exhibited 2 or 3 time increase in cytokinin oxidase activity than N^6 -isopentyladenine did, but in Kingston callus tissues they did closed effects on increase of the enzyme activity.

These results show that there is a relationship between the structure-activity of these two compounds in promoting callus tissue growth and their induction effects on increase in the enzyme activity of the tissues. The structure requirements for the induction of the enzyme activity appear to differ from those determining the ability of the compounds to function as substrates for the enzyme.

Keywords *phaseolus vulgaris*, *phaseolus lunatus*, callus tissues, cytokinin oxidase, N^6 -(Δ^2 -isopentenyl adenine), N^6 -isopentyl adenine

* Department of Biology