

6-苯甲酰氨基嘌呤和6-咪喃甲酰氨基嘌呤的生物鉴定

李卓杰 梁爽 傅家瑞
(生物学系)

摘 要

6-苯甲酰氨基嘌呤(xj-4)和6-咪喃甲酰氨基嘌呤(xj-5)是中山大学化学系新合成的两种生长调节剂。用萝卜子叶法和与IAA或Ca⁺⁺协同释放乙烯法测定其生物活性,表明它们均具有细胞分裂素活性,其中xj-4的活性较高,接近6-BA,而xj-5的活性稍低。xj-4的适宜使用浓度是5-10mg/l, xj-5则为10-15mg/l。由于生产成本低,均不失为有效的人工合成细胞分裂素。

细胞分裂素与IAA或Ca⁺⁺协同释放乙烯是一个快速而准确测定细胞分裂素的方法,其中与IAA的协同作用效果更好。

关键词 6-苯甲酰氨基嘌呤, 6-咪喃甲酰氨基嘌呤, 细胞分裂素, 协同释放乙烯法, 萝卜子叶测定法

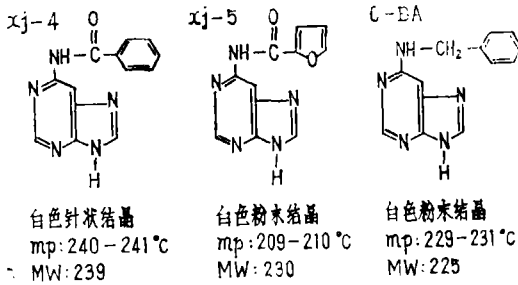
细胞分裂素是五大类植物激素之一,属于嘌呤类物质,它参与调控植物生长发育诸过程,如控制种子萌发,促进细胞分裂,促进侧芽发育,诱导组织分化以及防止衰老等生理活动。常用的人工合成细胞分裂素是6-苄基腺嘌呤(6-BA)和激动素,它们的活性虽高,但生产成本也高,还难以普遍使用于农业生产。

6-苯甲酰氨基嘌呤(xj-4)和6-咪喃甲酰氨基嘌呤(xj-5)是中山大学化学系新合成的两种细胞分裂素类激素,它们的生产流程较简单,生产成本低,我们应用两种生物测定法(一是萝卜子叶增重法,一是协同释放乙烯法)来鉴别这两种新产品,试图为其应用价值提供理论依据。

1 材料与方 法

xj-4和xj-5由有机化学教研室提供,测定细胞分裂素活性的试验以6-BA作对比。它们的化学结构如下:

本文1987年5月15日收到



萝卜子叶增重法参照 Lethem⁽³⁾ 的方法。

细胞分裂素与 IAA 或 Ca^{++} 协同系统的气相色谱法参照 Lau 和 Yang 的方法^(3,4,6)。新鲜绿豆种子精选后洗净,吸胀数小时,播于充分吸水的珍珠岩中,在 25°C 下黑暗培养 3-4 天,待幼苗长至 9-10cm 时,选取长短粗细一致的幼苗,在下胚轴倒钩下

1 cm 处的下部截取 2 cm 长的切段,每 20 个切段为一组,放入 40 ml 三角锥瓶中,加入 5 ml 含有 10 μM 激素样品, 12 μM IAA 或 10 mM $CaCl_2$, 2% 蔗糖的 50 mM 磷酸缓冲液,细胞分裂素与 IAA 系统 pH 为 6.0,细胞分裂素与 Ca^{++} 系统 pH 为 5.5,以 6-BA、xj-4 和 xj-5 分别作对照。将三角锥瓶内气体与室内气体平衡后,于瓶内放入一个盛有 0.2 ml 40% KOH 的塑料小杯,以吸收放出的 CO_2 ,然后用橡皮塞密封瓶口,隔 3 小时取样测定瓶内乙烯含量。

乙烯的测定采用 103 型气相色谱仪,色谱柱为涂有 1.5% Apiezon 的氧化铝柱,氢焰检测。

2 试验结果

2.1 不同质介的 xj-4、xj-5 溶液对萝卜子叶增重的影响

用蒸馏水和 2 mM 磷酸缓冲液 (pH 5.8-6.0) 分别将 xj-4 和 xj-5 配制成每毫升含 0.005、0.05、0.5、5 毫克的溶液,以此溶液培养萝卜子叶,结果如表 1。xj-4 和 xj-5 溶液对萝卜子叶的增重有显著的促进作用。在 0.005-5 mg/升的浓度范围内,增重作用随着浓度的增加而增加。5 mg/升的 xj-4 溶液比对照组增重 6.3 倍,而 xj-5 组也比对照组增重 5 倍。xj-4 和 xj-5 的磷酸缓冲液明显地促进萝卜子叶增重,在相同浓度下,xj-4 和 xj-5 的磷酸缓冲液比它们的水溶液促进增重更为有效。

表 1 xj-4、xj-5 处理萝卜子叶的增重效应 (10 片子叶平均值)

Tab. 1 Effect of xj-4 or xj-5 treatment on the weight of radish cotyledons (average weight for cotyledon)

处理	浓度 (mg/L)	培养前子叶重 (mg)	培养后子叶重 (mg)	净增重 (mg)	色泽
水溶液	0 (蒸馏水)	65	80	15	黄绿
	0.005	75	130	55	黄绿
	0.05	65	125	60	黄绿
	0.5	65	160	83	绿
	5	70	180	95	绿

续表 I

磷酸缓冲液 xj-4	0 (缓冲液)	75	110	35	黄绿
	0.005	75	145	75	绿
	0.05	70	150	30	绿
	0.5	75	185	110	绿
	5	75	250	175	黄绿
水溶液 xj-5	0 (蒸馏水)	45	69	15	黄绿
	0.005	58	95	18	黄绿
	0.05	66	95	29	黄绿
	0.5	54	65	41	黄绿
	5	42	123	81	黄绿
磷酸缓冲液 xj-5	0 (缓冲液)	55	90	35	黄绿
	0.005	49	80	31	黄绿
	0.05	68	100	32	黄绿
	0.5	51	90	39	黄绿
	5	55	140	85	黄绿

2.2 最适浓度和适宜浓度范围

试验表明,随着xj-4和xj-5浓度的增加,子叶的重量也增加,当在水溶液状态下,浓度为10mg/升时,xj-4和xj-5均使萝卜子叶增重达最大值。当浓度继续增大时,则子叶增重下降。因此,10mg/升是xj-4和xj-5的最适浓度。对xj-4,适宜浓度范围是5—10mg/升,而xj-5适宜浓度范围却为10—15mg/升,这也清楚表明xj-4的活性比xj-5要高(表2)。

表2 xj-4、xj-5 最适浓度试验(10片子叶平均值)

Tab 2. Optimal concentration of xj-4 and xj-5

处理	浓度 mg/L	培养前子叶重 (mg)	培养后子叶重 (mg)	净增重 (mg)	色泽
水溶液 xj-4	0.05	59	230	116	黄绿
	0.5	70	295	125	黄绿
	5	65	300	235	绿
	10	58	310	252	绿
	15	69	202	193	绿
	20	62	206	144	绿黄
水溶液 xj-5	0.05	41	111	70	绿黄
	0.5	48	121	73	绿
	5	40	137	97	绿
	10	45	170	125	绿
	15	50	163	113	绿
	20	45	149	101	黄绿

2.3 活性比较

以6-BA为标准, xj-4和xj-5与之进行比较, 结果如表3所示。在相同浓度条件下, 以子叶增重率作比较, 6-BA活性最高, 但xj-4活性亦相当接近6-BA, 而xj-5的活性则较低。xj-4与xj-5的最适活性浓度是10mg/升, 而6-BA则为5mg/升。

表3. 三种细胞分裂素类物质活性对比(10片子叶平均值)
Tab.3 Comparison of activities of three cytokinins

处理	浓度 (mg/L)	培养前子叶重 (mg)	培养后子叶重 (mg)	增重 (%)	色泽
水溶液 xj-4	0.5	42	168	300	黄绿
	5	45	175	288	黄绿
	10	49	194	295	绿黄
	15	47	185	293	绿黄
水溶液 xj-5	5	48	155	225	黄绿
	10	49	170	246	绿黄
	15	48	153	218	黄绿
	20	48	149	210	黄绿
水溶液 6-BA	0.5	51	187	266	黄绿
	5	41	179	336	黄绿
	10	48	202	320	绿
	15	46	183	297	绿黄
	20	50	172	244	黄绿
蒸馏水	0	47	148	214	黄绿

2.4 与Ca⁺⁺系统的协同作用

对释放乙烯的影响

试验表明, xj-4与xj-5能和Ca⁺⁺起协同作用, 增加绿豆幼苗下胚轴的乙烯释放量, 其中xj-4释放较多, xj-5释放较少。在0—15小时的培养时间内, 随着培养时间的增加, 乙烯释放量也增加。乙烯的释放表现为三个阶段: 1—6小时为迟滞期, 处理与对照组都仅释放很少量的乙烯; 6—9小时为对数期, 处理组乙烯释放量迅速增加, 几倍于对照组; 9—15小时为平缓期, 各组的乙烯释放量增加缓慢(图1)。

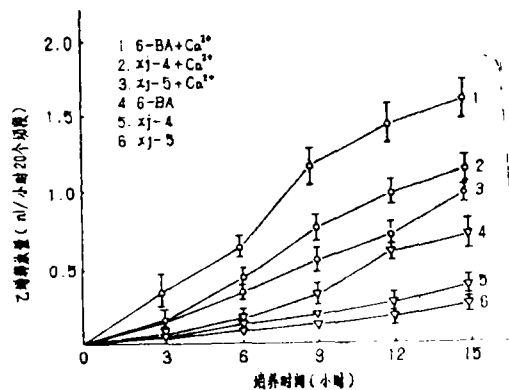


图1 CK + Ca⁺⁺系统中CK对绿豆下胚轴切段释放乙烯的影响(CK浓度为10μM, Ca⁺⁺浓度10mM, pH5.5)

Fig.1 Effect of CK on hypocotyl section of mung bean in releasing ethylene at CK + Ca⁺⁺ system (10 μMCK and 10 mM Ca⁺⁺, pH5.5 in the system)

2.5 与 IAA 系统的协同作用对乙烯释放的影响

从 xj-4 或 xj-5 与 12 μ M IAA 处理绿豆下胚轴切段释放乙烯的效应来看, 在处理 1—12 小时内, 细胞分裂素与 IAA 的协同作用比非协同作用的对照组, 乙烯的释放量有十分明显的增加, 而且随着培养时间的增加而增加。在处理 9 小时, 对照组乙烯的释放量还处于一个很低的水平, 而 6-BA 和 xj-4 与 IAA 的协同作用即有大量的乙烯释放, 其释放量可比对照组高达 6—8 倍之多, xj-5 的协同作用稍为推迟, 到处理后 12 小时才达到高峰, 接近 xj-4 的水平 (图 2)。

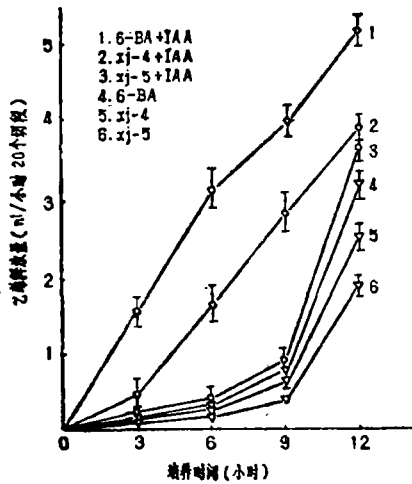


图 2 CK + IAA 系统中 CK 对绿豆下胚轴切段释放乙烯的影响 (CK 和 IAA 浓度均为 10 μ M, pH 6.0)

Fig. 2 Effect of CK on hypocotyl section of mung bean in releasing ethylene at CK + IAA system. (10 μ M CK and 10 μ M IAA, pH 6.0 in the system)

3 讨 论

xj-4 (6-苯甲酰氨基嘌呤) xj-5 (6-咪喃甲酰氨基嘌呤) 均表现细胞分裂素活性。不论是萝卜子叶增重法或是协同释放乙烯法都明显看到 xj-4 的活性高于 xj-5。xj-4 的活性接近 6-BA, 基本上可以代替 6-BA; xj-5 的活性较次, 只要在应用中适当增加浓度, 也不失为一种价廉而有效的人工合成细胞分裂素。

细胞分裂素的结构与功能有着密切的关系。一般说来, 细胞分裂素分子上有一个完整的嘌呤环, 这对其活性是必要的。细胞分裂素支链的长度、不饱和程度以及支链上取代基的种类和位置等, 都对其活性有很大的影响⁽²⁾。从 xj-4、xj-5 和 6-BA 的结构来看, 它们除了都有一个嘌呤环外, 在 N-6 位侧链上也有环状结构。6-BA 的苯环是通过次甲基与 6 位氨基 N 相连, 而 xj-4、xj-5 则是通过甲酰氨基与 6 位氨基 N 相连。xj-4 上的甲酰基经加氢还原为次甲基后, 即转变为 6-BA。而 xj-5 的甲酰基还原为次甲基后, 即转变为激动素⁽¹⁾。从与 6-BA 在结构的相似性来看, xj-4 的结构酷似 6-BA, 这可能是它的活性较接近 6-BA 的原因, 而 xj-5 较接近激动素, 因而其活性也比 xj-4 稍逊, 这也表现出 xj-4、xj-5 具有细胞分裂素的结构与功能相一致的特性。

近年由 Lau 和 Yang 提出的 IAA 或 Ca⁺⁺ 能与细胞分裂素协同作用产生乙烯的能力, 并且乙烯量与细胞分裂素含量呈正相关, 因而是测定细胞分裂素活性的一个快速而准确的方法^(4,7)。他们认为, 细胞分裂素与 IAA 的协同作用释放乙烯, 是由于细胞分裂素解除了结合态 IAA 的束缚, 使之转变为活泼的自由态, 从而提高了活泼态 IAA 的水平, 而高水平活泼态 IAA 的存在就会促进乙烯的释放^(3,7)。对于细胞分裂素与 Ca⁺⁺ 的协同作用, 是由于: ① Ca⁺⁺ 影响细胞分裂素的吸收与代谢; ② 细胞分裂素影响 Ca⁺⁺ 的吸收和 (或) 运输, 从而对应于乙烯的产生; ③ 细胞分裂素和 Ce⁺⁺ 都直接涉及乙烯的产生⁽⁵⁾。从 xj-4

和xj-5与IAA或Ca⁺⁺的协同作用中,我们都能看到乙烯的释放,这也清楚表明xj-4和xj-5是具有细胞分裂素活性的物质.在这两个系统中,xj-4释放乙烯的量高于xj-5,可以进一步表明xj-4的细胞分裂素活性大于xj-5.

从本试验看到,细胞分裂素与IAA或Ca⁺⁺系统对促进乙烯的释放都有明显的协同作用,其中细胞分裂素与IAA的协同作用要比Ca⁺⁺的协同作用强得多.因此在测定效果上,细胞分裂素与IAA的协同作用比与Ca⁺⁺的协同作用更明显,更适于取采作为细胞分裂素的生物测定方法.Lau和Yang认为此方法准确且专一,在1—100 μ M细胞分裂素浓度范围内,乙烯的释放与浓度成线性关系^[4].此方法对细胞分裂素的测定效果更好,是细胞分裂素生物测定的一个较好的方法.

参 考 文 献

- [1] 钟增培、王植材, 中山大学学报(自然科学版), 1982, 3: 106—107.
 [2] 增田芳雄、胜见允行、今关英雅, 《植物激素》, 科学出版社, 1978, 231—287.
 [3] Lau, O.L., & Yang, S.F., *Plant Physiol.* 51(1973). 1011—1014.
 [4] Lau, O.L. & Yang, S. F., *Plant(Borl)*, 118(1974), 1—6.
 [5] Lau, O.L. & Yang, S.F., *Plant Physiol.*, 55(1975), 738—740.
 [6] Lau, O.L., Johu, W.W. & Yang, S.F., *Physiol. Plant*, 39 (1977), 1—3.
 [7] Lau, O.L., Yang, S.F. & Yung, K.H., *Plant Cell Physiol.*, 15 (1974), 29—35.
 [8] Lethem, D.S., in *Biochemistry & Physiology of Plant Growth substance* ed. by F. wightman & G. Setterfield P. 19, the Runge Press, Ottawa(1969).

Bioassay of 6-Benzoylaminopurine and 6-Furoylaminopurine (Two New Synthetic Cytokinins)

Li Zhuojie Liang Shuang Fu Jiarui

Abstract

6-Benzoylaminopurine(xj-4) and 6-Furoylaminopurine(xj-5) are two new synthetic cytokinins prepared by department of chemistry, zhongshan university. Two bioassay were used to detect the activities of these two cytokinins, namely the method of redish cotyledon and the synergistic of cytokinin with IAA or Ca⁺⁺ to release ethylene. The activity of 6-benzoylaminopurine(xj-4) is higher than that of 6-furoylaminopurine (xj-5). The optimal concentration of 6-benzoylaminopurine is 5—10 mg/l, and that of 6-furoylaminopurine is 10—15 mg/l. Because of the structure of 6-benzoylaminopurine resemblance to that of 6-BA, their activities are very close. Due to its high activity and low production cost, 6-BA can be replaced by 6-benzoylaminopurine. Although the activity of 6-furoylaminopurine(xj-5) is more or less lower than xj-4, it is still one available new synthetic cytokinin due to its low production cost.

Keywords 6-Benzoylaminopurine, 6-Furoylaminopurine, Cytokinin, Synergistic ethylene release bioassay, Radish cotyledon bioassay