

PGR-08 理化性质及生物活性的研究

许鸿源¹, 许鸿章², 杨美纯¹, 周岐伟¹

(1. 广西大学农学院, 广西南宁 530005; 2. 中国医学科学院医用生物技术研究所, 北京 10050)

摘要: PGR-08 是从某种土壤放线菌(*Actinomyces*)的发酵液中分离提纯得到的白色结晶, 纸层析和熔点检测证明它是化学单体, mp 180~181 °C, $[\alpha]_D^{21} + 43^\circ$ (H₂O)。溶解性试验表明它易溶于 H₂O (≥ 60 °C)、HCl、NaOH、(CH₃)₂CO、CH₃OH 和 C₂H₅OH 等, 但不溶于 NaHCO₃。Tollen、Fehling 和 AgNO₃-溴酚兰等专性试剂的颜色反应表明其组成成分中有嘌呤和糖。生物试验证明: PGR-08 具有细胞分裂素的活性, 例如它能减缓蒲公英离体叶圆片 Chl. 的降解, 延长叶圆片寿命 1~2 倍以上, 诱导叶圆片分化出不定根或不定芽, 甚至建成小植株。它还能促进小麦种子萌发。

关键词: PGR-08; 物理化学性质; 生物活性; 细胞分裂素

中图分类号: Q945 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2003)05-0461-03

Studies on the physical and chemical characteristics and bioactivities of PGR-08

XU Hong-yuan¹, XU Hong-zhang², YANG Mei-chun¹, ZHOU Qi-wei¹

(1. *Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, China*; 2. *Institute of Medicinal Biotechnology of Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China*)

Abstract: PGR-08 is a white crystal isolated and purified from the ferment liquor of an *Actinomyce*. It was identified as a single chemical compound by paper chromatography and mp. exam, mp. 180~181 °C, $[\alpha]_D^{21} + 43^\circ$ (H₂O). The dissolvability test showed that it dissolved easily in H₂O (≥ 60 °C), HCl, NaOH, (CH₃)₂CO, CH₃OH and C₂H₅OH, but difficult to dissolve NaHCO₃. The colour reactions with some special agents such as Tollen, Fehling and AgNO₃-Bromphenol blue etc, showed that purine and sugar were involved in its composition. Bioassays showed that PGR-08 probably possesses some functions from CTK, for example, to prolong the life of the round slice of Dandelion's leaf 1~2 times more than CK, and to induce the adventitious root or bud differentiation, even to establish a small plant from the round slice of Dandelion's leaf. It also promoted the germination of wheat seeds.

Key words: PGR-08; physical/chemical characteristic; bioactivity; cytokinin

细胞分裂素(Cytokinin, CTK)是一类普遍存在于植物界且非常重要的植物激素。它直接影响植物的细胞分裂、器官建成、叶片衰老和其它一些重要的生理过程。植物自身代谢合成的 CTK 中最有代表性的是玉米素(Zeatin, ZT), 其活性最强, 但含量甚微, 制备困难, 价格昂贵, 至今仍然只能供实验室做

研究之用。人工合成的 CTK 中具代表性的是激动素(Kinetin, KT)和 N⁶-苄基腺嘌呤(N⁶-Benzyl-adenine, N⁶-BA), 价格虽比 ZT 便宜得多, 但对农民来说仍然是比其它常用植物生长调节剂贵得多, 目前主要是用于经济效益较高的植物试管苗的工厂化生产和一些试验研究。长期以来, 人们一直在为寻找

收稿日期: 2002-05-10 修订日期: 2002-10-28

作者简介: 许鸿源(1944-), 男, 河南郑州市人, 教授, 从事植物生理和生物化学教学与研究。

价格低廉、使用方便,用途广泛的CTK新品种而努力,PGR-08的发现是我们在这方面做的部分工作。

1 材料与方 法

1.1 材料

放线菌(*Actinomyces*)发酵液由中国医学科学院医用生物技术研究所实验工厂提供。生物试验材料是蒲公英(*Dandelion*)离体叶片和小麦种子。

1.2 方法

1.2.1 PGR-08 的制备 先将发酵液作酸化处理,再调 pH 近中性,用活性炭吸附,然后用 CH_3OH 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 等洗脱,收集洗脱液减压浓缩即得粗结晶。继续用 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 重结晶得纯品。

1.2.2 PGR-08 纯度检验 依常规用新华 1 号滤纸和不同展开系统对重结晶作纸层析,用紫外灯(254 nm)检查荧光斑点,再用 AgNO_3 -溴酚兰试剂显色检查色斑数。同时用 Kofler 显微熔点仪测粗结晶及重结晶的 mp. 变化。

1.2.3 PGR-08 理化性质检测 熔点(mp.)用 Kofler 显微熔点仪测定。比旋光($[\alpha]_D^{25}$)用旋光仪测定。

溶解性用 H_2O 和 HCl 、 NaOH 、 NaHCO_3 、 CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$ 等的水溶液试验。

颜色反应用 Molisch、Tollen、Fehling、 AgNO_3 -溴酚兰、双缩脲和茚三酮等专性试剂试验。

1.2.4 PGR-08 生物活性试验 延长离体叶片寿命的保绿活性用蒲公英叶圆片法(许鸿源,1986)检测。用 $\Phi 1$ cm 打孔器切取叶圆片,将 15 套 $\Phi 12$ cm 的培养皿分为 5 组,每组 3 套,每套培养皿放叶圆片 35 个。将事先用重蒸馏水配制好的 PGR-08 的 5 种浓度:0(CK、重蒸馏水)、10、25、50、100 mg/L 的溶液分别盛入上述 5 组培养皿,每皿 25 mL,使叶圆片能漂起,并用特种笔记下液位,以便必要时补充重蒸馏水,维持浓度相对稳定。然后置近窗又无日晒处每天观察记录叶色变化、染菌和枯死情况。

叶圆片残留 Chl. 含量用分光光度计比色测定(西北农学院等,1980),每皿随机取 5 片,每浓度共 15 片。

促进种子发芽的活性用小麦种子按常规做发芽试验(许鸿源等,1995)。浸种后 14 h 统计露白(胚根突破种皮)率,48 h 后统计发芽(胚根长 $\geq 1/2$ 种

长)率。

2 结果与分析

2.1 PGR-08 纯度检查

用新华 1 号滤纸点样,以 H_2O 饱和的 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{OH}$ 为展开剂,室温下进行层析,Rf = 0.58;以 $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_3-\text{OH} : \text{CH}_3-\text{COOH} : \text{H}_2\text{O}$ (2 : 1 : 1) 为展开剂,Rf = 0.80。无论是用紫外灯(254 nm)观察荧光,还是用 AgNO_3 -溴酚兰显色,均呈单一斑点。熔点测定表明,粗结晶 mp. $< 170^\circ\text{C}$,2 次以上重结晶(EtOH) mp. 稳定在 $180 \sim 181^\circ\text{C}$,上述结果证明,经反复重结晶的 PGR-08 制品为纯净的化学单体。

2.2 PGR-08 的理化性质

测定结果显示,PGR-08 mp. $180 \sim 181^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D^{25} + 43^\circ(\text{H}_2\text{O})$ 。易溶 H_2O ($\geq 60^\circ\text{C}$)、 HCl 、 NaOH 、 CH_3OH 、 $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ 和 $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$,但不溶 NaHCO_3 。与 Tollen、Molish、Fehling 和 AgNO_3 -溴酚兰等试剂呈阳性反应,而与双缩脲和茚三酮试剂呈阴性反应,从而说明 PGR-08 含有嘌呤与糖的化学成分。

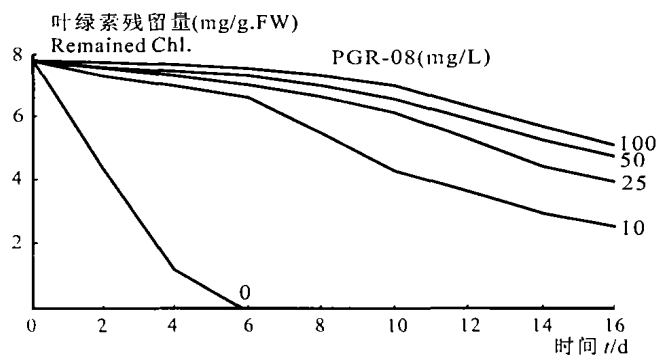


图 1 PGR-08 对蒲公英叶圆片的保绿活性

Fig. 1 The green-retaining activity of PGR-08 on the round slice of Dandelion's leaf

2.3 PGR-08 的生物活性

2.3.1 对离体叶圆片的保绿活性 从图 1 可见,PGR-08 对离体蒲公英叶圆片有明显的保绿活性,使其平均寿命比 CK 组延长 1~2 倍以上。在实验范围内,PGR-08 的保绿活性与其浓度呈正相关。在每天的观察中发现,CK 组从第三天已有叶圆片枯黄衰亡,到第五天已大多衰亡,第六天已无样可取。而 PGR-08 各处理组在第一周内叶色几乎无太明显的变化,10 d 后大多数仍能保持绿色。特别是

50、100 mg/L 的 PGR-08 处理组有多数(10、25 mg/L 组也有部分)叶圆片能存活半月以上。这与图 1 中显示的 Chl. 残留量的变化是一致的。随后可能是营养问题,衰亡加速。但也有少数叶圆片可存活 25 d,甚至 30 d 以上。

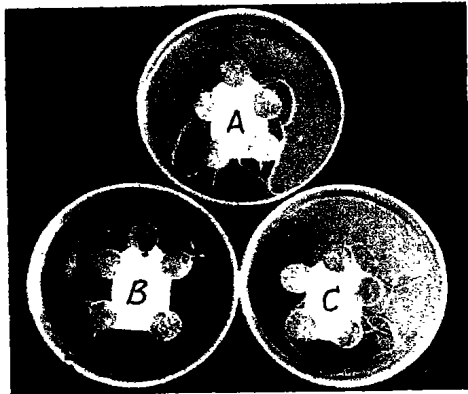


图 2 PGR-08 诱导蒲公英叶圆片长出
不定根(A、C)或不芽(B)

Fig. 2 The adventitious root(A、C)or bud (B) induced by PGR-08 from the round slice of Dandelion's leaf

在本试验中我们还注意到,在相同条件下,CK 组的叶圆片很容易感染病菌而加速衰亡,但 PGR-08 各组则不易被病菌感染,所以 PGR-08 似有抗菌的活性,这可能是 PGR-08 除减缓 Chl. 降解之外使叶圆片得以长命的另一原因。

表 1 PGR-08 对小麦种子萌发的影响

Table 1 Effects of PGR-08 on the germination of wheat seeds

时间 Time		PGR-08 浓度 Concentration of PGR-08(mg/L)				
		0(CK, H ₂ O)	5	10	30	50
浸种后 14 h	露白率 Radicle-showing seeds(%)	48.5	50.0	51.2	50.8	51.2
14 h after seeds soaked	比 CK 增加 Added over ck(%)	—	3.1	5.6	4.7	5.6
浸种后 48 h	发芽率 Germinating seeds(%)	83.8	91.6	100.0	100.0	100.0
48 h after seeds soaked	比 CK 增加 Added over ck(%)	—	9.3	19.3	19.3	19.3

子在萌发初期,即露白 50%左右以前,PGR-08 对萌发的促进作用虽然可见,但并不显著。这是因为从浸种到露白这段时间主要是种子吸水膨胀,是简单的物理化学变化,而复杂的生理生化过程尚在启动之中,种子刚刚脱离休眠状态,整体代谢水平不高所致。随后,由于生理学与生物化学过程的逐步活跃,PGR-08 对种子萌发进程的影响也更加显著;当 PGR-08 各组发芽率均达 100%时,CK 组仅有 83.8%。表 1 还显示 5~10 mg/L PGR-08 就足以促进小麦种子萌发,无需更高的浓度。

2.3.2 诱导器官建成的活性 当进行上述保绿活性试验时,在 50 mg/L 组与 100 mg/L 组中凡能生存下来者,15 d 以后多在维管束形态学下端的切口处有小米粒状愈伤组织形成。到 25 d 左右又有少数叶圆片的愈伤组织上可长出不定根(占总叶圆片数的 20%以上)或不定芽(占总叶圆片数的 10%以上)(图 2)。更令人兴奋的是,还有个别叶圆片到 30 d 左右在发根的地方又长出芽,在叶圆片没有完全枯黄之前长成小苗(图 3)。可能是由于营养的重新分配,小苗的生长加速了叶圆片的枯黄。

2.3.3 促进种子萌发的活性 由表 1 可见,小麦种

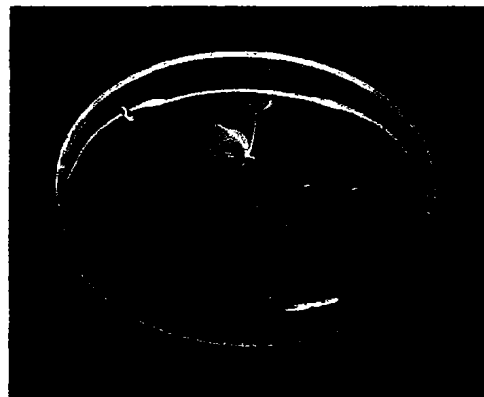


图 3 PGR-08 诱导蒲公英叶圆片建成的小植株
Fig. 3 The small plant induced by PGR-08 from the round slice of Dandelion's leaf

3 小 结

本研究从物理化学性质和生物学活性方面证明 PGR-08 是一种含嘌呤碱的具有植物细胞分裂素活性的化合物。但它又与现有的 ZT、KT 和 N⁶-BA 等人们熟知的嘌呤类细胞分裂素有明显不同,这些都难溶于水,使用麻烦,而 PGR-08 却极易溶于水,使用方便。我们还发现它在植物组织培养方面比现在常(下转第 469 页 Continue on page 469)

- 46.
- Hou XW(侯学文), Guo Y(郭 勇). 2000. The effect of the quantity of inoculation and the concentration of sugar on the growth speed of the cells of the rose eggplant (接种量及蔗糖浓度对悬浮培养玫瑰茄细胞生长的影响)[J]. *Journal of South China Agricultural University*(华南农业大学学报), **21**(4): 51—54.
- Matsui K, Kaji Y, Kajiwara T, *et al.* 1996. Developmental changes of lipoxygenase and fatty acid hydroperoxidase lyase activities in cultures cells of *Marchantia polymorpha*[J]. *Phytochemistry*, (41): 177—182.
- Matsuo A, Ono K, Hamasaki K, *et al.* 1996. Phaeophytins from a cell suspension culture of the liverwort *Plagiochila ovalifolia*[J]. *Phytochemistry*, (42): 427—430.
- Nabeta KT, Ohata T, Sato S, *et al.* 1996. (Spiro-lactone diterpenes from *in vitro* cultures of the liverwort, *Heteroscyphus planus*[J]. *Phytochemistry*, (41): 581—587.
- Stafford AM, Smith L. 1986. Effects of modification of the primary precursor level by selection and feeding on idolealkaloid accumulation in *Catharanthus roseus*. In Morris P, Scragi AH, Stafford AM, *et al.* (eds). *Secondary Metabolism in Plan Cell Culture*[M]. Cambridge: Cambridge University Press, 250.
- Tazaki H, Soutome K, Nabeta H, *et al.* 1996. Pinguicoline derivatives from an axenic culture of the liverwort *Aneura pinguis*[J]. *Phytochemistry*, (42): 465—468.
- Takami T, Yasunaga M, Takio S, *et al.* 1988. Establishment of suspension cultures of cells from the hornwort *Anthoceros punctatus*[J]. *J Hattori Bot Lab*, **64**: 429—435.
- Wang D(王 东), Li QR(李启任), Wang JH(王建华). Suspension culture of the cells of *Berberis Pruinosa* Franch and correlative physiological and biochemical speciality(粉叶小檗细胞的悬浮培养及某些相关的生理生化特性)[J]. *Plant Physiology Communication*(植物生理学通讯), 1997, **33**(2): 91—94.
- Xing JM(邢建民), Zhao DX(赵德修), Li MY(李茂寅), *et al.* 1998. The culture of the suspended cells of *Acetabularia* snow lotus and the synthesis of the active component of flavone(水母雪莲悬浮培养细胞生长和黄酮类活性成分合成)[J]. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), **40**(9): 836—841.
- Xu CX(徐产兴). 1986. Studies on the cultured *Marchantia polymorpha* and the DNA of its chloroplast(地钱培养物及其叶绿体 DNA 的研究)[J]. *Journal of Cell Biology*(细胞生物学杂志), **8**(3): 100—110.
- Zhou CJ(周春江), Li WD(李卫东), Ge HB(葛会波). 2002. The constitution of strawberry' suspended cells and the influence of some factors(草莓悬浮细胞系的建立及某些影响因素)[J]. *Plant Physiology Communication*(植物生理学通讯), **38**(1): 22—24.

(上接第 463 页 Continue from page 463)

用的 ZT、KT 和 N⁶-BA 等有些独特的活性(另文报告)。所以值得进一步深入研究。

参考文献:

- 西北农学院, 山东农学院. 1980. 植物生理学实验指导 [M]. 济南: 山东科技出版社, 60—63.
- Xu HY(许鸿源). 1986. Isolation and primary identification of the substances capable of sustaining green coloration in root exudates of sugar-cane(甘蔗伤流液中保绿

活性物质的分离与初步鉴定)[J]. *Guihaia*(广西植物), **6**(3): 230—234.

- Xu HY(许鸿源), Zhou QW(周歧伟), Yang MC(杨美纯), *et al.* 1995. Effect of PGR-08 on wheat seeds germination and seedlings growth. (PGR-08 对小麦种子萌发与幼苗生长的影响)[J]. *Journal of Guangxi Agricultural University*(广西农业大学学报), **14**(3): 213—216.