

## 甘蔗伤流液中保绿活性物质的分离与初步鉴定

许鸿源

(广西农学院植物生理教研室)

**摘要** 通过化学与物理学方法,从甘蔗(Sugar-cane)伤流液中分离出五种活性因素,对离体叶片有不同程度的保绿效应。依其化学性质判断,应属嘌呤化合物,可能是细胞分裂素物质。

**关键词** 甘蔗伤流液;保绿作用;嘌呤;细胞分裂素

众所周知,离体叶片比正常叶片容易变黄枯死。Chibnall<sup>[6]</sup>的研究证明,只要能诱导离体叶片生根,就可大大延缓其衰老进程。Mothes<sup>[13]</sup>进一步发现,激动素(kinetin)可以代替根的某些作用,使离体叶片保持绿色。因此,一些学者<sup>[12]</sup>先后从十多种植物的根中寻找天然的类似激动素的生理活性物质。根系伤流液(root exudate)被认为是研究这一课题比较理想的实验材料。六十年代初期,金成忠等<sup>[11]</sup>、kende<sup>[11]</sup>和韩碧文等<sup>[8]</sup>分别在丝瓜、向日葵和玉米的伤流液中发现了种类不同的保绿活性物质。近年,莫家让<sup>[2]</sup>报告甘蔗伤流液对离体叶片也有明显的保绿效应,只是对有效成分未能进一步分离鉴定。本文报告甘蔗伤流液中保绿活性物质的分离及初步鉴定结果。

### 材 料 和 方 法

**一、材料** 实验用甘蔗品种为“台糖134”。4月份种植,8—10月份生长旺盛期采集伤流液。

#### 二、方法

1. 伤流液的采收与处理:为避开昼间高温,减少污染,伤流液的采集在下午6点钟至第二天早晨8点钟进行。从地面以上第二个节间切断茎秆(谨防劈裂),按图1所示,用酒精消毒过的橡胶奶头、玻璃弯管和三角烧瓶收集伤流液。

伤流液收回后,逐瓶用精密pH试纸检查,将pH $\leq 6.0$ 的各瓶合并。然后抽滤,除去可能会有的茎髓残渣。

2. 伤流液的初步分离:根据我们对玉米伤流液研究的结果<sup>[8]</sup>,估计甘蔗伤流液中的保绿活性成分也是嘌呤化合物。因此,利用嘌呤可与银盐生成专性沉淀的原理<sup>[8]</sup>,直接进行分离。用量筒取一定体积的伤流液,加硫酸调至pH=1.0~1.5,再加20% AgNO<sub>3</sub>,至沉淀完全。离心(2,000转/

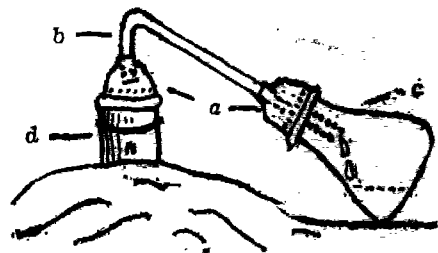


图 1 甘蔗伤流液的收集

a. 橡胶奶头; b. 玻璃弯管;  
c. 三角烧瓶; d. 甘蔗残茎。

本项工作得到莫家让、林炎坤先生的支持,并承汪碟、刘景丽同志帮助,谨致谢意。

分钟, 25分钟) 收集沉淀。用预先冰冻好的稀  $\text{AgNO}_3$  反复洗涤沉淀 3 次, 离心除去洗涤液。然后在  $60^\circ\text{C}$  恒温水浴上用  $0.5\text{ N HCl}$  对沉淀提取 5 次, 每次半小时。合并提取液, 在  $60^\circ\text{C}$  恒温下浓缩至干。再反复加适量重蒸馏水, 反复蒸干, 以除去  $\text{HCl}$ 。将浓缩物稀释成一定浓度, 做生物鉴定, 或者继续做薄层分离。

3. 银盐沉淀物的薄层分离: 取一定体积伤流液的银盐沉淀, 溶于 95% 乙醇中, 用定量毛细管点样。吸附剂为微晶纤维素, 展开系统为正丁醇: 异丙醇: 浓氨水: 水 = 1: 6: 2: 1。在  $30^\circ\text{C}$  下展开 45 分钟。然后在 254 nm 紫外光下检查荧光斑点, 并配合  $\text{AgNO}_3$ -溴酚兰试剂显色进行斑点定位<sup>[14, 15]</sup>。用不锈钢铲刮下带有荧光斑点的纤维素, 移入试管中, 用重蒸馏水反复洗脱, 至检查不出荧光为止。合并洗脱液, 调至一定浓度进行生物鉴定。

4. 生物鉴定: 保绿活性鉴定所用材料为蒲公英 (Dandelion) 叶圆片 ( $\phi 1\text{cm}$ )。在  $\phi 7$ — $9\text{ cm}$  的培养皿中, 先垫上用重蒸馏水饱和了的滤纸, 再注入一定浓度的被试样品溶液, 最后均匀摆入叶圆片。每个样品处理 3 个重复 (3 只培养皿), 每个重复 10 个叶圆片。在室内散射光及  $20$ — $25^\circ\text{C}$  条件下进行培养, 逐日观察叶色的变化。以重蒸馏水或纤维素的重蒸馏水提取液为对照。

## 实验结果

一、原伤流液的保绿作用 对照 (重蒸馏水) 组的叶圆片一般能存活 3—4 天, 而伤流液处理的叶圆片可存活 6—8 天, 从而证明甘蔗伤流液确有保绿作用。这与莫家让<sup>[2]</sup>用甘蔗离体叶片所做的实验结果是一致的。

二、银盐沉淀物的保绿作用 用重蒸馏水将银盐沉淀物配成相当原伤流液浓度不同倍数的溶液进行保绿试验, 结果见表 1。

表 1 银盐沉淀物的保绿作用  
Table 1 Effect of silver salt precipitation on sustaining green coloration

处理浓度 (相当原伤流液的倍数) Treated concentration (Times match with original exudate)	0(水) (water)	0.5×	1×	10×
叶圆片存活天数 Survival days of the round flakes of isolated leaves	3—4	6—8	10—12	18—20

表 1 说明甘蔗伤流液中的保绿活性物质可以生成银盐沉淀而被分离出来。同时, 对离心分离时的上清液进行生物试验, 证明这种分离基本是完全的。

三、薄层分离斑点的化学性质及保绿作用 实验证明, 甘蔗伤流液的银盐沉淀物经纤维素薄层分离, 在 254 nm 紫外光下可检查出 5 个荧光斑点。自下而上依次编号为 (1)、(2)、(3)、(4) 和 (5), 如图 2 所示。其中 No. (1)、(3)、(5) 在紫外光下呈紫褐色, (2)、(4) 呈亮绿色。因为它们都能在酸性条件下与银盐生成沉淀, 并可被  $\text{AgNO}_3$ -溴酚兰试剂显色, 所以可能是嘌呤类化合物。

生物鉴定的结果(见表2)表明,上述5种嘌呤化合物均有不同程度的保绿作用。其中(2)、(4)最强,(1)最弱。但是从层析斑点的大小来判断,(2)、(4)在伤流液中的含量较少,(5)则较多。

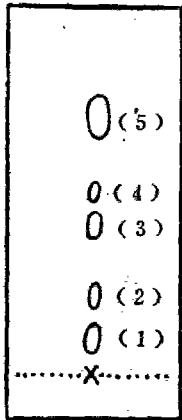


图2 银盐沉淀物的薄层分离

吸附剂:纤维素。

展开剂:正丁醇(butanol (1))、异丙醇(propanol-(2))、氨水(28%)、水(1:6:2 1:1)。

表2 薄层层析斑点的保绿作用  
Table 2 Effect of TLC-spots on sustaining green coloration

处理样品*	纤维素重蒸馏水 提取液(对照) Redistilled water extract of cellulose (ck)	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
5天后保绿程度** Degree of sustaining green coloration after 5 days	黄、死 yellow and dead	++	+++++	+++++	+++++	+++++
8天后保绿程度 Degree of sustaining green coloration after 8 days	—	黄、死 yellow and dead	++++	++	++++	++
10天后保绿程度 Degree of sustaining green coloration after 10 days	—	—	+++	+	+++	黄、死 yellow and dead

\* (1)~(5)的处理浓度皆相当原伤流液浓度的5倍。

The treated concentration of No. (1)~(5) was 5 times matched with original exudate.

\*\* 叶圆片的原始绿色记为“++++”,变黄而未死记为“+”。

“++++” = The original green coloration of the round flakes “+” = The flakes which turned yellow but not dead.

### 讨 论

我们的研究表明,甘蔗伤流液中至少存在五种保绿活性物质。虽然还有待进一步鉴定其化学结构;但是根据它们都能在酸性条件下与银盐生成沉淀,并可被AgMO<sub>3</sub>-溴酚兰试剂显色等化学性质及在紫外线下呈现荧光的物理学性质来判断,可能是嘌呤化合物,应属细胞分裂素类物质。由于结构上的细小差异,使它们表现出不同程度的生物活性。

Chibnall<sup>[6]</sup>和Сабинин<sup>[10]</sup>早年都提出过根系以激素或核酸衍生物影响地上器官活力的假设。Entsch和Letham等<sup>[7]</sup>根据近些年的研究工作指出:“细胞分裂素这类植物内源激素是在根系合成,并通过木质部移往地上器官调节那里的发育与衰老”。我们的工作

对上述观点显然是个支持, 尽管根系不一定是植物合成细胞分裂素的唯一器官。Itai [9, 10] 和 Atkin [4] 等人更认为, 细胞分裂素是把土壤条件(温度、水分和营养等)变化的信息送向苗端的传递者之一。也就是说, 细胞分裂素和根系合成的其他激素在栽培措施和农作物的地上生长之间起着重要的纽带作用。我们在用银盐沉淀分离保绿物质的同时, 也确实发现上清液中含有促进离体叶片衰老变黄的物质(另文报告)。因此, 进一步弄清不同的栽培措施怎样影响土壤条件的变化, 这些变化又如何影响根系对细胞分裂素的合成及其与别种内源激素的动态平衡等问题, 对于人们能动地调控农作物的地上生长, 提高栽培的经济效益, 无疑是有积极意义的。

### 参 考 文 献

- (1) 金成忠等, 1964: 根系伤流液及其有效成分对离体叶片活力维持的效应, 植物生理学报, 1: 1-8.
- (2) 莫家让, 1981: 甘蔗根系活力的研究, 广西植物, 1(1): 25-30.
- (3) 韩碧文等, 1966: 玉米伤流液中生理活性物质的研究, I 伤流液中保绿活性物质的分离与鉴定, 植物生理学报, 3: 175-184.
- (4) Atkin, R. K., Barton, C. E. and Robinson, D. K., 1973: Effect of root-growing temperature on growth substances in xylem exudate of *Zea mays*. *J. Exp. Bot.*, 24: 475-484.
- (5) Chibnall, A. C., 1939: "Protein metabolism in the plant." Yale Univ. Press, New Haven, Conn.
- (6) Chibnall, A. C., 1954: Protein metabolism in rooted runner-bean leaves. *New Phytol.*, 53: 31-37.
- (7) Entsch, B., Letham, D. S., Parker, C. W., Summons, R. E. and Gollnow, B. I., 1979: Metabolites of cytokinins. in Skoog, F., ed. 1981, *Plant growth substances 1979*, Proceedings of the 10th international conference, July 22-26, 1979., P. 109. Springer-Verlag.
- (8) Gerhard Schmidt, 1957: *Methods in Enzymology*, vol., P. P. 747-775.
- (9) Itai, C. and Vaadia, Y., 1975: Kinetin-like activity in root exudate of water-stressed sunflower plants. *Physiol. Plant*, 18: 941-944.
- (10) Itai, C., Ben-zioni, A. and Ordin, L., 1973: Correlative changes in endogenous hormone levels and Shoot growth induced by short heat treatments to the root. *Physiol. Plant*, 29: 355-360.
- (11) Kende, H., 1964: Preservation of Chlorophyll in leaf sections by substances obtained from root exudate. *Science*, 145: 1066-1067.
- (12) Letham, D. S., 1967: Chemistry and Physiology of kinetin-like compounds. *Ann. Rev. plant physiol.*, 18: 352.
- (13) Mothes, K., 1960: über das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. 47: 337-351.
- (14) Srivastava, B. I. S., 1963: Investigation of purine-like compounds in immature maize kernels, germinating barley seeds and yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, 103: 200-205.
- (15) Wood, T., 1955: A reagent for detection of Chloride and certain purines and

pyrimidies on paper chromatograms. *Nature*, 176(4473):175—176.

(16) Д.А. 萨比宁 (Д.А. Сабпини), 1956: 根系在植物生命活动中的意见, 科学出版社, 北京。

## ISOLATION AND PRIMARY IDENTIFICATION OF THE SUBSTANCES CAPABLE OF SUSTAINING GREEN COLORATION IN ROOT EXUDATE OF SUGAR-CANE

Xu Hong-yuan

(Guangxi Agricultural College, Nanning)

**Abstract** Five physiological active factors capable of sustaining green coloration of detached leaf were isolated from root exudate of sugar-cane by chemical and physical means. According to their chemical properties they were probably purine-like compounds and should belong to cytokinins.

**Key words** Root exudate of sugar-cane; Action of sustaining green coloration; Purine; Cytokinin