

无菌培养下植物离体根分泌物中的游离生长素*

黃維南 楊乃博 孫惠珍 湯玉璋

(中国科学院植物生理研究所)

我們在离体番茄根尖无菌培养的过程中,发现当根生长到一定时期以后,組織开始“老化”,部分顏色变褐,而且随着年龄的增长,“老化”的程度也加深。Street^[1] 曾經认为这种衰老現象可能和根中天然生长素的累积有关。关于根中能否形成生长素物质的問題,在二十和三十年代虽然有過爭論,但是,近几年来有些工作已得到肯定的結果^[2,3,4]。

植物根系能分泌有机物质到外部介质中的問題,在我們以及其他作者的工作中都有过报导^[5],但是植物根系能否分泌生长素物质到外部介质中,則还不清楚。我們在这方面进行了一系列的研究,現將主要結果报导如下。

將番茄(“大紅袍”品种)离体根尖接入改进过的无菌 White 培养液中,并置放在 26°C 恆温的暗室里培养,每隔 5 天定期取样測定根的鮮重,同时分析培养液中的酸性游离生长素。生长素采用 Larsen^[6] 的乙醚提取法进行提取,并經碳酸氢鈉提純^[7],純化后的生长素物质,用紙上层析法进一步分离,层析紙为杭州滤紙(长 30 厘米、寬 2 厘米),溶剂系統系异丙醇:氨:水(10:1:1),在 21°C 的恆温条件下,紙譜于溶剂中上行展开 18 小时,然后取出并用热风吹干,生长素物质在溶剂系統展开后的 R_f 值,用小麦芽鞘伸长的生物鉴定法和 Salkowski 反应进行測定。

一、番茄离体根分泌物中生长素物质的鉴定

1. 小麦芽鞘伸长試驗

以小麦芽鞘切段伸长为指标,进行生长素的測

定,方法基本上采用 Bonner 所提出并为許多研究者所改进的燕麦切段法^[7]。把上述紙譜剪成 6 段(每段 5 厘米长),分別放入含有 1% 蔗糖的磷酸-檸檬酸緩冲液里,小麦芽鞘切段經无离子水漂洗 2 小时后,即放到这些处理溶液中,在黑暗条件下,于轉动器上培养 18 小时,然后用投影法測量切段的长度,結果如图 1 所指出,对小麦芽鞘伸长有較大促进作用的是在 R_f 0.4—0.58 的区域,这一 R_f 恰与 IAA 的 R_f 相一致。

2. Salkowski 反应

当紙譜用显色剂(1 毫升 0.5M 氯化鉄和 50 毫

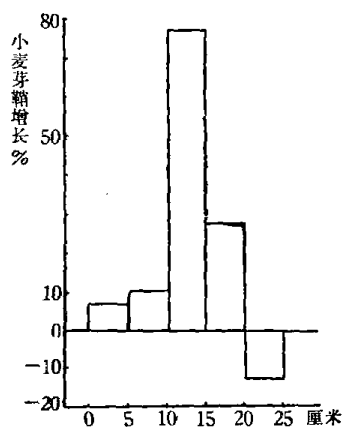


图 1 番茄离体根分泌物中生长素物质对小麦芽鞘伸长的影响

生长素物质系从 6 瓶(每瓶盛 40 毫升溶液,內接入一段根尖)培养 30 天的番茄离体根培养液中提取的

* 生长素的分离、鉴定技术曾得到許德威、沈鎮德二同志的帮助,特此志謝。

升的5%过氯酸混合液)进行显色时, 則形成深紅色斑点, 其 R_f 也正和 IAA 的 R_f 相一致(图 2)。

3. IAA 氧化酶的試驗

湯玉璋和 Bonner^[8] 曾經認為 IAA 氧化酶对基質专一性的程度較高, 因此, 我們根据他們的方法

从黃化的黃豆幼苗里制备 IAA 氧化酶, 把具有活性以及杀死后的酶液分別加入生长素物質的試驗溶液中, 并用小麦芽鞘切段伸长法鉴定其生物活性, 結果如图3, 加活酶处理者 IAA 的活性几乎全部消失。这一結果和上面两个試驗的結果相符, 說明番茄离体根分泌物中促进小麦芽鞘伸长的生长素物質主要的是 IAA。

二、番茄离体根分泌物中酸性游离生长素含量的变化动态

我們在番茄离体根尖无菌培养期間, 发现在接种后的最初 15 天内, 根的生长迅速上升, 但在 15—40 天内, 生长已經停止, 而外部溶液中的游离生长素含量, 在接种后的最初 25 天内, 随年龄增长而不断累积, 特別是在 20—25 天内含量最多, 以后, 則随年龄的增加而显著下降(图 4)。图 4 指出, 根的生长曲綫和外部溶液中游离生长素累积的曲綫規律基本上一致, 但是根的生长高峯在生长素累积之前。分別測定生长 20 天的离体根及在此期間分泌物中的游离生长素含量, 发现后者比前者多 10 倍, 可能根中合成的生长素除了一部分呈結合状态、另一部分为根中的 IAA 氧化酶系統所破坏以外, 根系为了調节本身不断合成的生长素的平衡, 还把部分生长素分泌到外部溶液中, 随着外部溶液中游离生长素的不断累积, 根的进一步生长就受到抑制。我們在

图 2 番茄离体根分泌物中游离生长素的化学鉴定(Salkowski 反应)
1——IAA 的标准液;
2——分泌物中的生长素物質 (从 6 瓶培养 25 天的培养液中提取的)

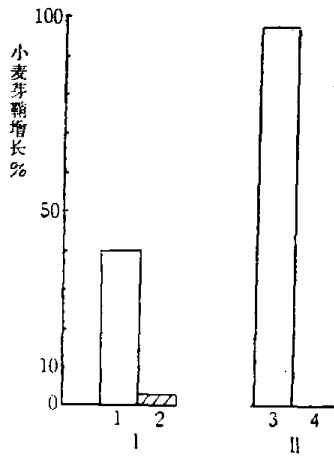


图 3 加 IAA 氧化酶的試驗
I——生长素物質系从培养 14 天的溶液(9 瓶)中提取的; II——生长素物質系从培养 25 天的溶液(6 瓶)中提取的。 1—加死酶; 3—不加酶; 2、4—加活酶

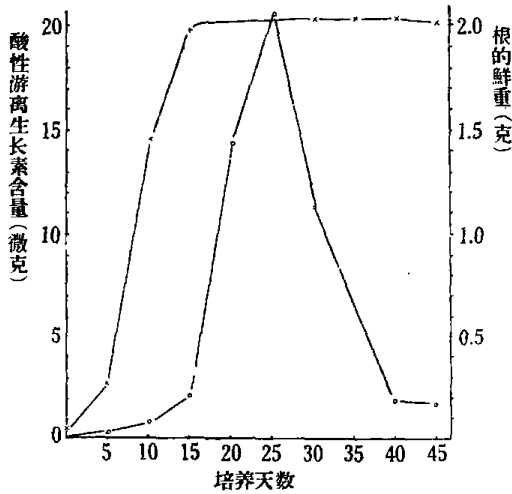


图 4 番茄离体根分泌物中酸性游离生长素含量的变化动态
×—× 根的鮮重(克); ○—○ 生长素含量(微克)
· 生长素物質系从 12 瓶培养液中提取的

外部溶液中还发现有 IAA 氧化酶系统的存在, 25 天以后外部溶液中生长素含量的急剧下降, 可能和它们遭受 IAA 氧化酶的破坏有关。更详细的結果我们将在不久以后报导。

- [1] Street H. E., VI Biochemistry of morphogenesis, (1958).
[2] Britton G., Housley S. and Bentley J. A., *J. Exp. Bot.*, **7**, 239 (1956).

- [3] Thurman D. A. and Street H. E., *J. Exp. Bot.*, **11**, 188 (1960).
[4] Sircar S. M., Arati Ray, *Nature*, **190**, 4,780 (1961).
[5] 黄維南、楊乃博, 中国植物生理学会第一届年会論文(摘要)集, (1963)。
[6] Larsen P., 載 *Modern Methods of plant Analysis*, IV, 565—625 (1955).
[7] 关穎謙, 載罗士韦等編《植物激素》第 3 章(1963)。
[8] Tang Y. W. and Bonner J., *Arch. Biochem.*, **13**, 11—25 (1947).

蟾蜍卵巢中 3β -羟类固醇脱氢酶的存在及其意义*

邹继超 张致一

(中国科学院动物研究所)

类固醇激素在两栖类和鱼类排卵过程中的作用及其意义最近有过报道和討論^[1,2,3], 孕酮及其结构类似的激素, 在离体下都有诱导排卵的效能。但是若要确定这类激素在低等脊椎动物正常生理情况下是否参与排卵过程, 則首先需要証明这一类动物的卵巢能够分泌孕酮或其类似物。根据 Peronen 和 Rapola^[4] 的报道, 应用組織化学方法, 他們在蟾蜍和南非有爪蟾 (*Xenopus*) 的卵巢中未能发现有 3β -羟类固醇脱氢酶的存在, 因而认为这类动物的卵巢不能合成孕酮。另一方面, Chieffi^[5] 应用生化方法却在蟾蜍卵巢中提取出孕酮。因此, 两栖类卵巢究竟有否 3β -羟类固醇脱氢酶的存在, 仍是一个未能肯定的問題。由于这个問題涉及激素与排卵关系中的一个重要环节, 所以有必要进一步予以澄清, 下面的实验就是为此目的而设计的。

实验动物为冬蟾中华大蟾蜍 (*Bufo bufo gargarizans*), 方法系将新鲜卵巢块悬挂或浸泡在浓度为 $5\mu\text{g/ml}$ 的孕醇酮 (Pregnenolone) 两栖类生理盐水溶液中, pH 调节在 7.4, 于 $21^\circ\pm 1$ 的温箱内孵育 18—20 小时, 孵育完毕即将生理盐水用 5:1 体积

乙酸乙酯提取 2 次。提取液收集后在 $35^\circ-40^\circ\text{C}$ 水溶液中减压蒸发, 遺留物溶于少量氯仿, 吹干后再在真空干燥器内减压干燥, 然后进行薄层层析。吸附剂为上海试剂厂出品的氧化铝 (A. R.), 經酚酞試驗为碱性, 用乙酸乙酯浸泡 48 小时, 然后用抽滤法除去乙酸乙酯, 氧化铝經乙醇洗涤三次后, 再用蒸馏水洗到无乙醇气味为止。經酚酞試驗无颜色反应, 然后烘干过筛, 再在 120°C 烘烤 24 小时。层析板的规格为 $23\times 9\times 0.2\text{cm}$ 玻璃板; 利用玻璃棒推成一定厚度的薄层, 然后点样。溶剂系統为重蒸馏的甲醇/苯 (2.5%), 展层后用 2,4-二硝基苯肼^[6] 溶液显色。孕酮呈橙黄色, 孕醇酮呈淡黄色。卵巢代謝物样品展层显色后出现两个斑点, A 和 B (图 1)。A 的 R_f 值与标准孕醇酮 (C) 一致, B 則与标准孕酮 (D) 一致, 显色也完全符合, 即 A 为淡黄色, B 为橙黄色。以上結果清楚地指出孕醇酮經与

✎

* 作者們对中国医学科学院藥物研究所黄量先生及强則銀、肖玉霞等同志技术上的协助和指导, 深致謝意。参加这项工作的还有杜軒峯同志。