

微生物产生的细胞分裂素

贾 小 明

(浙江农业大学环保系, 杭州 310029)

细胞分裂素(cytokinin)是一类重要的植物激素。它的主要生理功能是刺激细胞分裂, 促进侧芽发育, 维持蛋白质和核酸的合成, 延缓离体叶片衰老等作用。细胞分裂素可用于蔬菜保鲜、防衰和延长贮藏期以及花卉保绿和延长开花期等。在组织培养工作中, 细胞分裂素也是分化培养基中不可缺少的常用化合物。

天然细胞分裂素广泛存在于高等植物中, 也是许多微生物的代谢产物^[1]。植物体内细胞分裂素含量很低, 一般为 $10^{-7} \sim 10^{-9}$ g 鲜重, 并且含量极不稳定, 随植物生育期、生长季节和植株部位的不同而变化。目前商品细胞分裂素^[2]主要来源于有机化学多步合成, 因其产率低、价格昂贵, 生产规模仅能满足试剂级水平, 并且有些种类我国目前尚不能合成, 依赖进口, 严重影响了人们在农业生产和生活上的需要。而微生物具有生长速率快、生产周期短、培养条件易控制不受季节限制等特点, 故用微生物生物合成、发酵生产细胞分裂素已引起各国学者的兴趣和重视, 并开展了微生物源细胞分裂素的研究^[3~5]。本文着重介绍微生物源细胞分裂素的研究概况。

1 微生物源细胞分裂素的种类及其化学结构

细胞分裂素是植物激素中较年青的一员。1955年, Miller 和 Skoog 等人在培养烟草髓部组织时, 发现在培养基中加入酵母汁, 可促进烟草髓部的细胞分裂, 将这种能诱导细胞分裂的

物质分离、提纯后命名为激动素(kinetin, 缩写 KT), 即 N^6 -呋喃腺嘌呤(6-furfuryladenine)。激动素是 DNA 的降解产物, 并不是天然的植物生长调节物质。第一个天然存在的细胞分裂素为玉米素(zeatin, 缩写 Z)是 Letham 于 1963 年首次从甜玉米粒中提取并结晶出来的。Letham 于 1964 年确立了玉米素的结构式为 6-(4-羟基-3-甲基-2-反式-丁烯氨基)嘌呤, 其生物活性大约是激动素的 10 倍。此后, Letham 等人又相继发现了几种玉米素的衍生物。为了使用名称方便和减少混乱, Skoog^[6]等建议把具有与激动素相同的促进细胞分裂和其他生理功能, 在第六位置取代的氨基嘌呤类物质命名为细胞分裂素(cytokinin, 简称 CTK)。1966 年, Klamt D^[7]等人从带化病棒杆菌(*Corynebacterium fascians*)的培养液中分离到 CTK, 这是首次有关微生物源细胞分裂素的报道。迄今在微生物中发现的 CTK 已有十余种, 其中以反式玉米素活性最高。反式玉米素分子式为 $C_{10}H_{13}N_5O$, MW = 219.2, 熔点 206~208℃, 摩尔吸光系数为 16.5×10^3 270nm pH7.2。各种 CTK 的生物活性与其 N-6 位上侧链长度、侧链上是否存在双键、双键位置以及侧链的构型等有很大关系^[8,9]。一般认为侧链的最适长度为 5~6 个碳, 需有双键

1995-09-15收稿

存在,双键位置在 3~4 位上,反式构型则活性大。图 1 是在微生物中发现的几种 CTK 的化学结构。

2 产细胞分裂素的微生物

2.1 带化病棒杆菌 (*Corynebacterium fascians*)

最早检测到的能分泌 CTK 的微生物是带化病棒杆菌。最初推测带化病棒杆菌能产生 CTK 是基于这样一个事实,即带化病棒杆菌引起的植物病症与用激动素或玉米素处理豌豆种子或浇灌健康幼苗得到的结果相似。Thimann 和 Sachs^[10]首先证实了这一推测。

他们采用两种生物测定法(豌豆芽法和燕麦叶绿素保持法)鉴定培养在无嘌呤基质上的带化病棒杆菌,证实其发酵液的氯仿萃取液具有 CTK 活性。而同样培养的另一株白喉棒杆菌(*C. diphtheriae*)的氯仿萃取液则无 CTK 活性。此后人们又结合用质谱、uv 等理化方法测定带化病棒杆菌产生的 CTK,共检测到 7 种,即异戊烯基腺嘌呤(2iP)、异戊烯基腺嘌呤核苷(2iPA)、核糖基玉米素、顺式玉米素、反式玉米素、顺式-甲硫基-玉米素和 6-甲基氨基嘌呤(me^6Ade)。而具生物活性的 CTK 主要是 2iP 和玉米素。

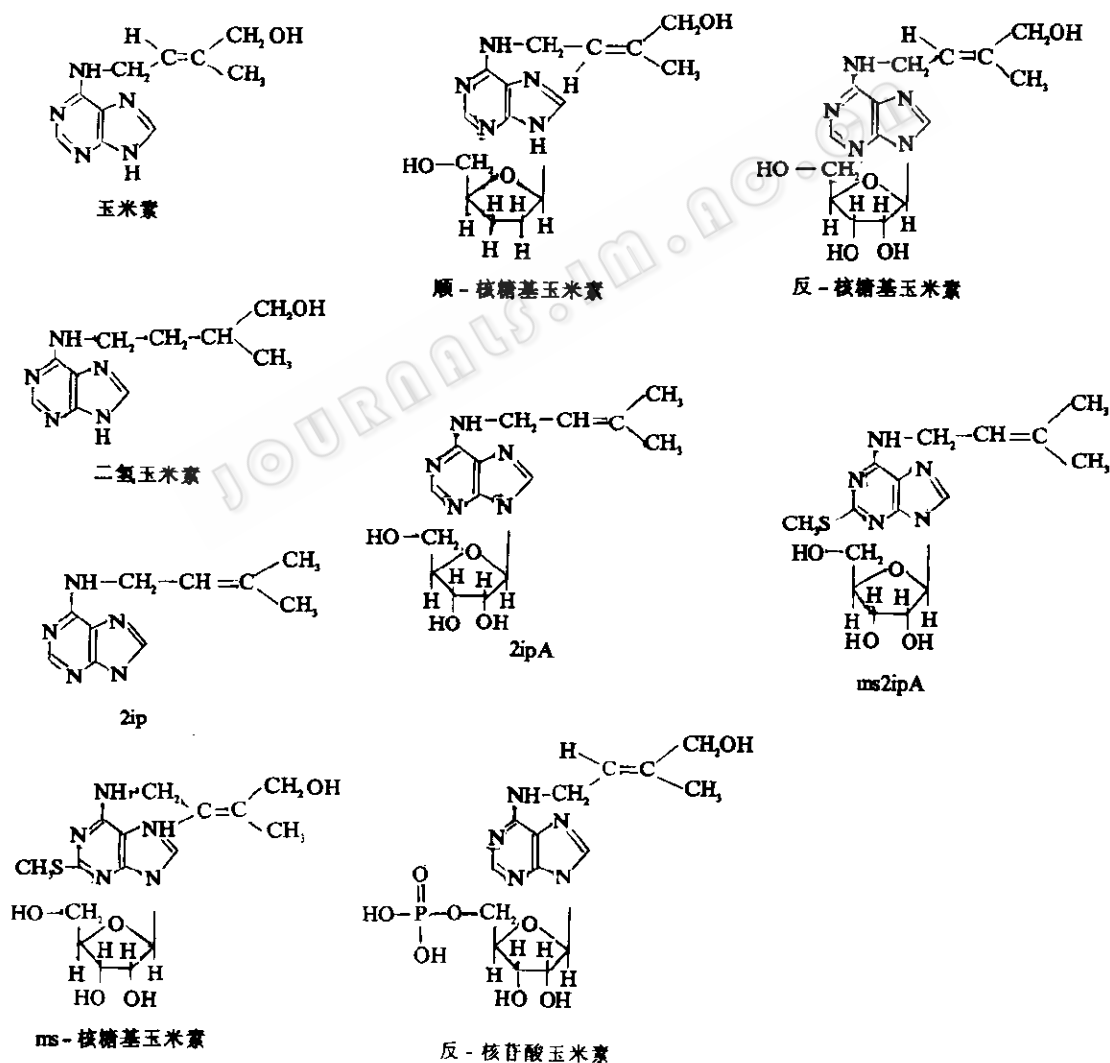


图 1 几种主要的微生物源细胞分裂素的化学结构

Murai^[11]等人比较了五株带化病棒杆菌的毒性与 CTK 产量的关系。这五株菌株是:强毒性菌株 MW₂ 含两个质粒,其中一个大的质粒分子量 > 10⁸u。中等毒性的菌株 Cf1 和 Cf2 各含三个质粒,其中一个是小分子量的质粒。低毒性菌株 Cf15 有一个小分子量的质粒。无毒株 Cf16 无质粒。结果发现:①除去 MW₂ 和 Cf1 菌株中较小的质粒,菌株未丧失致病力。②强毒性菌株培养基中 CTK 活性比中等毒性株 CTK 活性大 20~50 倍,而中等毒性株 CTK 活性又比弱毒性和无毒性株的 CTK 活性大 10 倍。这表明菌株的毒性程度与分泌的 CTK 产量有关。

2.2 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)

1967 年, Klämbt 报道了另一植物病原菌——根癌农杆菌 B₆ 菌株培养滤液具 CTK 活性。用纸层析和 uv 光谱鉴定为 2iP。根癌农杆菌是许多双子叶植物的病原菌,它能在宿主植物的感染部位引起冠瘿瘤 (grown gall tumor), 伴随着肿瘤的生长,能大量合成细胞分裂素和生长素。Kaiss-Chapman 和 Morris^[4]报道他们的实验菌株 C₅₈ 静止期的培养液中有 7 种 CTK, 主要是 2iP、反式-玉米素和甲硫基-核糖基玉米素,此外,还有少量的 2iPA、顺式-玉米素、反式核糖基玉米素和 ms-2iPA。其中玉米素的顺反异构体之比为 15:85。这表明培养液中的核糖核苷可能是 tRNA 代谢产物,因为后四种在 tRNA 的水解物中都能检测到。

关于根癌农杆菌分泌 CTK 的机理, Regier 和 Morris^[12]的研究表明只有那些带有冠瘿碱 (nopaline) Ti 质粒菌株才能分泌反式玉米素,其产量大约为 200~800ng/L 发酵液。消除了冠瘿碱 Ti 质粒的菌株和带有章鱼碱 (octopine) 或农杆菌碱 (agropine) 质粒的菌株不产生玉米素,但消除了冠瘿碱质粒的菌株重新获得冠瘿碱质粒能恢复产玉米素特性。

2.3 萨氏假单胞菌 (*Pseudomonas savastanoi*)

1975 年 Surico^[13]报道了萨氏假单胞菌的培养滤液中含有 2iP 和 2iPA,而且还鉴定出在其滤液中还含有 1-甲基-反式玉米素。

MacDonld^[5]测定了萨氏假单胞菌 PB213-2 菌株的产量为玉米素和核糖基玉米素各 80ng/ml 发酵液。而萨氏假单胞菌 EW1006 菌株含玉米素 400ng/ml 发酵液和反式-1-甲基玉米素 180ng/ml 发酵液,其产量比根癌农杆菌 C₅₈ 株大 1000 倍。与根癌农杆菌相同,这两株萨氏假单胞菌也携带 CTK 合成基因的质粒。

P. savastanoi EW1006 菌株含有 2 个质粒,分别具 105 和 81 个碱基对,能分泌玉米素、核糖基玉米素和 1-甲基-反式玉米素核苷。丢失含 105 个碱基对的质粒则丧失产 CTK 的能力。

P. savastanoi PB213-2 有 5 个质粒 (分别含 64、56、48、42、38 个碱基对),主要分泌玉米素和核糖基玉米素。如丧失 42 个碱基对的质粒即丧失分泌玉米素和核糖基玉米素的能力。将萨氏假单胞菌 EW1006 株质粒上大约 105 个碱基对的基因克隆到大肠杆菌中能够表达出具二甲丙烯基转移酶并分泌玉米素。MacDonld (1986) 通过分析,发现萨氏假单胞菌中的 CTK 合成基因和根癌农杆菌中的细胞分裂素合成基因的核苷酸顺序有很高的同源性。农杆菌中控制 CTK 生物合成的异戊烯基转移酶基因被称作 *ipt* 和 *tzs*,而在萨氏假单胞菌中则称 *ptz*。*tzs* 和 *ptz* 之间同源性为 48%,而 *ipt* 和 *ptz* 之间同源性约为 44%。

2.4 根瘤菌 (*Rhizobium*)

关于根瘤菌产生 CTK 的研究远不如根癌农杆菌或萨氏假单胞菌那样详尽。Phillips 和 Torrey^[14,15]用纸层析分析根瘤菌培养物,结果表明大豆根瘤菌对数生长期分泌玉米素和核糖基玉米素类化合物。豌豆根瘤菌分泌 2iP 类化合物。由于这些化合物含量甚微,尚未能结晶提纯出来。根据生物法 (大豆愈伤组织) 测定,大豆根瘤菌分泌的 CTK 相当于 1μgKE/L 培养基,豌豆根瘤菌分泌的 CTK 总活性为 0.3μgKE/L 培养基。

根瘤菌也载有质粒,但这些质粒缺乏显性的遗传标志,因此无法证实根瘤菌的感染性与它的质粒有关,也未能阐明质粒与根瘤菌产生

CTK 的关系。

2.5 弗兰克氏菌(Frankia)

Stevens^[16]报道了一种分枝丝状的放线菌能引起木本植物(赤杨)根瘤并进行共生固氮的弗兰克氏菌培养液中存在 CTK,经高效液相和气-质色谱确定弗兰克氏菌 HFPArI₃ 菌株培养液中约含 iPA1ng/ml。

此外,原核生物中能分泌 CTK 的微生物还有从热带植物叶瘤中分离到的蓝黑色杆菌(*Chromobacterium lividum*);从山毛榉(beech)根表分离到的浅黄链霉菌(*Streptomyces flaveolus*);油菜根系的节杆菌(*Arthrobacter* sp);植物根表的维氏固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)等都能分泌具 CTK 活性的物质,但这些信息都是基于生物测定的结果,而不是来自于理化性质的鉴定。

2.6 真菌

Miller^[17](1967)最先报道了菌根真菌玫红根须腹菌(*Rhizopogon roseolus*)产生的反式玉米素和反式核糖基玉米素。据报道能产生 CTK 的真菌还有樱外囊菌(*Taphrina cerasi*)牛肝菌(*Boletus edulis*)和甘蓝根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)等病原真菌。对这些真菌分泌 CTK 的机理和遗传背景(是由核基因,还是由细胞器基因编码)尚不清楚。

表 1 归纳了已检知的产细胞分裂素的微生物,从这些不完全的信息中可以看出能分泌 CTK 的微生物主要是那些能感染植物的微生物,而且大部分是植物病原菌或与植物共生以及在植物根际、根表、根系或叶表等处生长的微生物。这为我们分离产 CTK 的微生物提供了重要信息。

表 1 已检测到分泌细胞分裂素的微生物

微生物	细胞分裂素的种类	微生物	细胞分裂素的种类
带化病棒杆菌(<i>Corynebacterium fascians</i>)	2iP	大豆根瘤菌(<i>R.japonicum</i>)	玉米素
	2iPA		核糖基玉米素
	核糖基玉米素	蓝黑色杆菌(<i>Chromobacterium lividum</i>)	未知
	顺式-玉米素	节杆菌(<i>Arthrobacter</i> sp.)	未知
	反式-玉米素	维氏固氮菌(<i>Azotobacter vinelandii</i>)	未知
	ms-顺式-玉米素	雀稗固氮菌(<i>A.paspali</i>)	未知
	6-甲基氨基嘌呤	拜氏固氮菌(<i>A.beijerinckii</i>)	未知
根癌农杆菌(<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	2iP	浅黄链霉菌(<i>Streptomyces flaveolus</i>)	未知
	反式-玉米素	弗兰克氏菌(<i>Frankia</i> sp.)	2iPA
	2iPA	玫红根须腹菌(<i>Rhizopogon roseolus</i>)	反式-玉米素
	顺式-玉米素		反式-核糖基玉米素
	反式-核糖基玉米素	<i>Suillus punctipes</i>	玉米素
	ms-2iPA		顺式-核糖基玉米素
	ms-核糖基玉米素	樱外囊菌(<i>Taphrina cerasi</i>)	玉米素
萨氏假单胞菌(<i>Pseudomonas savatanoi</i>)			核糖基玉米素
PB213-2 菌株	玉米素	生囊丛赤壳(<i>Nectria galligena</i>)	未知
	核糖基玉米素	<i>Exobasidium myrtilli</i>	未知
EW1006 菌株	核糖基-1-甲基玉米素	<i>E.uvae-grsi</i>	未知
	玉米素	<i>Monilia fructicola</i>	未知
豌豆根瘤菌(<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	2iP		

3 微生物细胞 tRNA 中的细胞分裂素

CTK 还存在于各种生物的 tRNA 上。表

2 列出了微生物细胞 tRNA 中的 CTK 种类。tRNA 具携带和输送特定的氨基酸功能。CTK 结合在紧靠 tRNA 反密码子 3'-端处。但并不是所有的 tRNA 都结合有 CTK。只有编码氨基酸的密码碱基顺序以 U(尿嘧啶)为起始密码子的 tRNA 才有,而且也不是所有以 U 为起始氨基酸编码的 tRNA 上都带有 CTK。例如大肠杆菌^[18]的 tRNA 在六种以 U 为起始的 tRNA 中都结合着 CTK,即苯丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸、半胱氨酸和色氨酸的 tRNA 带有 CTK,但在酵母菌中,只有亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸和半胱氨酸的 tRNA 有 CTK。微生物细胞 tRNA 中的 CTK 只有当细胞裂解、tRNA 降解后方能释放。表 2 可见

微生物的 tRNA 中的 CTK 主要是 2iPA 和核糖基玉米素以及这两种化合物的甲基硫衍生物。

关于 CTK 结合在 tRNA 上的意义^[1],有人认为是游离的 CTK 可能来源于 tRNA 分子的降解,CTK 与 tRNA 脱离以后,才具有植物激素活性。但存在于细胞 tRNA 上的 CTK 量极少,而游离 CTK 的量相比之下要多得多,这就无法解释这一推测。亦有人认为游离 CTK 与 tRNA 的 CTK 无关系,因为已有证据表明 CTK 合成途径中并不涉及 tRNA。此外还有人认为游离 CTK 具有抑制 tRNA 中 CTK 降解的作用。总之,关于 CTK 与 tRNA 结合的意义是有争论的,有待以后的研究来阐明。

表 2 微生物细胞 tRNA 中的细胞分裂素

微 生 物	与 tRNA 结合的细胞分裂素	微 生 物	与 tRNA 结合的细胞分裂素
大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)	2iPA ms-2iPA	节杆菌(<i>Arthrobacter</i> sp.)	2iPA
嗜酸乳杆菌 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)	2iPA	铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	ms-核糖基玉米素
植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	2iPA	枯草杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)	ms-2iPA
表皮葡萄球菌 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	2iPA, ms-2iPA	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	ms-2iPA
带化棒杆菌 (<i>Corynebacterium fuscians</i>)	2iPA, ms-2iPA 顺式-核糖基玉米素 反式-核糖基玉米素 顺式-ms-核糖基玉米素	根癌农杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)	2iPA, ms-2iPA 反式-核糖基玉米素 ms-核糖基玉米素 顺式-ms-核糖基玉米素
大豆根瘤菌(<i>R. japonicum</i>)	核糖基玉米素 ms-核糖基玉米素	解淀粉欧文氏菌 (<i>Erwinia amylovora</i>)	ms-2iPA
豌豆根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	ms-2iPA 顺式-ms-核糖基玉米素	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	2iPA
		樱外囊菌(<i>Taphrina cerasi</i>)	核糖基玉米素

4 微生物培养物中 CTK 的分离纯化和鉴定

微生物发酵液一般都要先离心,离心后的上清液仍不能直接用于 CTK 的生物法测定,因其中有许多对植物有毒害的干扰成分,故应先进行分离纯化。

在微生物源 CTK 的早期研究中^[7, 15],人们往往采用各种纸层析、薄层层析或阳离子交换树

脂进行分离纯化,以后又有用 Sephadex LH-20 的^[19]。一个更为简便的方法是用 Water 公司的产品 Sep-pak C₁₈ 筒柱从微生物发酵上清液中富集提纯 CTK,效果较满意。此外, C₁₈/porasil B, C₁₈Bond Elut 等也有类似作用。只是须注意随着此类柱的使用次数增加, CTK 的回收率会逐步下降。常规的分离纯化

过程还包括聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的应用和正丁醇的分溶。近年来,也有用免疫亲和层析法^[20, 21]从微生物发酵上清液中分离纯化CTK的,但尚不普及。

CTK因其有嘌呤核,故呈特征性的强烈紫外吸收,这一特征为高效液相色谱(HPLC)进行CTK定性定量测定提供了基础。目前HPLC已发展成CTK分析的主要方法之一^[22],其检测灵敏度可达ng级水平。甲基化或三甲基硅烷化的样品也可用气相色谱(GC)分析。而气相色谱-质谱联用(GC-MS)则是鉴定未知植物激素最有力的工具。

此外,70年代末发展起来的放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA)已成为植物激素研究中大量样品分析定量的一种更迅速、更灵敏的检测方法^[23~25]。

除了理化分析外,植物激素都需生物法鉴定。CTK的生物鉴定方法约有20余种^[26],各有优缺点,本文不一一赘述。一般而言,烟草茎髓和大豆子叶的愈伤组织测定法是CTK定性测定的经典方法,只是需时颇长(2~3周)。人们如需快速测定的话,可用萝卜子叶^[27]和苋属生物测定法^[26],这对合成化合物或部分提纯的提取物不失为一个较为理想的测定方法。CTK生物活性常以“KE”(kinetin equivalents)表示,即以激动素为标准,样品中含有相当于若干单位激动素活力的细胞分裂素。

5 结语

微生物源细胞分裂素的研究目前尚处于初步“检测”水平,而关于微生物体内CTK的代谢途径的信息则是零碎的、不完全的。开展微生物产CTK生理生化、遗传背景的研究必定有益于CTK高产菌株的获得。微生物细胞较植物细胞简单、易培养、生长速率快,且微生物产生的植物激素种类较单一,这为探索、弄清CTK在生物体内的代谢研究提供了新的更为方便的实验材料,也是微生物发酵生产细胞分裂素的潜力所在。

致谢 本文承蒙钱泽澍教授审阅、修改,深表谢意。

参考文献

- [1] Greene E M. Bot Rev, 1980, 46: 25~74.
- [2] 戎积圻, 山四妹, 马建国, 生物化学与生物物理进展, 1980, 6: 43~45.
- [3] Helgeson J P, Leonard N J. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56: 60~63.
- [4] Kaiss-Chapman R W, Morris R O. Biochem Biophys Res Commun, 1977, 76: 453~459.
- [5] MacDonld E M S, Powell G K, Regier DA, *et al.* Plant physiol, 1986, 82: 742~747.
- [6] Skoog F, Strong F M, Miller C O. Science, 1965, 532~533.
- [7] Klämbt D, Thies G, Skoog F. Proc Natl Acad Sci USA, 1966, 56: 52~59.
- [8] 李雄彪, 张金忠. 简明植物生物化学. 天津: 南开大学出版社, 1992, 276.
- [9] 陶国清, 章一安, 植物生理生化进展, 1986, 4: 74~98.
- [10] Thimann K V, Sachs T. Am J Bot, 1966, 53: 731~739.
- [11] Murai N, Skoog F, Doyle M E. Proc Natl Acad Sci USA, 1980, 77: 619~23.
- [12] Regier D A, Morris R O. Biochem Biophys Res Commun, 1982, 104: 1560~1566.
- [13] Surico G, Sparapano L, Lerario P. Experientia, 1975, 31: 929~930.
- [14] phillips D A, Torrey J G. Physiol plant, 1970, 23: 1057~1063.
- [15] phillips D A, Torrey J G. Plant Physiol, 1972, 49: 11~15.
- [16] Stevens G A Jr, Berry A M. Plant physiol, 1988, 87: 15~16.
- [17] Miller C O. Science, 1967, 157: 1055~1057.
- [18] Armstrong D J, Burrows W J, Skoog F, *et al.* proc Natl Acad Sci USA, 1969, 63: 834~841.
- [19] Cames M G, Brenner M L, Andersen C R. J Chromatogr, 1975, 108: 95~106.
- [20] Macsonld EMS, Morris RO. Methods Enzymol, 1985, 110: 347~358.
- [21] Morris R O, Jameson P E, Laloue M, *et al.* plant physiol, 1991, 95: 1156~1161.
- [22] Arteca R N, Poovaiah B W, Smith O E. Plant physiol, 1980, 65: 1216~1219.
- [23] Eberle J, Arnscheidt A, Klix D, *et al.* Plant Physiol, 1986, 81: 516~521.
- [24] Trione F J, Krygier B, Banowetz G W, *et al.* J Plant Growth Regul, 1985, 4: 101~109.
- [25] Weiler E W. Annual Review of plant Physiology, 1984, 35: 85~95.
- [26] 丁 静, 浓镇德, 方亦雄, 等. 植物生理学通讯, 1979, (2): 27~39.
- [27] Esashi Y, Leopold A C. Plant Physiol, 1969, 44: 618~620.