

枣疯叶内游离氨基酸纸层析的研究

莽克强 李德葆* 王小凤 蔡泽民

(中国科学院微生物研究所, 北京)

枣树感染枣疯病毒后的叶内游离氨基酸的变化, 无论在量上或种类上远比一些草本植物感染病毒后所引起的变化剧烈得多。枣疯叶内多种游离氨基酸的浓度几乎在整个枣生长季节内大量持续增高, 病叶游离氨基酸的总量高出健叶约 10—15 倍, 谷酰胺和天门冬酰胺高出健叶 4—5 倍。病叶内精氨酸也不正常的积累, 而健叶很少有精氨酸出现。特别值得注意的是病叶中含有健叶所没有的 A 和 B 两种物质。初步分析这两种物质可能是由 5—6 种氨基酸所组成。酸枣叶内的 A、B 在 270 毫微米有吸收高峰。疯枝上表面看来是“正常”的叶片也有类似的不正常变化, 可见枣树感染枣疯病毒后病叶的代谢受到严重干扰。

枣树感染枣疯病毒后在生理上发生了什么变化呢? 这个问题的研究可能对于诊断枣疯病以及了解病毒增殖与寄主代谢间的关系有一定意义。我们于 1964 年初步分析了疯枣叶内和健枣叶内游离氨基酸的变化。关于树木感染病毒后的游离氨基酸变化的研究较少。Diener 报道过桃树感染西方 X 病毒、马哈利樱桃感染环斑病毒或花叶病毒后叶内游离氨基酸的变化情况^[1]。本文的研究发现, 疯枣叶内积累大量游离氨基酸并存在健叶中没有的 A 和 B 两种物质, 其生理作用和在诊断上的意义值得注意。

材料和方法

材料 病和健的河南新郑灰枣叶, 原北京林业科学院大枣叶(品种不详)和北京香山酸枣叶(品种不详)。大枣叶是天然疯的, 其它两种疯枣叶是皮接接种后发病的。

方法 游离氨基酸的提取、定性、定量分析方法与以前所用方法相同^[2]。

结 果

一、病、健枣叶中氨基酸种类的变化

从枣疯树花变叶开始(约在六月中旬)直到健枣树落叶(约 10 月底), 在不同时期系统地分析了河南新郑灰枣健叶和疯叶内的游离氨基酸。九次测定的结果(表 1 和图 1)表明, 在几乎是枣的整个生长季节内, 疯叶和健叶内一致含有的游离氨基酸和酰胺是: 天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、丙氨酸、缬氨酸、苯丙氨酸、亮氨酸、脯氨酸、天门冬酰胺和谷酰胺等十种。其中亮氨酸的出现不够稳定, 可能与质点位于纸谱前缘常受干扰有关。脯氨酸在前期(30/VII 以前)不出现, 而后期才出现, 似乎愈到后期质点颜色愈浓。疯叶与健叶不同之处是: (1) 疯叶内一直有精氨酸, 质点很清楚, 健叶内只有一次出现精氨酸, 质点也不清晰; (2) 疯叶内含有健叶所没有的或偶有的 A、B、C、E 四个未知点; (3) 疯叶中偶然出现酪氨酸, 健叶没有。

对北京香山酸枣和北京林科院大枣的疯叶、健叶的分析(酸枣测定二次, 大枣测定一次)结果和新郑灰枣结果相同(图 2)。

* 浙江农业大学进修教师。

本文于 1973 年 12 月 27 日收到。

表 1 河南新郑灰枣疯叶、健叶内游离氨基酸种类

样 品 时 间 氨 基 酸	病 叶										健 叶									
	29 VI	17 VII	20 VII	31 VII	20 VIII	6 IX	27 IX	8 X	31 X		29 VI	17 VII	20 VII	31 VII	20 VIII	6 IX	27 IX	8 X	31 X	
天 门 冬 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
天 谷 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
丝 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
丙 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
缬 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
苯 丙 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
亮 氨 酸	-	-	-	+	-	-	-	-	-		-	+	-	+	-	-	-	-	-	
脯 氨 酸	-	-	-	+	+	+	+	+	+		-	-	-	+	+	+	+	+	+	
天 门 冬 酰 胺	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	+	+	-	+	+	+	+	
天 谷 氨 酰 胺	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
酪 氨 酸	-	+	-	-	-	-	+	+	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
精 氨 酸	+	+	+	+	+	+	+	+	-		-	+	-	-	-	-	-	-	-	
A	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
B	-	-	+	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
C	-	-	+	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	-	-	+	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-	-	-	-	-	

注：20/VII—31/X的结果是1963年采样；29/VI和17/VII是1964年采样病叶都是花变叶后的小疯叶；表内是180毫克鲜叶重的结果。

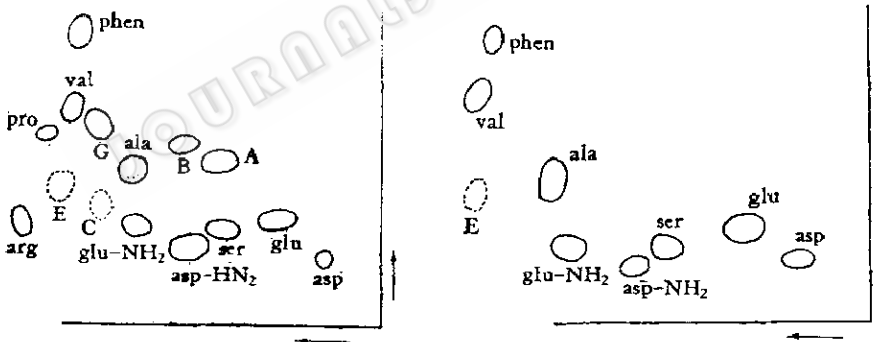


图 1 新郑灰枣疯叶和健叶内游离氨基酸纸层析图谱

左：疯叶 右：健叶
phen 苯丙氨酸，val 缬氨酸，pro 脯氨酸，ala 丙氨酸，arg 精氨酸，glu-NH₂ 谷酰胺，
Asp-NH₂ 天门冬酰胺，ser 丝氨酸，glu 谷氨酸，asp 天门冬氨酸

对疯枣树脱落性果枝上的“正常”叶片（在外表上与健叶无区别）也做了测定。两次实验结果（大枣 1/VI 采样一次，新郑灰枣 29/VI 采样一次）指出，所谓“正常”叶片中除有和健叶相同的十种氨基酸和酰胺外，也有健叶所没有的精氨酸和 A、B 物质，但含量远不如疯叶中多（直接观测色

泽）（图 3）。可见疯枣脱落性果枝上“正常”叶片和疯叶内氨基酸的变化是相同的，说明枣疯后不仅影响了疯叶内的生理代谢，也影响了附近“正常”叶内的代谢。

二、疯叶和健叶游离氨基酸量的变化
用肉眼直接观察层析图谱，各种氨基酸斑点的颜色深浅可以明显的看出：枣疯

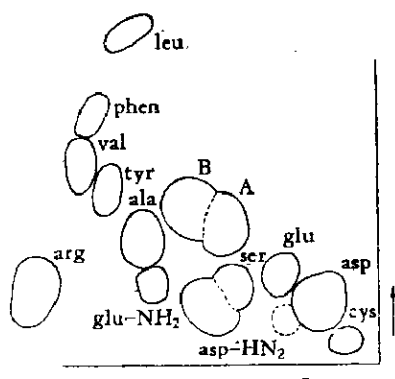


图2 北京香山酸枣疯叶内游离氨基酸纸层析图谱
leu 亮氨酸, tyr 酪氨酸, cys 胱氨酸,其他同图1。

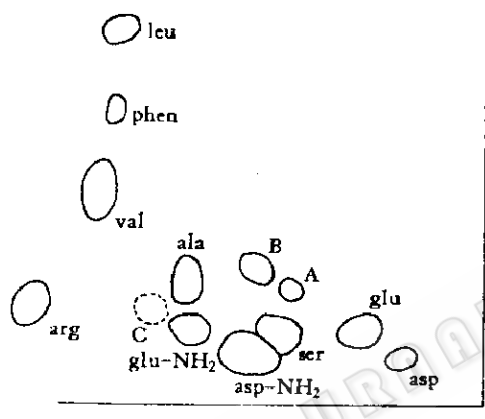


图3 新郑灰枣花变叶的脱落性果枝上的所谓
“正常”叶片内游离氨基酸纸层析图谱
(图3、6、7、8中的符号与图1、2注释相同)

后叶内各种游离氨基酸和酰胺的量都显著增加,天门冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、丙氨酸、缬氨酸、天门冬酰胺和谷酰胺较显著,其中尤以二种酰胺的量增加为突出;脯氨酸的增减情况与其他氨基酸稍有不同,在生长后期(8/X—31/X)无论病叶或健叶的脯氨酸量都大大增加,而其他氨基酸同时期内有减少的趋势。

将氨基酸斑点颜色洗下用72型分光光度计在570毫微米测其光密度,结果与上述肉眼观察是一致的(图4)。比较病叶、健叶内几种主要氨基酸的光密度:病叶的天门冬氨酸、丝氨酸、丙氨酸、缬氨酸最高

值比健叶高出2—3倍;谷氨酸、谷酰胺和天门冬酰胺高出约4—5倍。疯叶内游离氨基酸的增加不是暂时的,从花变叶开始直到生长后期,病叶内游离氨基酸总比健叶高。

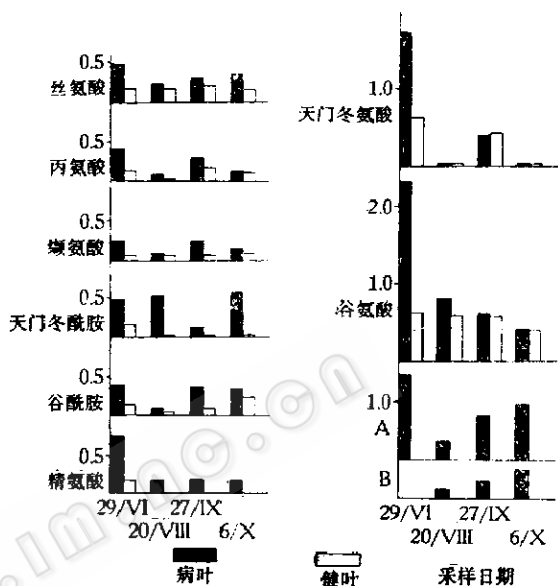


图4 新郑灰枣病、健叶内主要几种游离氨基酸含量(光密度/180毫克鲜叶重)

用疯叶和健叶的游离氨基酸提取液不经纸层析,直接用茚三酮反应测其光密度值,几次测定结果,疯叶与健叶的光密度比值在5—15倍范围之内。疯叶游离氨基酸和酰胺总量大大超过健叶。

三、A和B物质的一些特性

从前面结果可看出:无论所测的不同种或不同品种的枣树,只要感染枣疯病毒,发病后的疯叶内都有A、B二物质,这是和健叶在游离氨基酸组分上很显著的差别之一。A、B二物质的 R_f 值似乎又不象是氨基酸,有必要对这二种物质作进一步的鉴定。

1. A和B物质的紫外吸收特性 游离氨基酸提取液经纸层析分离后,在用茚三酮显色前将A、B二物质分别剪下,同时剪下谷氨酸和空白纸作对照。用0.01N盐

酸洗脱 8 小时以上, 离心, 去纸毛, 在 238 毫微米下测光密度。以后将该样品蒸干 (60—70℃), 以重蒸过的 5.6 N 盐酸在 110℃ 水解 24 小时, 再将样品蒸干, 用相同体积的 0.01 N 盐酸溶解, 再测 238 毫微米下的光密度, 结果见表 2。

表 2 A 和 B 物质在盐酸水解前后
在 238 毫微米下光密度的比较

样 品	所测物质	光 密 度	
		水 解 前	水 解 后
1964. 8. 31 大 枣 疯 叶	A	0.050	-0.015
	B	0.103	0.017
	谷 氨 酸	0.012	0.011
1964. 9. 23 大 枣 疯 叶	A	0.152	0.005
	B	0.172	0.007
	谷 氨 酸	-0.044	-0.066

注: 表内数值是该物质光密度和对照之差。

结果指出, A、B 物质经水解后在 238 毫微米处的光密度大大下降, 而单纯的谷氨酸水解前后光密度无明显变化, 初步证明 A、B 二物质不是单一的氨基酸, 可能是肽。

A 和 B 用 0.01 N 盐酸洗脱后, 不经水解直接测定紫外吸收光谱的结果是, 大枣病叶二次测定 (31/VIII 和 25/IX 采样) 在 270 毫微米未见有吸收高峰; 酸枣病叶在 17/VII 和 14/VIII 采样的也没有吸收高峰, 但在 1964 年 25/IX 和 1963 年 27/IX 所采酸枣疯叶的 A、B 二物质在 270 毫微米有吸收高峰 (图 5)。这一现象似乎说明酸枣后期疯叶内的 A 和 B 物质可能还含有嘌呤或嘧啶碱基之类的物质。

2. A 和 B 物质的氨基酸组份 A 和 B 经盐酸水解后, 蒸去盐酸, 用水再溶解, 做双向层析, 再用茚三酮显色。新郑灰枣样品 6 次, 酸枣样品 2 次的分析结果指出, 物质 A 和 B 可能是由天门冬氨酸、谷氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和缬氨酸等五种氨基酸组成的, 偶然出现亮氨酸 (图 6、7、8)。

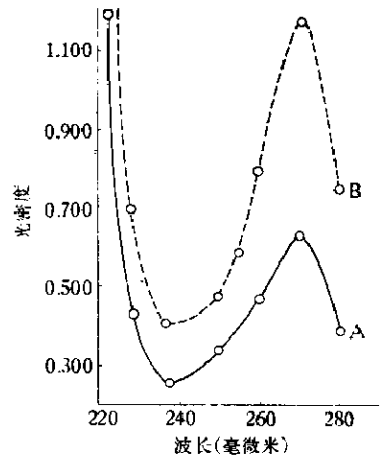


图 5 1964. 9. 25 采的酸枣疯叶 A 和 B 物质的紫外吸收光谱

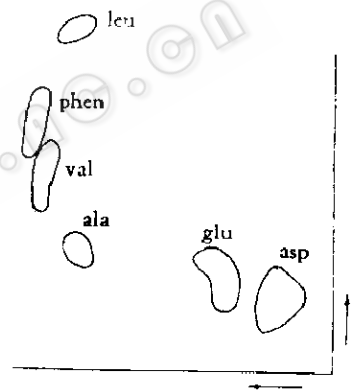


图 6 新郑灰枣疯叶内 A 物质的氨基酸组份

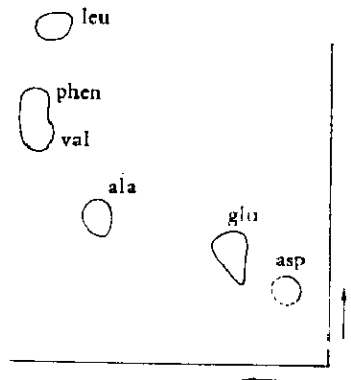


图 7 新郑灰枣疯叶内 B 物质的氨基酸组份

根据 A、B 二物质水解前后紫外吸收特性和水解后的纸层析鉴定, 证明它们是肽类物质, 是几肽? 是否还有其他成分, 如

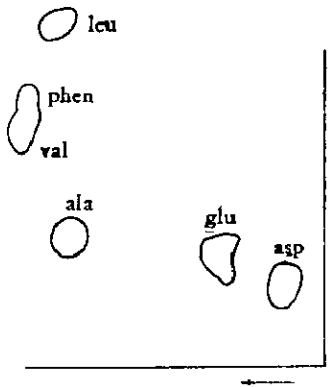


图8 北京香山酸枣疯叶内B物质的氨基酸组份

嘌呤、嘧啶碱基？还需进一步研究。若将氨基酸提取液在透析袋内对水透析30小时（3小时换一次水）再用纸层析检查，发现A、B二物质与其他氨基酸一起能渗出透析袋。可见A和B的分子量是不太大的。关于C、E两个层析点未进行工作。

讨 论

枣树疯后的叶内游离氨基酸的变化，就我们所知，无论在量上或种类上的改变，远比一些草本寄主感染病毒后所引起的变化剧烈得多。与已报道过的有关材料比较，枣疯叶内游离氨基酸提取液组份的变化有如下特点：

一、量的变化很显著 不同种的枣（大枣或酸枣）或同一种不同品种的枣树疯后，疯叶内氨基酸总量高出健叶约10倍以上，其他氨基酸也普遍增高，尤其是谷氨酸、谷酰胺或天门冬酰胺高出4—5倍。这种普遍而又是大幅度的增加，似乎不可能是由于疯叶与健叶含水量悬殊，用鲜叶重表示定量单位所造成的。这种量的变化比烟草感染TMV^[3]，番茄感染TSWV^[4]，白菜感染芜菁花叶病毒^[2]或桃感染西方X病毒^[1]等一些花叶型病状所引起的氨基酸的变化要剧烈的多，这似乎反映出丛枝病状的枣疯病树叶内氮代谢遭到较严重的干

扰。精氨酸、谷酰胺和天门冬酰胺，这些都是氮代谢的中间体，这类物质的积累在很多其他病毒-寄主组合中也相当普遍，有一定的代表性。如苹果感染锈果病毒^[5]，白菜感染芜菁花叶病毒^[2]，以及桃感染西方X病毒^[1]的病叶都有精氨酸的积累；玉米感染粗缩病毒（Rough dwarf）^[6]，木瓜感染卷缩病毒^[7]，蓖麻感染花叶病毒^[8]，以及烟感染TMV的叶内^[9]都有谷酰胺或天门冬酰胺的积累。因此在植物病理学上这是值得深入研究的线索。

二、几乎在整个生长季节中疯叶内都维持着高浓度的氨基酸 一年生草本寄主感染病毒后的叶内或根内游离氨基酸的增高是暂时的，后期则重新获得代谢的平衡，恢复与健叶相似的水平，如烟草感染TMV^[3]，番茄感染TSWV^[4]，白菜感染芜菁花叶病毒或YMV₁₅^[2]等。但桃感染西方X病毒或樱桃感染环斑病毒后，叶内脯氨酸、精氨酸或pepicolic酸的增高持续时间很长，这和枣疯树的情况相似，这种一致也许并非偶然，可能与多年生的寄主代谢特点有关？

三、疯叶内出现两种物质 根据纸层析的分析，初步证明健叶中是没有A、B两个物质的。它们是病毒侵入后寄主蛋白质代谢的不正常产物呢还是病毒合成的中间产物呢？酸枣的A、B物质初步证明可能含有嘌呤或嘧啶碱基也值得注意。腺嘌呤能促进烟茎段生芽，含有碱基的A和B是否和枣疯树不定芽、隐芽的大量萌发有关？有待进行研究。

参 考 资 料

- [1] Diener, T. O.: *Phytopathology*, 50:141, 1961.
- [2] 莽克强、李德葆、王小凤: 植物病理学报, 7 (2): 117, 1964.
- [3] Commoner, B. & Nehari, V.: *J. Gen. Physiol.*, 36:791, 1953.

- [4] Selman, I. W. et al.: *Ann. Appl. Biol.*, **49**:601, 1961.
- [5] 袁维蕃、王祈楷、吴松棠：科学通报，**9**：278, 1958.
- [6] Harpaz, I. & Applebaum, S. W.: *Nature*, **192**:780, 1961.
- [7] Laloraya, M. M. & Govindjee, R. V.: *Experientia*, **12**:58, 1956.
- [8] Rajarao, P.: *Flora*, **143**:635, 1956.
- [9] Porter, C. A.: *Advan. Virus Res.*, **6**:75, 1958.

PAPER CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF FREE AMINO ACIDS AND AMIDES IN JUJUBE LEAVES INFECTED BY JUJUBE WITCH'S BROOM VIRUS

MANG KEI-CHIANG, LEE TECH-BAO
WANG XIAO-FENG, TSAI TSE-MIN

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Peking*)

Paper chromatographic determinations showed that the changes of free amino acids and amides in jujube leaves (*Zizyphus jujuba* and *Z. spinosus*), infected by jujube witch's broom virus (JWBV), were qualitatively and quantitatively quite evident and steady, in contrast with some herbaceous host-virus combinations.

Almost during the whole growing season, the total amounts of free amino acids and amides in the infected jujube leaves were much higher approximately 10—15 times than those in the healthy leaves. A steady increase of serine, alanine, valine, asparatic acid, glutamic acid, especially arginine, glutamine and

asparagine was noted; glutamine and asparagine were 4—5 times higher.

In addition, two substances, A and B, were found only in the infected leaves of both species. Preliminary analysis showed that these substances might consist of 5—6 amino acids each. These substances from *Z. spinosus* showed a maximum ultraviolet absorption at 270 m μ .

The accumulation of amino acids, amides and the presence of two substances in "normal-looking" leaves on infected branches indicated that the effect of JWBV infection on host metabolism is far beyond the virus-bearing leaves.