

灰葡萄孢 BC4 菌株产生天然脱落酸的研究^{*}

王 惠^{1,2}, 钮绪燕¹, 张 建¹, 董金皋², 商鸿生¹

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100;

2 河北农业大学 真菌毒素实验室, 河北 保定 071001)

[摘 要] 用柱层析和制备 HPLC 法从灰葡萄孢 BC4 菌株的 PD 培养滤液中分离到一种白色固体。经 HPLC-ESIMS, GCMS, IR 和 ¹H NMR 鉴定为脱落酸。生物活性测定结果表明, 该脱落酸的活性是标准脱落酸的 2.5 倍以上; 用 0.7 μmol/L 该物质的丙酮溶液处理反枝苋莠芽种子, 2 d 内反枝苋种子幼芽和幼根均无生长, 而对照的反枝苋种子幼芽和幼根总长度平均为 2.3 cm, 抑制率达 100%。

[关键词] 灰葡萄孢; 脱落酸; 生物活性; 结构鉴定

[中图分类号] S482.2⁺92; S476⁺.1 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2004)11-0034-03

脱落酸(ABA)是一种植物内源激素,属于酸性倍半萜,有右旋体和左旋体之分,同时又有 2-顺式, 4-反式与 2-反式, 4-反式两种几何异构体。其天然形式主要是 2-顺式, 4-反式(+)-ABA, 人工合成的 ABA 是外消旋体, 后者的活性只有前者的 50%。由于人工合成高活性 ABA 成本极高, 而微生物发酵法又难以找到理想的生产菌株, 致使天然脱落酸和人工合成脱落酸在国内外都没有田间大面积应用的实例。因此, 长期以来, 科学家和企业家都在努力寻找天然脱落酸的廉价生产方法。灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是引起植物灰霉病的病原真菌, 可侵染番茄、草莓、黄瓜、莴苣、薯类、葡萄等 200 多种植物, 其中有些寄主的灰葡萄孢可以产生天然脱落酸。吴江等^[1]从灰葡萄孢 A23 菌株的代谢产物中分离到脱落酸; 周金燕等^[2]从以小麦为寄主的菌株代谢产物中鉴定出脱落酸。在产生脱落酸的菌株中, 随菌株不同, 产生脱落酸的量差异很大^[3]。本研究从以番茄为寄主的灰葡萄孢 BC4 菌株代谢产物中分离到天然脱落酸。现将研究结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

材 料 灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)BC4 菌株由河北省蔬菜田番茄上分离得到, 是 7 个地区 11 种菌株中筛选的高活性菌株。标准脱落酸为瑞士进口分装。

供试培养滤液: 将灰葡萄孢 BC4 菌株接入 PD 培养液中, 在 25℃ 黑暗条件下静止培养 20 d, 用 φ 0.6 μm 的滤膜滤去菌丝和孢子, 得到培养滤液。

供试杂草为反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.)种子, 采自河北农业大学植物标本园。

仪 器 LC5500 型制备高效液相色谱, 北京东西电子生产; 600 pump, 996 photodiode array detector 高效液相色谱, 美国 Waters 生产; 1100 型液相色谱-电喷雾质谱联用仪(LC-ESIMS), Agilent 生产; HP5890MS5973 型气-质联用仪(GCMS), 惠普公司生产; X-6 型显微熔点测定仪, 北京泰克仪器有限公司生产; WXG-4 型圆盘旋光仪; NOVA 型 400 MHz 核磁共振仪, 美国 Varian 公司; Nicolet NEXUS 670 FT-IR 红外分析仪; 753B 型紫外可见分光光度计, 上海分析仪器厂。

1.2 方 法

BC4 菌株代谢产物的分离 将培养滤液用等体积乙酸乙酯萃取, 挥发溶剂, 依次进行 3 次硅胶柱层析分离。3 次柱层析的洗脱剂依次为: 乙酸乙酯-甲苯(1:1, 270 mL)-丙酮(100 mL)-甲醇(200 mL); 乙酸乙酯-丙酮(95:5); 氯仿-甲醇(95:5)。将第 3 次柱层析洗脱液中 19 号馏分用制备高效液相色谱 C₁₈柱(40 mm × 300 mm)分离, 用体积分数 70% 甲醇水作流动相, 在 250 nm 波长下分别收集各组分。挥发溶剂后进行活性测定。再用 HPLC Prep Nova-pak HR C₁₈柱(7.8 mm × 300 mm)纯化活性

* [收稿日期] 2004-05-14

[基金项目] 陕西省自然科学基金资助项目(142101); 陕西省农业攻关项目(2003K03-G2-03)

[作者简介] 王 惠(1959-), 女, 陕西临潼人, 副教授, 博士, 主要从事农业及农药化学研究。E-mail: wanghuiab@sina.com

组分, 挥发溶剂, 用苯重结晶。

活性物质的结构鉴定 LC-ESIMS 条件: 雾化压力为 0.28 MPa, 温度为 350 °C, 裂解电压为 70 V, 色谱柱为 Prep Nova-pak C₈ (4.6 mm × 250 mm)。GC-MS 条件: EI 源轰击电压为 70 eV, 色谱柱为 0.53 mm × 30 m FFA P 弹性石英毛细柱, 柱温 50 °C (5 min) ~ 250 °C (10 min), 30 °C /min, 离子源 230 °C, 四极杆 150 °C, 进样口 300 °C。GC-MS 鉴定前先用 BF₃·CH₃OH 对试样进行甲酯化处理; 核磁共振分析用氘代氯仿溶解样品, 以三甲基硅烷为内标; 红外光谱分析采用 KBr 压片法。

生物活性测定 将每步分离的馏分挥发溶剂后, 用丙酮溶解。取质量浓度为 10 g/L 的试样 20 μL 于 2 cm² 滤纸上, 待溶剂挥发后, 将反枝苋催芽种子摆放在上面, 在黑暗条件下保湿培养 2 d。以纯溶剂做对照。统计种子幼根和幼芽的总长度, 计算种子根芽生长抑制率。种子根芽生长抑制率/% = (对照根芽长 - 处理根芽长) / 对照根芽长 × 100^[4]。

2 结果与分析

2.1 组分分离

培养滤液 (10 L) 经乙酸乙酯萃取和柱层析分离后, 收集到 23 个馏分, 其中 19 号馏分对反枝苋种子萌发具有抑制作用。用高效液相色谱分离 19 号馏分, 在 250 nm 波长下出现 7 个峰。收集各峰下的馏分进行活性测定, 结果表明, 保留值为 22 min 的组分对反枝苋种子萌发的抑制作用最大。用半制备 HPLC 纯化该组分, 挥发溶剂得 50 mg 白色固体。

2.2 结构鉴定

物理特性: M_p 160~163 °C (文献值^[5] 160~161 °C)。甲醇溶剂中 UV λ_{max} 为 250~252 nm。旋光度 [α]_D²⁵ = +410~418 ° (c = 0.23, 乙醇) (文献值^[6] +418 °)。用 HPLC 分离纯化 (体积分数 20%~50% 甲醇水做流动相) 时发现, 先出现 1 个尖峰, 但尚未回到基线时立即出现 1 个宽钝峰。这种尖峰后立即出现宽钝峰的现象是羧酸的特性。表明组分分子中有羧基。

LC-ESIMS: 用甲醇溶解试样, 体积分数 70% 甲醇水做流动相检测, 得到 ESIMS *m/z*: 287.0 [M + Na]⁺ (100), 552.1 [2M + Na]⁺ 和 263.1 [M - H]⁻ (100)。表明分子质量为 264.1。

IR 谱: IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$ (cm⁻¹) 数据中含有 2960, 2758, 1667, 1598 的吸收和 2700~2500 的微小吸收。其中 2960, 2758 是羧酸二聚体 ν_{OH} 引起,

1667, 1598 等强吸收带是羰基 $\nu_{\text{C=O}}$ 引起, 2700~2500 的微小吸收是 C-O 伸缩振动和变形振动的倍频和组合频引起^[7]。进一步表明分子中有羧基。这与文献^[5]报道脱落酸的 IR 光谱数据基本一致。

GC-MS: 试样甲酯化后, 用 GC-MS 测得 EIMS (-) *m/z*: 260, 246, 235, 222, 205, 190, 175, 162, 147, 136, 125, 112, 91 等。在相同条件下测得标准脱落酸甲酯得到了完全相同的碎片。

¹H NMR (CDCl₃): δ 7.8 (s, 1H), δ 9.9 (s, 1H), δ 7.81 (d, 1H, H-4), δ 6.16 (d, 1H, H-5), δ 1.94 (s, 3H, H-3Me), δ 2.06 (s, 3H, H-2Me), δ 1.04 (d, 3H, H-6Mea), δ 1.12 (d, 3H, H-6Meb), δ 2.27 (q, 2H, H-5)。表明分子中有 2 个 CH (δ 7.8 和 δ 9.9 两个单峰), 2 个相邻的 CH (δ 7.81 和 δ 7.85 的双重峰与 δ 6.16 和 δ 6.20 的双重峰), 2 个独立 CH₃ (δ 1.94 和 δ 2.06); 2 个同碳 CH₃ (δ 1.04 和 δ 1.12), 2 个同碳质子 (δ 2.27, 2.32 和 δ 2.49, 2.53)。这些信号与脱落酸的¹H NMR 信号^[8]都能一一对应 (表 1)。由表 1 可见, 活性组分的¹H NMR 信号与脱落酸的¹H NMR 信号十分相似。推测活性组分的分子式为 C₁₅H₂₀O₄, 结构式见图 1。

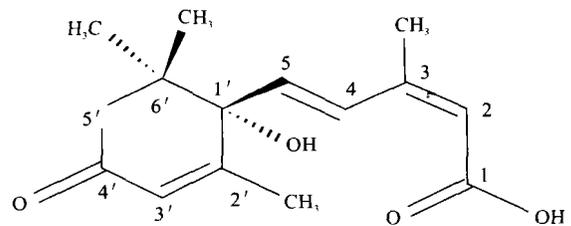


图 1 活性组分的结构式

Fig. 1 Structure of active compound

表 1 ¹H NMR 谱与分子中氢原子的对应关系

Table 1 Description and chemical shift of ¹H NMR

图 1 中的位置 No. of H in Fig. 1	多重性 Multi- plicity	δ /ppm	
		测定值 Determined data	文献值 ^[8] Literature data
C2-H	s	5.78	5.88
C3-Me	s	1.94	1.79
C4-H	d	7.81, 7.85	8.34, 8.51
C5-H	d	6.16, 6.20	6.28, 6.44
C2-Me	s	2.06	1.85
C3-H	s	5.99	5.9
C5-2H	q	2.27, 2.32, 2.49, 2.53	2.16, 2.32 2.49, 2.66
C6-Mea	s	1.04	0.94
C6-Meb	s	1.12	1.09

2.3 生物活性

用浓度为 $0.7 \mu\text{mol/L}$ 白色固体的丙酮溶液 $20 \mu\text{L}$ 处理反枝苋催芽种子, 2 d 内幼芽和幼根无生长, 即抑制率达 100%。对幼根生长的抑制中浓(抑制率达 50% 时的用量)为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 。这与脱落酸可抑制植物种子萌发的特性一致。

用稀溶液进行生物测定发现, 白色固体的活性平均是脱落酸标准品活性的 2.5 倍以上。根据文献报道^[9], 自然界存在的脱落酸几乎都是 2-顺式, 4-反式(+)-ABA, ABA 中只有 2-顺式, 4-反式构型才有活性。脱落酸标准品是人工合成产物, 是外消旋体, 因此活性远低于天然脱落酸。试验结果再次证明, 从灰葡萄孢 PD 培养液中分离的白色固体是自然界存在的活性较高的 2-顺式, 4-反式脱落酸。

3 讨论

关于灰葡萄孢可以代谢产生天然脱落酸已有报道, 但吴江等^[1]报道的菌株是从我国南京蔬菜田分离到的 A 23 菌株, 周金燕等^[2]报道的是从小麦上分离到的一个菌株。本研究发现了以番茄为寄主的 BC4 菌株可以产生天然脱落酸, 以前尚未见报道。BC4 菌株是从采自 7 个地区的 11 个菌株中筛选的高活性菌株, 对其进行开发利用价值较高。

在代谢产物的培养方法方面, 吴江等^[1]利用固体培养方法, 周金燕等^[2]用人工培养基培养, 本研究采用半天然的 PD 培养液培养。由于 PD 培养液成本低, 易操作, 更容易满足工业化生产的要求, 因此用于天然脱落酸生产潜力较大。

[参考文献]

- [1] 吴江, 郑珩, 王鲁燕, 等. 植物病原真菌灰葡萄孢 A 23 产生脱落酸的研究[J]. 中国药科大学学报, 1997, 28(5): 313- 316
- [2] 周金燕, 吴凯宇, 雷宝良, 等. 葡萄灰孢霉代谢产物的分离及生物活性[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(5): 532- 534
- [3] Tudzynski P, Sharon A, Siewers V, et al. Phytohormone production in *Botrytis cinerea* [M]. Sessions of the XII th international *Botrytis symposium*, 2000
- [3] 王惠, 董金皋, 商鸿生. 灰葡萄孢毒素的生物活性和除草活性成分研究[J]. 中国农业科学, 2004, 37(2): 233- 237
- [4] Ohkuma K, Lyon J L, Addocott F T. Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit [J]. Science, 1963, 142: 1592- 1593
- [5] 郑珩, 吴梧桐, 廖建民, 等. 灰绿葡萄孢发酵液中天然型脱落酸的分离纯化[J]. 中国抗生素杂志, 2002, 27(10): 589- 605
- [6] 常建华, 董绮功. 波谱原理及解析[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [8] Loveys B R, Milborrow B V. Isolation and characterization of 1-O-Abscisic acid- β D-glucopyranoside from vegetative tomato tissue [J]. Australian Journal of Plant Physiology, 1981, 8: 571- 589
- [9] 韩德元. 植物生长调节剂—原理与应用[M]. 北京: 科学技术出版社, 1997. 30

Isolation and identification of abscisic acid from BC4 isolate of *Botrytis cinerea*

WANG Hui^{1,2}, NIU Xu-yan^{1,2}, ZHANG Jian¹, DONG Jin-gao², SHANG Hong-sheng¹

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Mycotoxin Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: An active metabolite, as a white-color solid, had been isolated from potato-dextrose (PD)-culture of BC4 isolate of *Botrytis cinerea* by LC and HPLC. The metabolite was identified as abscisic acid (ABA) by HPLC-ESI/MS, GC-MS, IR and ¹H NMR. The bioassay shows that the activity of the ABA is 2.5 times greater than that of the standard ABA (the mixture of optically active isomer and non-active isomer). The compound has inhibited seed germination of the *Amaranthus retroflexus* L. completely at a concentration of $0.7 \mu\text{mol/L}$.

Key words: *Botrytis cinerea*; abscisic acid (ABA); bioactivity; identification