松针褐斑病菌毒素 LA - I 的分离纯化及其化学结构*

杨 斌[1] 叶建仁[1] 包 宏[2] 刘吉开[2] 董泽军[2]

(1. 南京林业大学 南京 210037; 2. 中国科学院昆明植物研究所 昆明 650204)

摘 要: 采用柱层析和高效液相色谱分离相结合,从松针褐斑病菌的 PD 培养液中分离提纯到一种致毒活性物质 LA - I,该物质为无色油状物。紫外扫描显示 LA - I 的最大吸收波长为 207 nm。在 365 nm 和 254 nm 波长下 LA - I 无吸收。FAB⁻ MS 和 HRFAB⁻ MS 分别显示该毒素物质的相对分子质量和分子式为 162 和 $C_6H_{10}O_5$; 氢谱中的 2 个信号(δ1.26, δ4.22)表明该毒素物质存在 —OCH(CH_3) —基团。碳谱显示有 3 个碳信号(δ181.09, δ66.99, δ21.69),证明存在 —COOH, —CH, —CH_3 基团。综合质谱、核磁共振谱分析确定 LA - I 为 COOHCH(CH_3) OCH(CH_3) COOH (α,α′ - 二丙酸醚),红外光谱也证实了毒素的这一化学结构。

关键词: 松针褐斑病菌;真菌毒素;α,α′ - 二丙酸醚

中图分类号:S763.18;O621.4 文献标识码:A 文章编号:1001 - 7488(2005)02 - 0086 - 05

Separation and Purification, Structure of LA - I Toxin Produced by Brown Spot Needle Blight Fungus (*Lecanosticta acicola*)

Yang Bin[1] Ye Jianren[1] Bao Hong[2] Liu Jikai[2] Dong Zejun[2]

(1. *Nanjing Forestry University* *Nanjing* 210037; 2. *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences* *Kunming* 650204)

Abstract: Brown spot needle blight fungus (*Lecanosticta acicola*) could produce pathogenic toxin. A combination use of silica gel column chromatography, reversed phase silica gel column chromatography and HPLC led to the isolation of a phytotoxic compound, named LA - I, from the crude toxins produced by *Lecanosticta acicola* cultured in PD medium. LA - I was colorless oil. UV scanning results indicated the maximum absorptive wave length of LA - I was 207 nm. Under 365 nm and 254 nm, LA - I had no or little UV absorption. The MW and MF of this toxin was determined by FAB⁻ MS and HRFAB⁻ MS as 162 and $C_6H_{10}O_5$. Two signals of H at δ1.26, δ4.22 in ^{1}HNMR spectrum showed —OCH(CH_3) — existed in the compound. ^{13}CMNR spectrum indicated not only the —OCH(CH_3) — signals but also the signal of COOH (δ181.09). Synthesized FAB⁻ MS, HRFAB⁻ MS, ^{1}HNMR, ^{13}CNMR data, the structure of LA - I could be deduced as COOHCH(CH_3) OCH(CH_3) COOH. Such a structure could explain IR spectrum well.

Key words: *Lecanosticta acicola*; mycotoxin; α,α′ di - propanacid aether

毒素是植物病原菌借以侵袭寄主植物的主要力量之一。植物病原菌往往产生多种致毒活性物质适应不同寄主的抗病性或同一寄主的不同抗病机制(章元寿,1996;董汉松,1996)。链格孢菌(*Alternaria alternata*)是可产生多种致毒活性物质的典型病原菌之一。迄今为止,已发现它可产生环四肽、链格孢烯、高分子多糖、细链格孢菌酮酸、甲基醚链格孢酚、吡咯衍生物等 6 种毒素,危害苹果、草莓以及瓜类植物。常引起植物根部病害的尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)也能产生 5 种以上的毒素,危害棉花、蕃茄等植物(海蒂弗斯等, 1991; Hiroe *et al*., 1956; Templeton, 1972)。

松针褐斑病菌(*Lecanosticta acicola*)可产生致毒活性物质,已在多篇研究报道中证实(杨斌等,2001; 叶建仁等,2000),且已从松针褐斑病菌 Murashige - Skoog 培养液(MS 培养液)中分离出一种含硫的致毒活性物质,并确定了其化学组成和分子结构等(杨斌等,2001)。从含硫活性物质分离剩余物的生物检测显示有很高的致毒活性来看,极有可能还存在着其他的致毒活性物质,而且可能还是致毒活性更高的毒素。对松针褐斑病菌的毒素进行层析分离研究过程中也显示松针褐斑病菌可以产生一种以上的致毒活性物质(叶建仁等,

收稿日期:2003 - 05 - 23。

基金项目:国家自然科学基金项目"松针褐斑病菌致病毒素的研究"(批准号 39870627)。

* 叶建仁为通讯作者。

2003) 。因此,必须对松针褐斑病菌的次生代谢产物进一步分离。松针褐斑病菌毒素的前期研究中显示生物活性物质含量少,是制约对该病菌毒素分离研究的一个重要原因。如果加大培养物的量,就有可能从中分离纯化出活性物质。用马铃薯 - 葡萄糖培养液(PD 培养液) 和 MS 培养液培养病菌均可产生毒素,但在相同培养条件下 PD 培养液粗提物活性略强一些。因此,从毒素含量及活性角度考虑,本研究拟采用 PD 培养液,用正相硅胶柱和反相硅胶柱相结合分离松针褐斑病菌毒素,并继续采用生物检测的方法追踪活性物质。

1　材料与方法

1.1　菌株和试剂

供试菌株自福建沙县官庄林场患松针褐斑病的湿地松(*Pinus elliottii*) 松针上分离得到。试剂为甲醇、氯仿(AR,天津化学试剂厂) ,柱层析硅胶(100 ~ 200 目,青岛海洋化工厂) , Rp - 18 预装柱[(lobar 柱) ,规格:25 mm × 310 mm,德国 Bayer 公司产品]。

1.2　方法

培养与毒素粗提　菌株扩培后接种于已灭菌的 20 L PD 培养液中,于 25 ℃下摇床振荡培养 25 d。用旋转蒸发仪将培养滤液蒸干,先加入 10 L 甲醇充分提取,蒸干甲醇提取液后,再加入 20 L 氯仿甲醇混合溶液(氯仿: 甲醇 = 2: 3) ,35 ℃下振荡 6 h,充分提取,滤去不溶物,蒸干得毒素粗提物。

硅胶吸附和上样　用 250 mL 甲醇溶解毒素粗提物,向溶液中加入适量粗硅胶,置于旋转蒸发仪中 40 ℃下抽真空旋转蒸发至干,使毒素粗提物能充分均匀吸附于硅胶上,小心把吸附有毒素粗提物的粗硅胶加于已装好的柱中,并加入氯仿,使氯仿液面与硅胶表面相平。

毒素分离及生测　先用正相柱进行分离,采用顺序梯度洗脱法洗脱,用氯仿洗脱,然后向其中加入少量甲醇增大极性,整个洗脱过程中缓慢增加洗脱液极性,尽可能使各个色带能较好分开,调节层析柱阀门,使流速为 2 $mL \cdot min^{-1}$。收集时以等体积为主,兼顾各个色带,同时使收集的每个分离组分蒸干后不超过 1.0 g,按洗脱液先后顺序编号并分别蒸干,加水配成 2 $mg \cdot mL^{-1}$ 溶液进行生测。生测材料为湿地松幼苗(培养 4 个月左右) ,紫茎泽兰(*Eupatorium* sp.) 叶片(采自西南林学院校园) ,生测方法采用针刺法,“ - ”表示生测无活性,“ + ”表示有生测活性。对于生测有活性的组分再用旋转蒸发仪蒸干,加适量蒸馏水配成浓溶液,用 Rp - 18 反相柱进行多次分离,收集分离组分进行生测。

活性物质 A 的 HPLC 检验及分离　色谱条件,C - 18 柱(Waters 公司产品,规格:4 mm × 150 mm) ,486UV 检测器,检测波长 210 nm,waters Millennium 2010 色谱管理系统,流动相甲醇/水梯度洗脱(需要时可改变洗脱梯度) 。采用高效液相色谱制备方法分离纯化活性物质,用针刺接种法生测所分离的各个组分,确定其活性。

活性物质紫外吸收特性　将分离中获得的活性组分物质以甲醇溶解,用 UV - 365 紫外 - 可见光分光度计进行紫外扫描,扫描条件:Scan width 190 ~ 400 nm,Scan speed 400 $nm \cdot min^{-1}$,λ Expansion 25 $nm \cdot cm^{-1}$。

1.3　仪器

质谱(MS)　试验用仪器为 VG - Autospec 3000 型质谱仪(Beckman) ,分别用电子轰击法(EI^+) 和快原子轰击法(FAB^-) 测分子量,并用快原子轰击高分辨质谱(HR FAB^- MS) 精确测定分子量,计算其可能的化学组成(沈淑娟,1992) 。

核磁共振谱(NMR)　^1H 和 ^{13}C 核磁共振谱(^1H NMR 和 ^{13}CNMR) 由 Brucker 公司生产的 Am - 400 型波谱仪测定。氘代水(D_2O) 为溶剂,TMS(四甲基硅烷) 作内标。

红外光谱(IR)　试验用仪器为 Perkin - Elemer - 577 型红外光谱仪,采用 KBr 压片制样。

2　结果与分析

2.1　正反相柱层析分离获得毒素活性物质 A

松针褐斑病菌在 PD 培养液中生长较在 MS 培养液中快,20 d 后菌丝团上即可见黑色子实体,25 d 后培养液滤液黄褐色。20 L 培养液蒸干后,经 2 次提取得到粗提物 57 g,粗提物呈黑褐稠粘状物,在毒素粗提过程中,仍可获得大量的糖醇,这些糖醇极易溶于水,微溶于甲醇,可通过甲醇重结晶获得无色针状晶体,生测无活性,经质谱证明该化合物为 $C_6H_{14}O_6$。

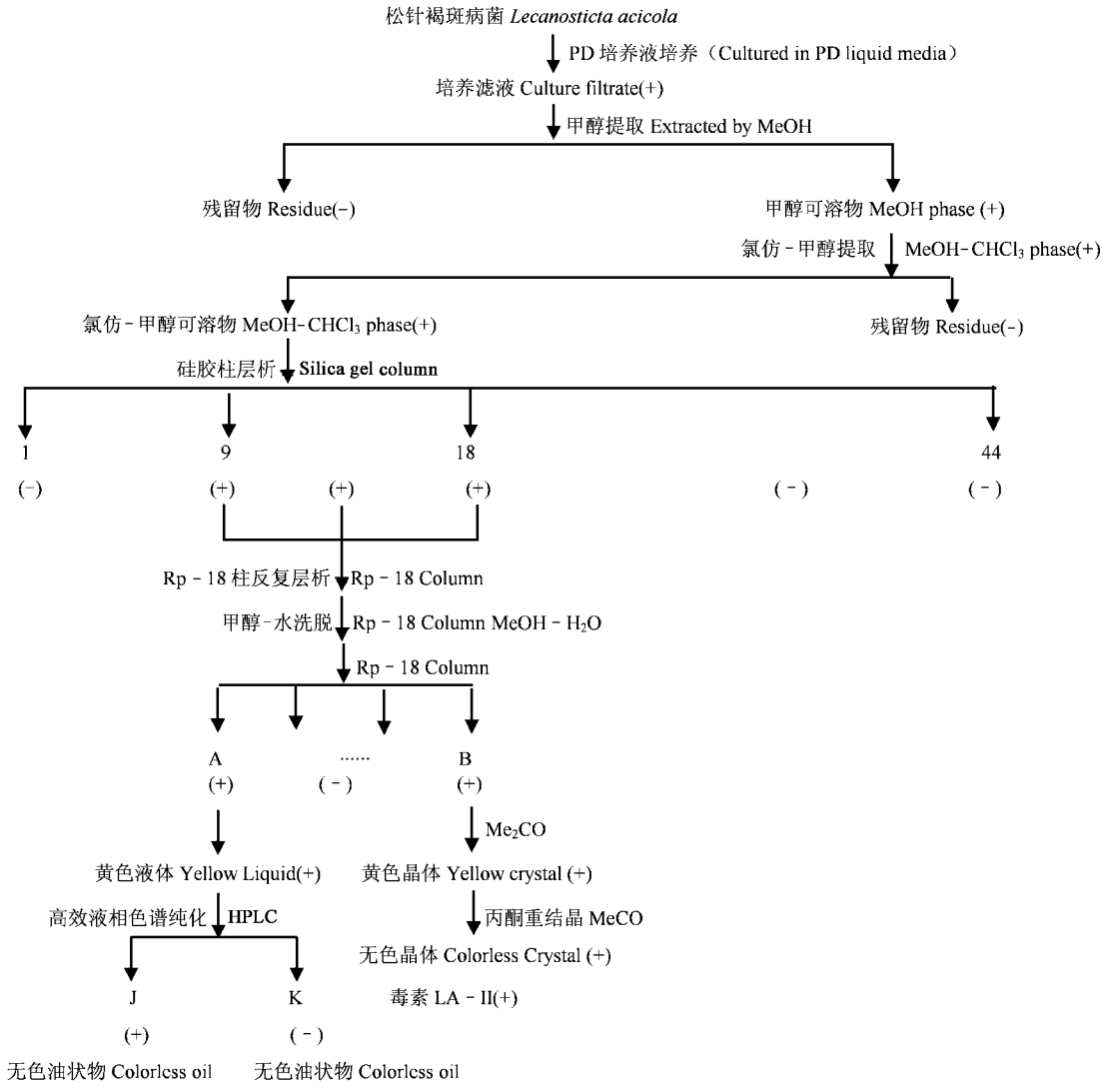


图 1 LA-toxins 的分离流程

Fig. 1 A procedure used for the separation of LA-toxins

在柱层析分离过程中,用纯氯仿洗脱时,仅能看到 2 条黄色带移动速度很慢,缓慢增加极性时,不断有色带从吸附有样品的硅胶上洗下,分离效果较好。通过不断增加洗脱液甲醇含量,一直洗到硅胶柱变白,收集到的洗脱液无干物质为止。共用 2 周时间洗脱正相柱,收集到 44 个洗脱组分。生测表明有活性的组分集中在 9~18 号瓶,共 10 个。合并有活性物质,用 Rp-18 柱进行多次分离,最后获得 2 个较纯且有活性组分。其中一个为黄色固体物质,能溶于丙酮,用丙酮结晶和重结晶得到无色晶体,后经质谱分析,该组分为 LA-II(杨斌等,2001)。多次用 Rp-18 柱分离后得另外一个活性组分为黄色粘稠状物,不溶于石油醚,能溶于丙酮及氯仿甲醇溶液(氯仿: 甲醇 = 9: 1),在多种有机溶剂中均不结晶。在 Rp-18 反相柱上多次分离,均显示一条整齐的黄色带。故认为是较纯物质,记为 A。A 虽然 Rp-18 柱多次层析均表现为单一物质的特点,但要判断是否为纯物质还需其他手段加以检验。

2.2 活性物质 A 及其紫外检测

过去研究得知活性组分在 210 nm 附近有最大吸收(叶建仁等,2003),故层析分离采用 210 nm 作为 HPLC 检测波长。HPLC 分析表明,采用甲醇/水作洗脱液进行梯度洗脱时,A 为单一峰,但峰形为 VB 峰,因此 A 很可能是由保留时间相距很近的 2 个峰组成。后改变洗脱条件,使甲醇递增速度减慢,且加入少量磷酸,使分离度明显提高。此时,HPLC 显示 A 由 2 种物质组成。用 HPLC 在此洗脱条件下,经过 2 次分离最终获得 A 中的 2 个组分,分别记为 J 和 K,J 和 K 经 HPLC 分析表明二者均显示典型的单一峰,表明它们已是纯物质(图

2 3) 。生测试验表明 ,J 有致毒活性。按照植物病原菌毒素的命名习惯将 J 记为 LA - I 。K 经生测试验表明无致毒活性。对有活性的物质 J(LA - I) 进行紫外扫描结果表明 ,其最大吸收波长在 207 nm ,这与过去的研究结果一致(图 4) 。

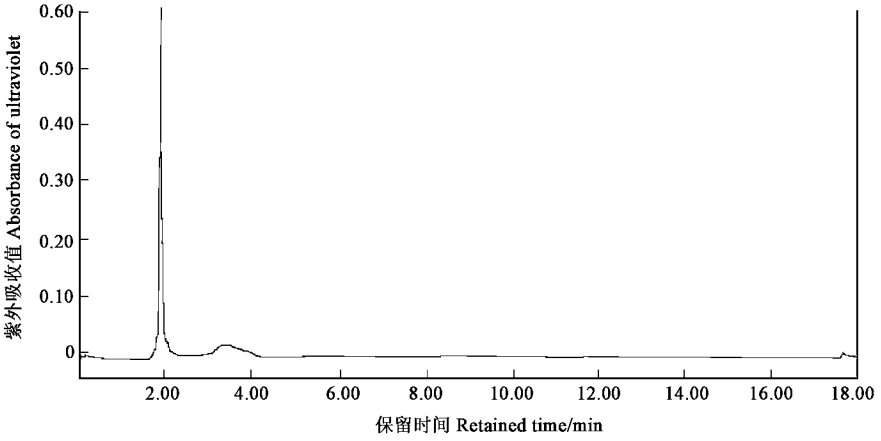


图 2　纯化后 J 组分的 HPLC 图(LA - I)

Fig . 2　HPLC of purified J fraction

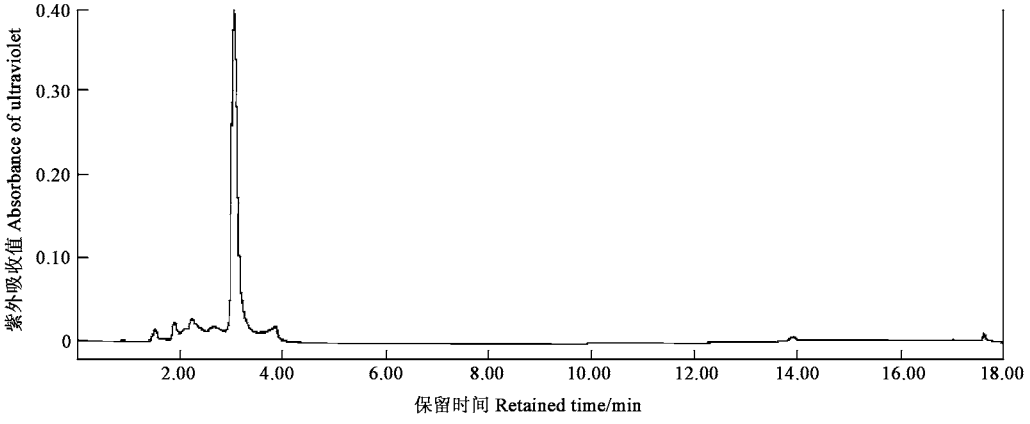


图 3　纯化后 K 组分的 HPLC 图

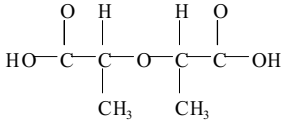
Fig . 3　HPLC of purified K fraction

2.3　毒素 LA- I 的化学组成和分子结构的确定

FAB$^-$ MS 显示 LA - I 的分子量为 162 , HRFAB$^-$ MS 精确测得(M - 1) 为 161.047 528 ,其可能分子式为 : $C_6H_{10}O_5$(计算值为 161.044 999) 和 $C_{13}H_6$(计算值为 161.031 25) 。

^{1}HNMR 谱显示有一个 —CH(δ4.23) ,且该 —CH 有 4 重峰 ,表明附近有一个 —CH_3 与之耦合 ,化学位移 δ4.23 证明 CH 与 O 相连。同样^{1}HNMR 也显示一个具 2 重峰的 —CH_3(δ1.26) ,表明 —OCH(CH_3) 存在。

^{13}CNMR 谱显示有一个 —COOH(δ181.09) 、一个 —CH(δ66.99) 和一个 —CH_3(δ21.69) 。结合 MS 、^{1}HNMR 分析可知 LA - I 化学组成为 $C_6H_{10}O_5$,并推测该化合物可能存在 3 个对称碳原子 ,即可能分子结构为 : HOOC(CH_3) CHOCH(CH_3) COOH 。这一结构在 IR 谱上得到部分证实 ,IR 谱显示 2 812 cm 处有一个较宽的 COOH 峰 ;1 128 cm处有一个中等强度吸收峰 ,表明有 C—O—C 存在。各种图谱综合分析认为 LA - I 分子结构为 :



该结构属一对称结构。这种结构也解释了 MS 谱图中出现的 2 个强碎片峰 ,117(M—COOH) $^+$ 和 89(M—$CHCH_3COOH$) $^+$,从上述分子结构看这种断裂是可能的。经检索分析发现 ,本研究在松针褐斑病菌中首次发

现的致病毒素 LA - I 及已报道的 LA - II 均是新的天然化合物。

3 结论与讨论

本研究从松针褐斑病菌液体发酵次生代谢产物中又分离到一种致萎活性物质 LA - I ,该物质是一种能够分泌到发酵液中的分泌型毒素 ,为无色油状物 ,不易结晶 ,采用柱层析和高效液相色谱相结合能够将此毒素物质分离纯化。进一步证实松针褐斑病菌能够产生一种以上的致病毒素。

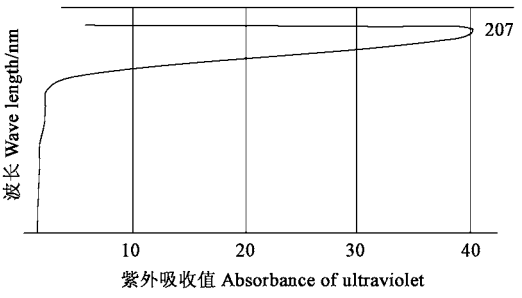


图 4 LA - I 的紫外扫描图谱

Fig. 4 UV spectrum of LA - I

LA - I 的最大吸收波长为 207 nm。在 365 nm 处和 254 nm 波长下 LA - I 无吸收 ;FAB^- MS 和 $HRFAB^-$ MS 分别显示该毒素物质相对分子质量和分子式分别为 162 和 $C_6H_{10}O_5$,是小分子的化合物。综合质谱、核磁共振谱和红外光谱分析确定 LA - I 的化学结构式为 $COOHCH(CH_3)OCH(CH_3)COOH$(α,α′ - 二丙酸醚) 。

LA - I 的最大紫外吸收在 207 nm 处 ,这与在对松针褐斑病菌粗毒素研究时分析提出的致毒活性物质的最大紫外吸收值为 210 nm 左右的判断相一致(叶建仁 ,2003) 。在进行松针褐斑病菌粗毒素的层析分离和紫外吸收特性研究时 ,就获得 2 个具有活性的组分 ,分别是 m 和 p ,它们的最大紫外吸收波长均在 210 nm 附近。高效液相色谱显示 , m 具 3 个峰 ,保留时间分别为 2.41、3.08、16.68 min ;p 组分具 4 个吸收峰 ,保留时间分别为 2.46、3.75、12.00、17.25 min。从保留时间来看 , m、p 中有 2 个相同组分 ,即保留时间为 2.46(2.41) 、3.75 (3.08) 、17.25(16.68) min(叶建仁 ,2003) 。至今 ,笔者已从松针褐斑病菌次生代谢产物中先后共分离到 LA - I 和 LA - II 两种活性物质 ,LA - I 和 LA - II 在高效液相色谱上的保留时间与 m、p 中前面 2 个峰相似 ,而与保留时间为 12.00 和 17.25 min 的 2 个峰明显不同。当然本研究中由于分离方法较以前略有改变 ,故而没有见保留时间为 12.00 和 17.25 min 的 2 个峰明显与极性较大的 LA - I 和 LA - II 同时出现在同一个粗毒素分离组分中。由此可以推断 ,在过去的层析分离中 m 和 p 组分中的 4 个物质中前面 2 个峰与致毒活性有关。但后面 2 个保留时间稍长的物质是否有活性或是否去影响 LA - I 和 LA - II 的活性还值得深入研究。

至此 ,笔者已先后从松针褐斑病菌的发酵液中分离获得 2 种致萎活性物质(杨斌 ,2001) 。本研究小组曾在毒素组分被分离之前的毒素粗提液水平上 ,对毒素的作用机理进行初步的探索和分析(叶建仁 ,2000) 。对已经纯化的毒素 LA - I 和 LA - II 作用机制是否与存在粗毒素一致尚不清楚 ,有待深入研究。此外 ,这 2 种天然产物的应用与开发也是一值得深入研究的课题。

参 考 文 献

董汉松主编 . 1996 .植物诱导抗病性 . 北京 :中国农业出版社

海蒂弗斯 R, 威廉斯 P H. 朱有红 ,宋佐衡 ,付淑云 ,等译 . 1991 .植物病理生理学 . 北京 :农业出版社

沈淑娟 . 1992 .波谱分析法 . 上海 :华东化工学院出版社

杨 斌 ,叶建仁 ,刘吉开 ,等 .2001 . 松针褐斑病菌致病毒素 LA - II 的分离及化学组成 . 南京林业大学学报 ,25(3) :21 - 25

叶建仁 ,祁高富 ,封维忠 ,等 .2000 .松针褐斑病毒菌素对寄主细胞膜伤害机理研究 . 林业科学 ,36(2) :82 - 86

叶建仁 ,杨 斌 ,包 宏 ,等 .2003 .松针褐斑病菌毒素的层析分离及紫外吸收特性研究 . 南京林业大学学报 ,28(2) :7 - 11

章元寿 . 1996 .植物病理生理学 . 南京 :江苏科技出版社

Hiroe I, Wishimara S. 1956 . Pathochemical Studies on watermelon wilt I. On the wilt toxin, phytonivein produced by the causal fungus. Ann Phytopathol Soc Japan, 20 :161 - 164

Templeton G E. 1972. Alternaria toxins related to pathogensis in plants. In: Kadis S, Gieglar A, Ail S J (eds). Microbial Toxins . New - York - London: Academic Press, Vol III : 169 - 178