

专论与综述

## 赤霉素 A<sub>4</sub>、A<sub>7</sub> 的研究进展

· 颜方贵 秦 杰 何增国 李季伦

(北京农业大学生物学院, 北京 100094)

赤霉素 A<sub>3</sub> (GA<sub>3</sub>) 是目前应用最广的植物生长激素之一。随着研究的深入, 对该族的其它同系物, 特别是 GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> 越来越受到重视, 这是由于 GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> 对植物具有特殊作用所致。

### 1 赤霉素结构与生理活性的关系

1935年数田贞次郎首次从水稻恶苗病菌 (*Gibberella fujiKuroi*) 培养物中分离出赤霉素粗结晶。在1938—1941年, 数田和住木谕介发现这种粗结晶是由 GA 和 GB 两种结晶物组成: GA 为赤霉素, GB 为一种高赤霉酸的氧化物。Takahashi 等人进一步研究发现, GA 结晶也并非单一物质, 而是三种赤霉素的混合物, 并分别命名为 GA<sub>1</sub>、GA<sub>2</sub> 和 GA<sub>3</sub><sup>[1]</sup>。1958年, MacMillan 等<sup>[2]</sup>从红花菜豆的未成熟种子里分离出 GA<sub>1</sub>。许多科学工作者又相继从其它植物中、菌液中找到一系列赤霉素。现已发现游离赤霉素 79 种, 结合型赤霉素 10 多种<sup>[3]</sup>。

赤霉素是一族四环双萜羧酸类化合物, 其基本结构骨架是赤霉素烷。由其衍生的同系物所表现的生理活性差别甚大。归纳起来, 结构与活性的关系有以下几个方面<sup>[4-8]</sup>:

a. 碳原子数目: 按碳原子数可分为 C<sub>19</sub>-赤霉素和 C<sub>20</sub>-赤霉素, 这取决于 C<sub>(20)</sub> 是否被氢取代。一般而言, C<sub>19</sub>-赤霉素的活性比 C<sub>20</sub>-赤霉素的活性高。C<sub>19</sub>-赤霉素如 GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>、GA<sub>9</sub> 等, C<sub>20</sub>-赤霉素如 GA<sub>12</sub>、GA<sub>13</sub>、GA<sub>14</sub>、GA<sub>15</sub> 等。

b. A 环内酯的有无: 有些赤霉素在 A 环的 C<sub>(10)</sub> 和 C<sub>(4)</sub> 羧基之间可形成内酯。有内酯的赤霉素, 如 GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>、GA<sub>9</sub> 等明显优于无内酯的, 如 GA<sub>12</sub>、GA<sub>13</sub>、GA<sub>14</sub> 等。

c. A 环的饱和程度: 一些赤霉素如 GA<sub>3</sub>、GA<sub>7</sub> 在 C<sub>(1)</sub>-C<sub>(2)</sub> 有双键, 也有在 C<sub>(2)</sub>-C<sub>(3)</sub> 形成双键, 如 GA<sub>5</sub>、GA<sub>22</sub>、GA<sub>59</sub> 等。一般在 A 环上有双键的比没有双键的活性高, C<sub>(1)</sub>-C<sub>(2)</sub> 有双键的又比 C<sub>(2)</sub>-C<sub>(3)</sub> 有双键的活性高。

d. 羟基的数量及位置: C<sub>(3)</sub> 和 C<sub>(13)</sub> 位置上有羟基的赤霉素活性均高, 如 GA<sub>1</sub>、GA<sub>3</sub>、GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> 等。

GA<sub>3</sub> 的主要作用是刺激茎叶细胞分裂, 还有增进座果、打破休眠、诱导 α-淀粉酶、核酸酶及蛋白酶的合成等功能。随着研究的不断深入, 发现不同的植物、植物的不同生长期和不同部位所产生的赤霉素种类、含量大不相同。至于不同赤霉素的生理活性差别更大。如 GA<sub>4+7</sub> (GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> 混合物) 使种植在热带的北方甜土豆开花效果比 GA<sub>3</sub> 好得多; 用 GA<sub>3</sub> 打破种子休眠时会使胚轴伸长, 而用 GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub> 诱导只打破种子休眠而不影响胚轴, 这样就不会影响植物的抗倒伏性; GA<sub>4</sub> 或 GA<sub>7</sub> 可提高某些植物的座果率, 又不会造成像使用 GA<sub>3</sub> 后过多的营养生长。有人比较了 GA<sub>1</sub> 到 GA<sub>9</sub> 这九种赤霉素, 其中能促进苹果单性结实的只有 GA<sub>1</sub>、GA<sub>2</sub>、GA<sub>4</sub> 和 GA<sub>7</sub>; GA<sub>4+7</sub> 有改变某种松树花的性别的能力; GA<sub>4+7</sub> 还可增加苹果的表皮角质层以提高韧性, 因而可减少果锈和破裂, 而 GA<sub>3</sub> 效果不明显。目前 GA<sub>4+7</sub> 最广的应用是在

本文是国家自然科学基金项目〈高组分赤霉素 A<sub>4</sub>A<sub>7</sub> 研究〉课题总结之一

1993-09-02 收稿

苹果上,它可使苹果果实的高度对直径的比值增加。它与细胞分裂素(如6BA)等混合而成的美国产品“Promalin”,除增加苹果果实高度,还使萼部五棱突出,即市场上称之为“高压苹果”或“蛇果”的苹果产品<sup>[9-11]</sup>。图1是作者生产的GA<sub>4</sub>对苹果幼果的效果比较。

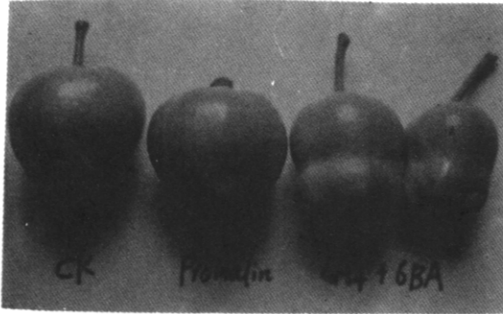


图1 GA<sub>4</sub>对苹果果实的增高效果

进一步的研究表明,GA<sub>4</sub>与GA<sub>7</sub>的生理作用除了相同点外,尚有明显的差异<sup>[12-14]</sup>。如使用GA<sub>7</sub>或Promalin可强烈抑制花芽的形成,而GA<sub>4</sub>不仅不会抑制反而起促进作用。因此GA<sub>4</sub>或C-3-epi-GA<sub>4</sub>(GA<sub>4</sub>的异构体)在苹果的“大年”使用会显著增加“小年”的花芽数。在防止苹果褐变和开裂上,GA<sub>4</sub>的活性高于GA<sub>7</sub>。由于在促进茎伸长方面GA<sub>3</sub>>GA<sub>7</sub>>GA<sub>4</sub>,因此为防果锈等使用赤霉素时,GA<sub>4</sub>最优。它没有诸如花芽分化受抑、种子数减少和细长枝增多等副作用。细长枝增多所消耗的营养,会造成由于果实营养不足而引起的六月落果现象。

## 2 GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>的生物合成途径和GA<sub>3</sub>的关系<sup>[15]</sup>

赤霉素的生物合成主要包括两大步骤。第一步由乙酰CoA合成甲瓦龙酸(MVA),MVA经一系列合成步骤形成GA<sub>12</sub>-醛(图2)。第二步是由GA<sub>12</sub>-醛转化成其它赤霉素。第一步是植物与赤霉菌所共有的,第二步两者有所不同(图3)。

目前,在赤霉菌GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>发酵中,除产生GA<sub>3</sub>外,尚有GA<sub>9</sub>等存在。GA<sub>3</sub>需要在提取中

分离,而GA<sub>9</sub>在植物中却是GA<sub>4</sub>的前体,不必当作“杂质”,可认为相当于GA<sub>4</sub>的作用。

## 3 GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>的工业生产菌种

微生物是生物合成赤霉素的主要来源,产赤霉素的主要微生物有:

a. 藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*):可合成多种赤霉素,是目前工业生产GA<sub>3</sub>的唯一菌种。如作为GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>生产菌,可从两方面着手进行改造。一是通过菌种选育并结合外界条件如温度、pH、营养等的改变,使其累积GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>,而较少向GA<sub>3</sub>转化。二是选育营养缺陷型菌株,即根据微生物赤霉素生物合成途径,通过诱变,获得如下一些菌株:一类是GA<sub>7</sub>合成受阻抑,而只积累GA<sub>4</sub>,另一类是GA<sub>3</sub>合成受阻抑而只积累GA<sub>4</sub>和GA<sub>7</sub>。第一种方法是目前普遍采用的,但GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>产量较低,周期较长。我组目前发酵240h,产量约为600—800μg/ml,GA<sub>3</sub>含量尚有300μg/ml左右,给提取GA<sub>4</sub>和GA<sub>7</sub>带来困难。第二种方法即营养缺陷型菌株的选育,已有报道<sup>[16]</sup>,是今后应大力开展的课题。

b. 木薯痂圆孢 (*Sphaceloma minihoticola*):是木薯的病原菌,可使木薯枝条徒长,叶片疣状突起。该菌主要产GA<sub>4</sub>,但产量很低,仅400μg/L,还不能成为工业生产菌种<sup>[17]</sup>。

c. 粗糙脉孢霉(*Neurospora crassa*):主要产GA<sub>3</sub>,特点是在菌丝体内累积,但研究较少。

## 4 GA<sub>4</sub>和GA<sub>7</sub>的分离

目前主要是使用藤仓赤霉菌生产GA<sub>4</sub>、GA<sub>7</sub>,除考虑GA<sub>4</sub>和GA<sub>7</sub>本身的分离外,还涉及赤霉素其它同系物如GA<sub>3</sub>、GA<sub>9</sub>、GA<sub>15</sub>、GA<sub>37</sub>等的分离,其中GA<sub>3</sub>的分离最为重要。

a. HPLC(高压液相色谱)法<sup>[18-20]</sup>:曾经有不少成功的报道,但对不同的HPLC仪及不同色谱柱的色谱条件都有差异,要特别注意。赤霉素分离程度主要取决于两个因素:溶剂的极性及其洗脱液的流速。溶剂的极性不能太强,否则GA<sub>4+</sub>在柱中保留时间短,不能达到分离的目的。溶剂的极性亦不能过弱,否则GA<sub>4+</sub>在柱中

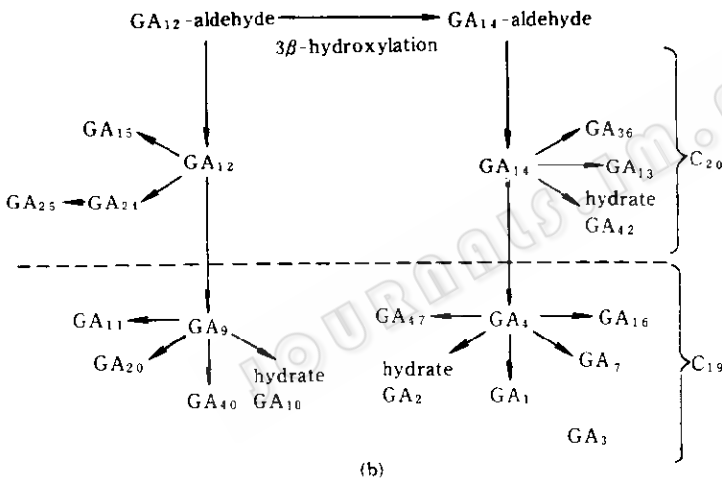
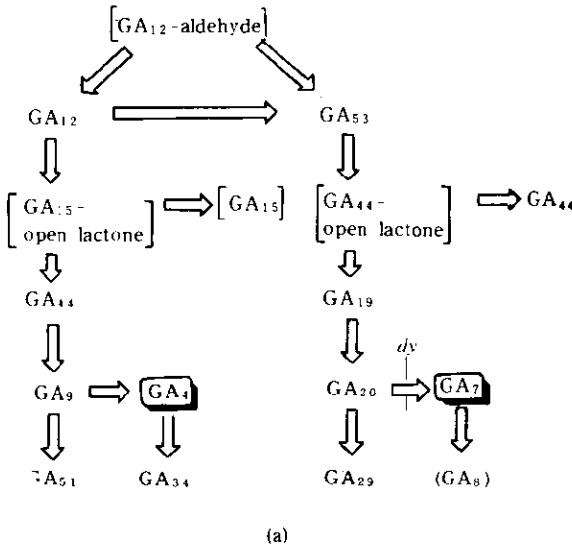


图3 赤霉素生物合成第二步

a. 植物赤霉素合成途径 b. 赤霉菌赤霉素合成途径

保留时间过长,造成峰的扩散。溶剂的极性应按水-甲醇 1:1 为度进行控制为宜。溶剂的流速也应控制在一定水平,流速太小造成  $GA_{4+7}$  的保留时间延长,出峰晚而致色谱峰变形扩散,达不到分离的目的;流速太大,不仅扩散加剧,而且会导致  $GA_{4+7}$  保留时间过短,同样也影响  $GA_4$  与  $GA_7$  的分离度。在 SY5000 仪上对 Micro PAK 柱来说流速以 1.2ml/min 为宜。

b. 硅胶柱层析:可以采用吸附硅胶柱和分配硅胶柱双柱层析法。

当吸附柱的溶剂系统为三氯甲烷-乙酸乙

酯-乙酸(14:6:1)时,赤霉素混合物的洗脱顺序为  $GA_{4+7} \rightarrow GA_4 \rightarrow GA_3$ 。

c. 薄层层析分离<sup>[21]</sup>:当采用的溶剂系统为三氯甲烷-乙酸乙酯-乙酸 14:6:3 时,  $GA_3$  的 Rf 值为 0.18,  $GA_{4+7}$  的 Rf 值为 0.52,  $GA_4$  与  $GA_7$  不能分离,但  $GA_4$  靠上、 $GA_7$  靠下。经乙醇硫酸喷布,加热显色后,在紫外灯下可见天蓝色的  $GA_3$  区带,紫色(下缘黄绿)的  $GA_4$  和  $GA_7$  区带。

其它的溶媒系统有四氯化碳-乙酸-水(8:3:5)、氯仿-乙酸乙酯-乙酸(80:20:1)、乙酸乙酯-苯(4:1)、乙酸乙酯-石油醚(4:1), Rf 值不同,  $GA_3$  分离尚可,而  $GA_4$  和  $GA_7$  的分离较难。

d. 旋转薄层层析:分离样较多,速度也快,并可开启紫外灯观察区带。

e. 苯甲胺法分离<sup>[22]</sup>:赤霉素混合物在正丁醇溶液中,苯甲胺可以选择性地与  $GA_7$ 、 $GA_4$  形成有机盐析出,而将  $GA_3$  留在溶液中。

f. 萃取法<sup>[23]</sup>:由于各赤霉素在不同的 pH 状态时,在有机溶剂和缓冲溶液系统中的分配系数有所不同,就有可能选择一种最适的 pH 值进行萃取不同的赤霉素。

### 参 考 文 献

[1] 若木重敏. 植物生理学通讯, 1958, 6: 33-39.  
 [2] MacMillan J, Seaton J C, Suter P J. Tetrahedron, 1960, 11: 60-66.  
 [3] Takahashi N, Phinney B O, MacMillan J. Gibberellins. Springer-Verlag New York Inc. 1991. 363-364.  
 [4] Brian. Physiol Plant, 1955, 8: 669-681.  
 [5] Crzier A, Kuo C C, Durley R C, et al. Canadia J Bot,

- 1970, **48**:867—877.
- [6] Serebryakov E P, Epstein N A, YasnsKaya P N, *et al.* *Phytochemistry*, 1984, **23**(9):1855—1863.
- [7] Fukuri. *Agric Biol Chem*, 1972, **36**:1003—1012.
- [8] Reeve D R, Crozier A. *J Exp Bot*, 1974, **25**:431—445.
- [9] ChalupKa W. *Silvae Genetica*, 1984, **33**(4/5):173—174.
- [10] Taylor D R, Knight J N. *Acta Horticulture*, 1986, **179**:819—821.
- [11] Varga A. *Proceedings Koninklika Nederlands Akademie Van Wetenschappen Series C*, 1966, **69**:64.
- [12] 徐绍颖. 植物生长调节剂与果树生产. 上海:上海科技出版社. 1987, 340—342, 353—355.
- [13] Norman E L, Pharis R P, Noma M. *Planta*, 1985, **165**:292—294.
- [14] Roderick W K, Pharis R P, Lewis N *et al.* *Plant Physiol*, 1987, **84**:1126—1131.
- [15] Turner W B, Albridge D C. *Fungal Metabolites ( I )*, 1983, 280—288.
- [16] Brückner B. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **35**(3):646.
- [17] Redemacher W, Graebe J E. *Biochem Biophys Res Comm*, 1979, **91**(1):35—40.
- [18] Reeve D R, Crozier A. *Phytochemistry*, 1976, **15**:791—798.
- [19] Barendse G W M, Van De werken P H. *J Chromatography*, 1980, **198**:441—445.
- [20] Jiamn-Tsyh Lin and Stafford A E. *J Chromatography*, 1988, **452**:519—525.
- [21] Kagawa T, Fukinbara T, Sumiki Y. *Agric Biol Chem*, 1963, **27**(8):598—599.
- [22] U. S. cl. 260—343.3, 1970.
- [23] Burley R C, Pharis R P. *Phytochemistry*, 1992, **11**:317—326.