

GIBBERELLINE—X.*

ISOLIERUNG VON *O*(2)-ACETYL-GIBBERELLINSÄURE ALS STOFFWECHSELPRODUKT VON *FUSARIUM MONILIFORME* SHELDT.

K. SCHREIBER, G. SCHNEIDER,† G. SEMBDNER und I. FOCKE‡

Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin

(Eingegangen 2 März 1966)

Zusammenfassung—Aus Kulturen eines Stammes von *Fusarium moniliforme* Sheld. wurde als neues natürliches Gibberellin *O*(2)-Acetyl-Gibberellinsäure (II) isoliert. Die Identifizierung erfolgte durch Vergleich (Dünnschichtchromatographie, I.R. - und Massenspektroskopie) des isolierten Gibberellins, einiger seiner Derivate und Abbauprodukte mit entsprechenden synthetischen Verbindungen. Im Biotest mit Zwergerbse (*Pisum sativum* L.) und Zwergmutanten von Mais (*Zea mays* L.) zeigte das Acetylgibberellin II etwa gleich hohe Aktivität wie Gibberellinsäure (Gibb. A₃, I).

Abstract—2-*O*-Acetylgibberellic acid (II) has been isolated as a naturally occurring gibberellin from cultures of a strain of *Fusarium moniliforme* Sheld. Its identity was established by comparison of II and some of its derivatives and degradation products with the corresponding synthetic compounds using thin-layer chromatography, i.r., and mass spectroscopy. The acetylgibberellin II has been shown to possess a biological activity as high as gibberellic acid in bioassays based on extension of stems of dwarf garden pea (*Pisum sativum* L.) and of leaf sheaths of two dwarf mutants (d-1, d-5) of maize (*Zea mays* L.).

BEI UNTERSUCHUNGEN über die Gibberellinbildung von *Fusarium moniliforme* Sheld. ermittelten wir einen Stamm (82/2), der sich durch eine besonders intensive Produktion gibberellinwirksamer Substanzen auszeichnet.¹ Neben Gibberellin A₃ (Gibberellinsäure, I) als Hauptprodukt, relativ grossen Mengen Gibberellin A₄ und A₇ sowie geringen Anteilen von Gibberellin A₁ und Gibberellensäure konnten wir Substanzen nachweisen, die sich dünn-schichtchromatographisch²⁻⁴ mit keinem der bisher bekannten Gibberelline⁵ als identisch erwiesen. Im folgenden berichten wir über die Isolierung und Identifizierung einer solchen Verbindung hoher biologischer Wirksamkeit.

Hierzu wurden 10 kg Pilzkultur einschliesslich Substrat (Reisnährboden nach 14tägiger Kultur des Pilzes bei 24 ± 1°) nach bereits beschriebener Methodik¹ aufgearbeitet. Die "Essigester-Fraktion pH 2,8" ergab nach zweimaliger Säulenchromatographie sowie

* IX. Mitteil.: K. SCHREIBER, G. SCHNEIDER und G. SEMBDNER, *Tetrahedron* **22**, 1437 (1966).

† Teil der demnächst erscheinenden Dissertation, Univ. Halle.

‡ Institut für Pflanzenzüchtung Bernburg der Deutschen Akademie der Landwirtschaftswissenschaften zu Berlin.

¹ I. FOCKE, G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *Biol. Zbl.* **84**, 309 (1965).

² G. SEMBDNER, R. GROSS und K. SCHREIBER, *Experientia* **18**, 584 (1962).

³ J. MACMILLAN und P. J. SUTER, *Nature* **197**, 790 (1963).

⁴ N. IKEKAWA, T. KAGAWA und Y. SUMIKI, *Jap. Acad. Proc.* **39**, 507 (1963).

⁵ Bezüglich der bis heute strukturell aufgeklärten natürlichen 13 Gibberelline (A₁–A₁₃) vgl. G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *Gibberelline, ihre Derivate und Abbauprodukte. Eine tabellarische Übersicht*. Akademie-Verlag, Berlin (1966), 227 Seiten; *Kulturpflanze* **13**, 267 (1965).

mikropräparativer Dünnschichtchromatographie⁶ an Kieselgel eine chromatographisch einheitliche Substanz, die durch die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen als *O*(2)-Acetyl-gibberellinsäure (4 α ,7 α -Dihydroxy-2 β -acetoxy-1 β -methyl-8-methylen-4 β -gibb-3-en-1,10 β -dicarbonsäure-1 $\rightarrow$ 4 α -lacton, II)^{5,7} identifiziert wurde.

Bereits aus den Ergebnissen der Dünnschichtelektrophorese an Kieselgel G (DE)⁸ war erkennbar, dass es sich bei der isolierten Verbindung um eine Monocarbonsäure handelt; der niedrige Wert der freien elektrophoretischen Beweglichkeit ($\bar{U}_F=0.52$) deutete auf ein

TABELLE 1. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHER VERGLEICH VON ISOLIERTER BZW. SYNTHETISCHER *O*(2)-ACETYL-GIBBERELLINSÄURE (II)

	<i>R_f</i> Werte*							
	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>O</i> (2)-Acetyl-gibberellinsäure (II)								
(a) aus Pilzkultur isoliert	0,74	0,43	—	—	0,24	0,11	0,46	0,70
(b) aus Gibb. A ₃ (I) synthetisiert ⁷	0,75	0,43	—	—	0,24	0,11	0,47	0,70
II-Methylester III								
(a) aus isoliertem II	—	—	0,78	0,46	0,42	—	—	—
(b) aus Gibb. A ₃ (I) synthetisiert ⁷	—	—	0,79	0,46	0,43	—	—	—
Diacetylderivat IV								
(a) aus isoliertem II	—	—	0,77	—	0,51	0,29	—	—
(b) aus Gibb. A ₃ (I) synthetisiert ⁹	—	—	0,78	—	0,52	0,28	—	—
Dicarbonsäure V								
(a) aus isoliertem II	0,08	—	—	—	—	—	0,07	0,17
(b) aus Gibb. A ₃ (I) ⁹	0,08	—	—	—	—	—	0,07	0,16
Gibberinsäure (VI)								
(a) aus isoliertem II	—	—	0,66	—	—	0,71	—	—
(b) aus Gibb. A ₃ (I) ⁷	—	—	0,66	—	—	0,70	—	—

* DC an Kieselgel G (Merck) mit den Entwicklungsgemischen:

A: Chloroform-Essigester-Essigsäure, 50:40:10 (R_f A₃=0,45); B: Chloroform-Essigester-Essigsäure, 80:20:5 (R_f A₃=0,11); C: Chloroform-Essigester-Essigsäure, 90:10:5 (R_f A₃=0,06); D: Chloroform-Essigester-Essigsäure, 95:5:2 (R_f A₃=0,02); E: Diisopropyläther-Essigsäure, 95:5³ (R_f A₃=0,08); F: Diisopropyläther-Essigsäure, 98:2³ (R_f A₃=0,02); G: Benzol-Essigsäure, 100:30 (R_f A₃=0,14); H: iso-Propanol-5 N-Ammoniak, 100:20 (R_f A₃=0,58).

O-Acyl-Derivat. Bei schwach alkalischer Hydrolyse bildete sich, wie durch DE gezeigt werden konnte ($\bar{U}_F=0,76$), eine Dicarbonsäure, bei der es sich nach vorliegenden dünn-schichtchromatographischen Befunden (Tabelle 1) um Verbindung V^{5,9} handelt. Mineral-saure Hydrolyse bei 100° lieferte in glatter Reaktion ein einziges Produkt, das durch Dünnschichtchromatographie (DC) als Gibberinsäure (VI)^{5,7} identifiziert wurde (vgl. Tabelle 1).

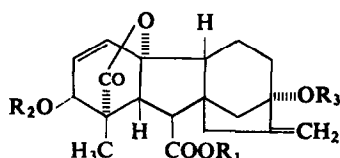
⁶ Zur Methodik vgl. G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *Phytochem.* **4**, 49 (1965).

⁷ B. E. CROSS, *J. Chem. Soc.* 4670 (1954).

⁸ Vgl. G. SCHNEIDER, G. SEMBDNER und K. SCHREIBER, *J. Chromatog.* **19**, 358 (1965).

⁹ B. E. CROSS, *J. Chem. Soc.* 3022 (1960).

Auch das Infrarotspektrum [Banden bei 1782 (γ -Lacton), 1740 (Carboxyl), 1730 und 1248 (*O*-Acetyl), 1100 (tert. Hydroxyl) und 896 cm^{-1} (Methylen)], das Elektronenanlagerungs-Massenspektrum¹⁰ (Molekülion bei m/e 388, Hauptpeak bei m/e 328 = M – Essigsäure) sowie das Elektronenstoss-Massenspektrum¹¹ der neu isolierten Verbindung stehen mit der Struktur II in Einklang. Die endgültige Bestätigung erfolgte durch direkten Vergleich mit synthetischer *O*(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II);⁷ die Infrarot- und Massenspektren beider Präparate erwiesen sich als völlig identisch. Auch bei der DC von isoliertem und synthetisiertem II, ihrer entsprechenden Methylester III⁷ und Diacetylverbindungen IV⁹ zeigten sich keine Unterschiede (vgl. Tabelle 1).

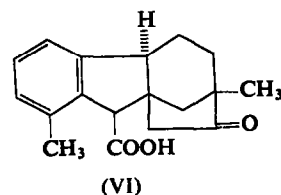
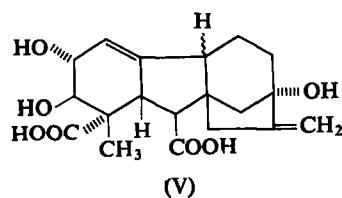


(I) $R_1 = R_2 = R_3 = H$

(II) $R_1 = R_3 = H, R_2 = Ac$

(III) $R_1 = Me, R_2 = Ac, R_3 = H$

(IV) $R_1 = H, R_2 = R_3 = Ac$



Bereits in orientierenden Versuchen fiel die relativ starke biologische Wirksamkeit des neuen *Fusarium*-Gibberellins auf. Quantitative Bioteste mit Zwergerbbsen (*Pisum sativum* L.) und Zwergmutanten von Mais (*Zea mays* L.) zeigten, dass *O*(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II) eine etwa gleich hohe Aktivität wie Gibberellinsäure (Gibb. A₃) besitzt (vgl. Tabelle 2). Dieser Befund gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Acetylgruppe von II in höheren Pflanzen leicht abgespalten wird. Spezielle Untersuchungen zur Klärung dieser Frage sind

TABELLE 2. BIOLOGISCHE WIRKSAMKEIT VON *O*(2)-ACETYL-GIBBERELLINSÄURE (II)

Testpflanze	Acetyl-Gibb. A ₃ (II) (μg /Pflanze)			Gibb. A ₃ (I) (μg /Pflanze)			Tweenkontr.
	0,01	0,1	1	0,01	0,1	1	
<i>Pisum sativum</i> L.*	103	225	376	108	253	370	69
<i>Zea mays</i> L. d-1†	13	27	52	12	26	49	5
<i>Zea mays</i> L. d-5†	14	24	50	13	25	52	5

* cv. "Meteor", $\bar{m}$ Sprosslänge (mm).

† $\bar{m}$ Länge der 2. Blattscheide (mm).

¹⁰ Verwendung negativ geladener Ionen: M. VON ARDENNE, G. SCHNEIDER, K. SCHREIBER, G. SEMBDNER, K. STEINFELDER und R. TÜMLER, Veröffentlichung in Vorbereitung.

¹¹ Verwendung positiv geladener Ionen: H. BUDZIKIEWICZ, G. SCHNEIDER, K. SCHREIBER und G. SEMBDNER, Veröffentlichung in Vorbereitung.

von uns in Angriff genommen. Im Schrifttum lag nach unserer Kenntnis bisher nur ein Hinweis vor, dass II bei Zwergerbsen relativ stark wirksam ist.¹²

O(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II) stellt ein neues Gibberellin dar,^{5,13} das als natürliches Stoffwechselprodukt von *Fusarium moniliforme* Sheld., Stamm Nr. 82.2, auf Reissnährboden gebildet wird. Auf anderen geprüften Substraten sowie bei weiteren Stämmen dieses Pilzes trat die Verbindung nicht auf. Die Möglichkeit, dass O(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II) während der Aufarbeitung durch Acetylierung gleichzeitig anwesender Gibberellinsäure (I) als Artefakt entstanden ist, kann aus folgenden Gründen ausgeschlossen werden: 1. Verbindung II war bereits im Methanolextrakt der Pilzkultur dünn-schichtchromatographisch nachzuweisen. 2. Unter den angewendeten Aufarbeitungsbedingungen wird Gibberellinsäure (I) nicht in ihr Acetylderivat II umgewandelt, wie ein speziell durchgeführter Modellversuch gezeigt hat. Hierzu wurde eine wässrige Lösung von I (100 mg 100 ml), wie im experimentellen Teil für die Isolierung von II beschrieben, aufgearbeitet: ausser I war weder II noch ein anderes Derivat nachweisbar.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheiztisch nach Boetius bestimmt und sind korrigiert. Die Infrarotspektren wurden mit dem Zeiss-Zweistrahlspektrophotometer UR 10 aufgenommen. Für die Dünnschichtchromatographie und Dünnschichtelektrophorese wurde Kieselgel G (Merck) verwendet (zur Methodik vgl. Lit.^{2,6,8}), zur Säulenchromatographie Kieselsäuregel (VEB (K) Feinchemie Eisenach, Thür.).⁶

Isolierung von O(2)-Acetyl-gibberellinsäure

Der *Fusarium-moniliforme*-Stamm 82/2 wurde auf Reis in Erlenmeyerkolben aufgezogen.¹ Nach 14tägiger Kultur bei $24 \pm 1^\circ$ im diffusen Tageslicht war das Kulturmedium völlig vom Pilz durchwachsen. Insgesamt 10 kg Pilzkultur einschliesslich Substrat wurden in etwa 20 l. Methanol eingelegt, zerkleinert, 24 Std. bei Raumtemp. stehengelassen und nach dem Absaugen noch 2mal mit je 7 l. Methanol nachextrahiert. Die vereinigten Auszüge wurden i. Vak. auf 6 l. eingedunstet, mit einer gesätt. $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung auf pH 7.0–7.5 eingestellt und 3mal mit insgesamt 13,5 l. Essigester ausgeschüttelt. Die wässr. Phase wurde mit Salzsäure auf pH 2,8 angesäuert und wiederum 3mal mit insgesamt 13,0 l. Essigester ausgezogen. Diese „Essigester-Fraktion pH 2,8“ wurde nach Trocknung über Na_2SO_4 i. Vak. eingedunstet (Badtemp. 40°) und der Rückstand (11 g), an 10 g Kieselgur adsorbiert, an 1 kg Kieselgel chromatographiert. Die Elution erfolgte mit Chloroform-Essigester (Fraktionen zu je 400 ml), und zwar Frakt. 1–20 im Volumenverhältnis = 10:0, Frakt. 21–30 = 9:1, Frakt. 31–40 = 8:2 usw.; ab Frakt. 111 wurde mit reinem Essigester eluiert (vgl. Tabelle 3).

Der Rückstand der Frakt. 109–163 (0,56 g) wurde an 100 g Kieselgel rechromatographiert; Elution mit Chloroform-Essigester = 5:0, 4:1, 3:2 usw. bis zu reinem Essigester bei einer Fraktionsgrösse von je 50 ml. Dabei wurden neben ~ 300 mg Gibberellin A₃ (Frakt. 124–180) 12 mg bereits weitgehend einheitliche O(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II) gewonnen (Frakt. 80–123). Nochmalige Reinigung der Substanz durch präparative DC⁶ mit dem Entwicklungsgemisch Chloroform-Essigester-Essigsäure = 80:20:5 und nachfolgende Extraktion mit Essigester ergab 10 mg amorphes II, das nach Umkristallisation aus Essigester-Petroläther Schmp. 226° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} + 150,0^\circ$ ($c = 0,22$, Chloroform) zeigte.

¹² J. S. MOFFATT und M. RADLEY, *J. Sci. Food Agr.* 386 (1960).

¹³ Zur Problematik der Gibberellin-Definition und -Merkmale vgl. B. O. PHINNEY und C. A. WEST, *Ann. Rev. Plant Physiol.* 11, 411 (1960); P. W. BRIAN, H. G. HEMMING und D. LOWE, *Ann. Bot.* N.S. 28, 369 (1964); G. SEMBNER, G. SCHNEIDER und K. SCHREIBER, *Planta* 66, 65 (1965).

I.R.-Banden (in Chloroform): 3600, 3520, 3080, 1782, 1740, 1730, 1716, 1385, 1376, 1248, 1160, 1129, 1100, 1021, 978 und 896 cm^{-1} ; DC: R_F -Werte siehe Tabelle 1; DE: $\bar{U}_F=0,52\text{ }\mu\text{/sec/cm/V}$. Die Verbindung erwies sich nach DC (vgl. Tabelle 1), Infrarotspektrum, Elektronenanlagerungs-¹⁰ und Elektronenstoss-Massenspektrum¹¹ mit aus Gibberellinsäure (I) dargestellter *O*(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II)⁷ vom Schmp. 230–232° (Zers.) und $[\alpha]_D^{20} + 128,0^\circ$ ($c=0,15$, Chloroform) als vollkommen identisch [Lit.⁷: Schmp. 233–234° (Zers.), $[\alpha]_D^{17} + 152,0^\circ$ ($c=0,50$, Äthanol)].

TABELLE 3. CHROMATOGRAPHISCHE AUFTRENNUNG DER "ESSIGESTER-FRAKTION pH 2,8" AN KIESELGEL

Fraktt.	Rückstand (g)	Dünnschichtchromatographische Befunde
1–10	0,45	einige nicht identifizierte Substanzen
11–37	0,22	Gibberellin A ₄
38–64	0,12	Gibberellin A ₇
65–108	0,31	einige nicht identifizierte Substanzen
109–163	0,56	Gibberellin A ₃ + <i>O</i> (2)-Acetyl-gibberellinsäure + Gibberellin A ₁ + Gibberellensäure
164–200	1,60	Gibberellin A ₃ + Gibberellin A ₁ + Gibberellensäure

O(2)-Acetyl-gibberellinsäuremethylester (III). Verbindung II (aus Pilzkultur isoliert, 100 μg) wurde in 0,2 ml Methanol gelöst, Diazomethan bis zur bleibenden Gelbfärbung eingeleitet und 24 Stdn. stehengelassen. Der so gewonnene Ester war nach DC (vgl. Tabelle 1) mit aus Gibberellinsäure synthetisiertem III⁷ vom Schmp. 179–181° und $[\alpha]_D^{20} + 136,0^\circ$ ($c=0,20$, Chloroform) identisch [Lit.⁷: Schmp. 180–181°, $[\alpha]_D^{18} + 150,0^\circ$ ($c=0,40$, Äthanol)].

Diacetyl-gibberellinsäure (IV). Verbindung II (aus Pilzkultur isoliert, 100 μg) wurden mit 0,2 ml Acetanhydrid und 0,3 ml Pyridin 64 Stdn. bei Raumtemp. acetyliert und das Reaktionsgemisch anschliessend i. Vak. bis zur Trockne abdestilliert. Der Rückstand erwies sich im DC (vgl. Tabelle 1) als identisch mit authent. IV⁹ vom Schmp. 188–189° und $[\alpha]_D^{21} + 170,0^\circ$ ($c=0,3$, Chloroform), dargestellt nach Lit.⁹ aus Gibberellinsäure [Lit.⁹: Schmp. 186–187°, $[\alpha]_D^{16} + 176,0^\circ$ ($c=0,5$, Äthanol)].

Gibberinsäure (VI). *O*(2)-Acetyl-gibberellinsäure (II) (aus Pilzkultur isoliert, 100 μg) wurde mit 0,5 ml 2 N HCl 2 Stdn. unter Rückfluss erhitzt; das Reaktionsgemisch wurde direkt dünnschichtchromatographisch geprüft. Das einzige Reaktionsprodukt war mit Gibberinsäure (VI) [Schmp. 153–154°, $[\alpha]_D^{22} - 5,2$ ($c=0,90$, Methanol), Lit.⁷: Schmp. 153–154°, $[\alpha]_D^{18} - 7,0^\circ$ ($c=2,0$, Äthanol)] identisch (vgl. Tabelle 1), gewonnen durch salzsaure Hydrolyse von Gibberellinsäure (I)⁷ bzw. von authent. II unter gleichen Bedingungen.

Alkalische Hydrolyse von II. Verbindung II (aus Pilzkultur gewonnen, 150 μg) wurden mit 0,2 ml 0,1 N NaOH 72 Stdn. bei Raumtemp. stehengelassen. Nach vorsichtigem Ansäuern mit 0,1 N HCl wurde mit Essigester extrahiert. In der Essigesterfraktion liess sich Dicarbonsäure V⁹ durch DC (Tabelle 1) und DE ($\bar{U}_F=0,76\text{ }\mu\text{/sec/cm/V}$) nachweisen.

Biotest. Zur quantitativen Bestimmung der biologischen Wirksamkeit (vgl. Tabelle 2) wurden Zwergerbsen, *Pisum sativum* L. s.l. ssp. *sativum* convar. *sativum* var. *cimitari* Alef. s.l. cv. „Meteor“, sowie die Zwergmutanten d-1 und d-5 von *Zea mays* L. verwendet. Versuchsbedingungen und -durchführung entsprachen der bereits beschriebenen Methodik.¹³

Anerkennung—Wir danken den Herren Dr. R. Tümmler, Dresden, und Dr. H. Budzikiewicz, Braunschweig, für die Aufnahme von Elektronenanlagerungs- bzw. Elektronenstoss-Massenspektren sowie Frau G. Pufahl für technische Mitarbeit.