

ЛЕМБЕ ХАЛЛОП, У. МАРГНА

О СВЕТОЗАВИСИМОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТОЦИАНОВ И РУТИНА В СЕМЯДОЛЬНЫХ ЛИСТОЧКАХ ПРОРОСТКОВ ГРЕЧИХИ

В 1966 г. в нашей лаборатории на проростках гречихи как модельном объекте были начаты кинетические исследования для получения новой информации о влиянии света на образование различных веществ с флавоноидной структурой. Результаты первых серий исследований, проведенных на гипокотылях (Hallor, Margna, 1968, 1969), подтвердили данные некоторых авторов о сходстве ответных реакций разных групп флавоноидов на световую обработку (Grisebach, Vorr, 1959; Harraschain, Mohr, 1963; Scherf, Zenk, 1967) и показали, что между светозависимостью биосинтеза антоцианов и рутина (единственных флавоноидов, кроме лейкоантоцианов, в гипокотылях гречихи) принципиальных различий нет. Однако сущность стимулирующего эффекта света на образование как антоцианов, так и рутина, по-прежнему оставалась нераскрытой. Не было ясно, связана ли эта стимуляция с наличием в цепи биогенеза флавоноидов какого-нибудь фермента, специфически требующего для своего действия раздражения светом, или же это вторичный результат более отдаленного влияния света на обменные процессы проростков. Вопрос осложнялся еще и тем, что семядольные листочки проростков гречихи способны синтезировать антоцианы и без участия света, а в гипокотылях этого не наблюдается. Не было исключено, что в семядольях стимулирующее действие света подчиняется несколько иным закономерностям, тем более что в экспериментах с проростками некоторых других видов растений наблюдения такого рода уже отмечались (Vorr, 1960; Engelsma, Meijer, 1965). Для уточнения этих вопросов возникла необходимость изучить световую зависимость образования антоцианов и рутина также в семядольных листочках проростков гречихи, поставив эксперименты по точно такой же схеме, как при работе с гипокотылями. В настоящей статье представлены результаты этих исследований.

Материал и методика

Эксперименты проводились с проростками гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) местного эстонского сорта 'Йыгеваская отборная', выращенными по стандартной методике, примененной в предыдущих работах (Hallor, Margna, 1968, 1969).

Световая обработка проростков начиналась через 68 ч после посева семян и проводилась люминесцентными лампами ЛДЦ-30. Применялись 1-, 2-, 4-, 6-, 12-, 24- и 48-часовые экспозиции; интенсивность освещения — $27\,200 \pm 800$ эрг·см⁻²·сек⁻¹. Такая же интенсивность использовалась в экспериментах для определения конечного количества

антоцианов, образовавшихся через 48 ч после начала световых экспозиций разной продолжительности. В опытах с освещением проростков светом разной интенсивности ($27\ 200 \pm 800$ и $56\ 800 \pm 1200$ эрг·см⁻²·сек⁻¹) использовались 12- и 48-часовые экспозиции. В течение экспериментов температура поддерживалась на уровне $25 \pm 1^\circ\text{C}$.

В кинетических экспериментах пробы для анализа брались непосредственно перед освещением, во время экспозиции и в течение последующего темного периода через 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 26, 30, 38 и 48 ч после начала освещения. В те же сроки брались пробы и в контрольных сериях с неосвещенными проростками, а в отдельных темновых сериях было взято несколько дополнительных проб еще до стандартного начала экспериментов. Во всех остальных случаях анализы проводились только по окончании экспериментов, т. е. через 48 ч после начала освещения.

Антоцианы определялись фотоколориметрически ($\lambda_{\text{макс}}=540$ нм) по описанной методике (Hallop, Margna, 1968) с применением в данном случае для экстракции пигментов 1%-ной этанольной соляной кислоты (этанол:вода; 1:1 по объему) и учетом также неантоцианового фона поглощения. Фон определяли методом окисления пигментов в бесцветные соединения перекисью водорода. Для этого к окрашенным экстрактам после предварительного измерения их оптической плотности прибавляли по пять капель 30%-ного раствора перекиси водорода, смесь тщательно взбалтывали и оставляли на 3 ч при комнатной температуре, после чего измерение повторялось. Содержание антоцианов вычисляли по разнице между двумя измерениями, выражая количество пигментов в условных единицах по шкале оптической плотности на один проросток.

Содержание рутина определялось по разработанному в нашей лаборатории комбинированному методу, базирующемуся на предварительном разделении флавоноидного комплекса семядольных листочков с помощью двухмерной восходящей хроматографии на бумаге и на последующем спектрофотометрическом измерении оптической плотности спиртового элюата пятна рутина при $\lambda=360$ нм (Margna, Margna, 1969). Результаты выражались в микрограммах рутина на один проросток.

Все эксперименты были проведены в 5—10 повторностях. Результаты их подвергались вариационно-статистической обработке с использованием *t*-критерия и дисперсионного анализа.

Результаты исследований

Антоцианы. Хотя в семядольных листочках некоторое количество пигментов образуется уже в темноте, общий характер накопления антоцианов после воздействия светом оказался весьма сходным с накоплением пигментов в гипокотылях в тех же условиях освещения (Hallop, Margna, 1968). Как в гипокотылях, так и в семядолях стимуляция образования пигментов тем больше, чем продолжительнее обработка светом, причем и в семядольных листочках светиндуцированный биосинтез антоцианов начинается после короткой лаг-фазы, затем в течение определенного периода продолжается более или менее равномерно и интенсивно, а потом постепенно замедляется до почти полного прекращения процесса (рис. 1 и 2). Судя по кинетическим кривым, интенсивность накопления антоцианов заметно снижается приблизительно через 15—18 ч после начала световой экспозиции, т. е. примерно в то же время, когда и в гипокотылях замедляется светиндуцированное накопление пигментов.

Некоторые различия, однако, все же имеются. В частности, бросается в глаза несколько иная реакция семядольных листочков на увеличение продолжительности освещения. В гипокотылях общее количество образовавшихся антоцианов в весьма длинном диапазоне световых экспозиций было практически линейно длине иницирующего светового периода, а начиная с экспозиций продолжительностью более 16 ч наблюдалось постепенное, но не особенно сильное снижение эффективности света (Hallop, Margna, 1968; Халлоп, Маргна, 1969). В семядольных листочках об ана-

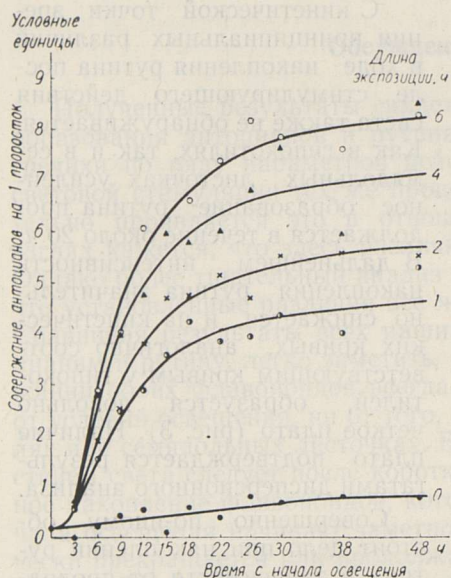


Рис. 1. Кинетика накопления антоцианов в темноте (0 ч) и при 1–6-часовых экспозициях.

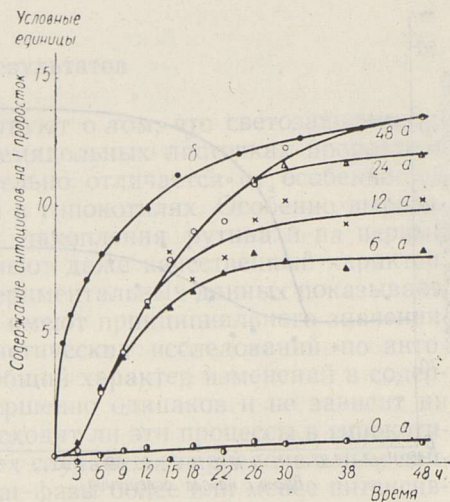


Рис. 2. а — кинетика накопления антоцианов при 0- (темнота)-, 6-, 12-, 24- и 48- (постоянном) - часовом освещении; б — количество антоцианов, образовавшихся к концу 48-часового периода при экспозициях разной продолжительности. По оси абсцисс: а — время с начала освещения, б — продолжительность экспозиций.

логичной линейной зависимости говорить нельзя. Как видно из рис. 2, вполне достаточно кратковременного действия света на проростки, чтобы вызвать в их семядолях значительную и довольно резкую стимуляцию накопления антоцианов. Вследствие этого уже под влиянием 3-часового освещения реализуется около 50% общей пигментсинтезирующей способности семядолей (в гипокотилеях соответственно около 15%), а при 15-часовой экспозиции конечное количество пигментов составляет более 80% (в гипокотилеях 50—55%) того максимального уровня их содержания, который может быть достигнут к концу 48-часового экспериментального периода в условиях непрерывного освещения. Эффективность дальнейшего увеличения продолжительности световых экспозиций уже весьма незначительна.

Типичная для семядолей быстрая реакция на действие света и их относительная инертность в отношении увеличения продолжительности освещения проявляются также при сравнении кинетики образования антоцианов в гипокотилеях и семядолях в условиях постоянного освещения (рис. 2). В гипокотилеях (Халлоп, Маргна, 1969) накопление антоцианов в этих условиях проходило совершенно линейно продолжительности освещения в течение 30—35 ч, а в семядолях аналогичная линейность сохранялась только в течение первых 12—15 ч.

Рутин. Общий характер накопления рутин в семядолях весьма близок характеру этого же процесса в гипокотилеях. Как те, так и другие способны синтезировать значительные количества рутин без всякого участия света, причем в обоих органах общее содержание синтезированного в темноте рутин к концу 48-часового экспериментального периода примерно вдвое больше, чем в начале опытов, т. е. в 68-часовом возрасте проростков. Внимания заслуживает только то, что темновой фон рутин в семядолях примерно в 10 раз выше, чем в гипокотилеях — около 15—20 мкг на один проросток (рис. 2; ср. Hallop, Margna, 1969).

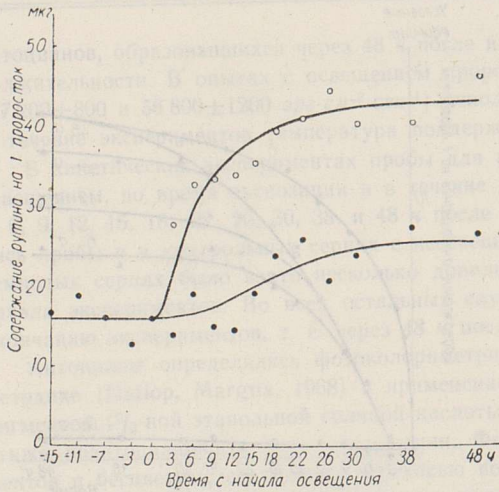


Рис. 3. Кинетика накопления рутина в темноте (нижняя кривая) и при 1—6-часовых экспозициях (верхняя кривая). 0 на оси абсцисс обозначает начало освещения и соответствует 68-часовому возрасту проростков.

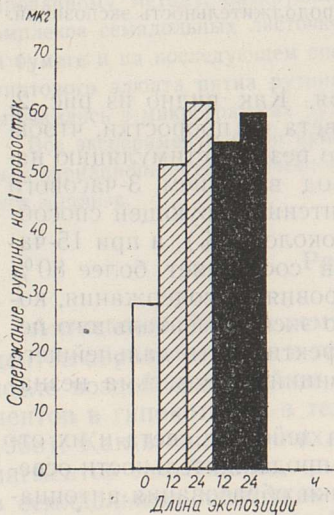


Рис. 4. Количество рутина, образовавшегося к концу 48-часового периода при 12- и 24-часовых экспозициях светом интенсивностью 27 200 (заштрихованные столбики) и 56 800 (черные столбики) $\text{эрг}\cdot\text{см}^{-2}\cdot\text{сек}^{-1}$. Белый столбик — темновой контроль.

С кинетической точки зрения принципиальных различий в ходе накопления рутина после стимулирующего действия света также не обнаруживается. Как в гипокотилеях, так и в семядольных листочках усиленное образование рутина продолжается в течение около 20 ч. В дальнейшем интенсивность накопления рутина значительно снижается, и на кинетических кривых, аналогично соответствующим кривым у гипокотилей, образуется довольно четкое плато (рис. 3). Наличие плато подтверждается результатами дисперсионного анализа.

Совершенно по-иному обстоит дело при накоплении рутина в зависимости от продолжительности освещения. В отличие от гипокотилей (Hallor, Margna, 1969) в семядольных листочках увеличение длины иницирующего светового периода не вызывало сколько-нибудь существенных изменений в интенсивности образования рутина и, например, в пределах 1—6-часовых экспозиций, при которых в гипокотилеях наблюдалась четкая линейная зависимость, эффект света оказался практически одинаковым как относительно конечного количества рутина в семядолях, так и относи-

тельно хода его накопления. Различия между отдельными вариантами были в обоих случаях весьма незначительны и не превышали границы случайного варьирования, что позволило кинетику накопления рутина выразить в виде одной суммарной кривой (рис. 3).

Заметного увеличения общего эффекта света не было обнаружено также в условиях продолжительного или более интенсивного освещения (рис. 4). Наблюдалась лишь некоторая тенденция к усилению накопления рутина при использовании более длительных световых экспозиций, что, однако, может быть обусловлено косвенными причинами, например действием света через развивающийся фотосинтетический аппарат семядолей.

Обсуждение результатов

Полученные результаты свидетельствуют о том, что светозависимость образования антоцианов и рутина в семядольных листочках проростков гречихи по ряду параметров действительно отличается от особенностей световой стимуляции тех же процессов в hypocotyls. Особенно выразительно проявляется это в отношении накопления рутина и на первый взгляд кажется, что здесь различия имеют даже качественный характер. Однако более тщательный анализ экспериментальных данных показывает, что установленные различия все же не имеют принципиального значения. Сравнивая результаты всех наших кинетических исследований по антоцианам и рутину, легко заметить, что общий характер изменений в содержании обоих флавоноидов всегда совершенно одинаков и не зависит ни от условий освещения, ни от того, происходят ли эти процессы в hypocotyls или семядольных листочках. Во всех случаях за первоначальным действием света следует после короткой лаг-фазы более или менее интенсивное накопление флавоноидов, которое примерно через 15—18 ч после начала освещения начинает заметно ослабляться, а через 30—32 ч практически прекращается или продолжается лишь с очень незначительной скоростью. Все различия как между антоцианами и рутином, так и hypocotyls и семядольными листочками, выделяются исключительно на фоне этой общей картины и заключаются по сути дела лишь в разном диапазоне ответных реакций на увеличение продолжительности или интенсивности освещения. Это указывает на то, что действие света на образование как антоцианов, так и рутина осуществляется во всем проростке через один и тот же регулирующий механизм, причем некоторые различия в проявлении эффекта света в семядольных листочках и hypocotyls скорее всего обусловлены особенностями обменных процессов в этих органах. Одновременно выясняется, что световая стимуляция образования обоих флавоноидов не может быть результатом специфического действия света на эти процессы. Свет, по-видимому, поглощается каким-то светочувствительным ферментом более общего значения, который непосредственно не входит в систему специфических реакций биогенеза флавоноидов, но связан с этими процессами через катализируемую им реакцию, которая, по всей вероятности, является поставщиком какого-то необходимого субстрата для биосинтеза флавоноидов.

Исходя из этих соображений, сравнительно легко объяснить установленные нами различия как в светозависимости образования антоцианов и рутина, так и в проявлении эффекта света в семядолях и hypocotyls. Все они являются, по существу, лишь отражением различий в степени насыщенности (или насыщенности) соответствующих процессов в отношении указанного субстрата как насыщающего фактора. При этом выясняется, что реакции, приводящие к образованию рутина, насыщаются этим субстратом заметно быстрее, чем процессы биосинтеза антоцианов, в то время как оба эти процесса в семядолях гораздо легче насыщаются, чем в hypocotyls.

Таким образом, можно прийти к выводу, что важнейшую роль в проявлении стимулирующего эффекта света на образование антоцианов и рутина в проростках гречихи играет указанный гипотетический продукт первичной светочувствительной реакции (обозначим его буквой А), определенная часть которого используется в качестве субстрата в реакциях биосинтеза этих флавоноидов. Имея в виду способность hypocotyls образовывать антоцианы и рутин и после отделения их от семядолей, следует предположить, что исходным материалом для синтеза метаболита А яв-

ляется какой-нибудь более ранний продукт гидролитического расщепления запасных веществ семядолей, который уже в этиолированных проростках в некоторых количествах передвигается из семядольных листочков в гипокотили. При этом нет сомнения, что метаболит А продуцируется в пропорциональных количествах поглощенной световой энергии, но его общий выход, а также доступность для биосинтеза флавоноидов в семядолях гораздо выше, чем в гипокотылях. Это может быть обусловлено обилием исходного материала в семядолях и недостатком его в гипокотылях, что не компенсируется и частичной транслокацией уже готового метаболита А из семядолей в гипокотили. С другой стороны, не исключено, что различия в доступности метаболита А для биосинтеза флавоноидов в семядолях и гипокотылях обусловлены различиями в распределении его между всеми пугдающимися в нем процессами в том или ином органе: вполне возможно, что в гипокотылях относительная его доля, которая может быть использована в реакциях синтеза антоцианов и рутина, гораздо меньше, чем в семядолях. Так или иначе, следствием этого является то, что в семядолях количество метаболита А при поглощении уже сравнительно небольших количеств световой энергии достигает уровня, которого вполне достаточно для полного насыщения системы образования рутина и почти достаточно для насыщения процессов биосинтеза антоцианов. В гипокотылях для этого необходимы гораздо более высокие дозы световой энергии.

Некоторое количество метаболита А образуется в проростках, по-видимому, и в темноте, причем это, наверняка, происходит по какому-нибудь другому биохимическому пути, не требующему участия света. Однако эффективность этого пути весьма низка и может обеспечить образование лишь небольших количеств флавоноидов. Что же касается различий между насыщаемостью процессов образования антоцианов и рутина, то это, по-видимому, обусловлено преимущественным использованием метаболита А в цепи биосинтеза рутина, которая из-за меньшей сложности строения молекулы на несколько ступеней короче цепи биосинтеза антоцианов (Harborne, 1962). В пользу этого говорит также тот факт, что лаг-фаза в образовании рутина выражена гораздо менее отчетливо, чем при образовании антоцианов.

Изложенная гипотеза хорошо согласуется со всеми полученными нами данными о стимулирующем действии света на образование антоцианов и рутина в проростках гречихи и совместима также с неспособностью гипокотилей синтезировать антоцианы в темноте, в то время как семядольные листочки этиолированных проростков обладают этой способностью. Это, по-видимому, обусловлено крайне низким уровнем доступного для биосинтеза флавоноидов субстрата в этиолированных гипокотылях, достаточного для образования небольших количеств рутина, но не хватает для накопления измеримых количеств антоцианов.

О природе метаболита А как ключевого продукта первичной фотореакции в проростках трудно делать какие-нибудь предположения, но роль самого фоторецептора, по всей вероятности, играет какой-нибудь компонент так наз. высокоэнергетической системы. Последний, кроме семядолей, явно локализован и в гипокотылях: светиндуцированное образование антоцианов и рутина наблюдается также в гипокотылях декапитированных проростков гречихи (неопубликованные данные нашей лаборатории).

ЛИТЕРАТУРА

- Халлоп Л., Маргна У., 1969. О характере накопления антоцианов в гипокотылях гречихи при продолжительных световых экспозициях. Изв. АН ЭССР. Биол. 18 (2) : 231—233.

- Bopp M., 1960. Zur Frage der Lichtabhängigkeit der Leucoanthocyan synthese. Naturwissenschaften. **47** (7) : 158.
- Engelsma G., Meijer G., 1965. The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. I. Biosynthesis of phenolic compounds. Acta Bot. Neerl. **14** : 53—72.
- Grisebach H., Bopp M., 1959. Untersuchungen über den biogenetischen Zusammenhang zwischen Quercetin und Cyanidin beim Buchweizen mit Hilfe ¹⁴C-markierter Verbindungen. Z. Naturforsch. **14** (8) : 485—490.
- Hallop L., Margna U., 1968. Antotsüaani moodustumise kineetika tatraidandite hüpokotüülides, olenevalt indutseeriva valgusperioodi kestusest ja valguse intensiivsusest. ENSV TA Toimetised, Bioloogia **17** (2) : 154—163.
- Hallop L., Margna U., 1969. Rutiini moodustumise kineetika tatraidandite hüpokotüülides olenevalt valgustusest. ENSV TA Toimetised, Bioloogia **18** (2) : 184—195.
- Harborne J. B., 1962. Chemicogenetical studies of flavonoid pigments. In: The Chemistry of Flavonoid Compounds : 593—617. Oxford—London—New York—Paris, Pergamon Press.
- Harraschain H., Mohr H., 1963. Der Einfluß sichtbarer Strahlung auf die Flavonoid-Synthese und Morphogenese der Buchweizenkeimlinge (*Fagopyrum esculentum* Moench). II. Flavonoidsynthese und Hypokotylwachstum. Z. Botanik **59** (3) : 277—299.
- Margna U., Margna E., 1969. A suitable chromatographic method for quantitative assay of rutin and flavone C-glycosides in buckwheat seedlings. ENSV TA Toimetised, Bioloogia **18** (1) : 40—50.
- Scherf H., Zenk M. H., 1967. Der Einfluß des Lichtes auf die Flavonoidsynthese und die Enzyminduktion bei *Fagopyrum esculentum* Moench. Z. Pflanzenphysiol. **57** (5) : 401—418.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
20/V 1969

LEMBE HALLOP, U. MARGNA

TATRAIDANDITE IDULEHTEDES TOIMUVA ANTOTSÜAANIDE JA RUTIINI BIOSÜNTEESI SÖLTUVUS VALGUSEST

Resümee

Antotsüaanide ja rutiini moodustumise ajaline kulg indutseeriva valgus- ja sellele järgneva pimedusperioodi kestel osutus idulehtedes põhimõtteliselt samasuguseks kui hüpokotüülides. Stimuleeriva efekti sõltuvus valgustamise kestusest oli aga idulehtedes mõlema ühendi osas märgatavalt erinev. Antotsüaanide moodustumisel hüpokotüülides täheldatud lineaarset sõltuvust praktiliselt ei esinenud ning valgustusaja pikendamise suurendas pigmendisisaldust suhteliselt vähe. Seejuures kahanes valguse suhteline efektiivsus ekspositsiooniaegade pikenedes järsult. Idulehtedes sünteesitava rutiini hulk aga ei sõltunud valgusperioodi kestusest ja jäi kasutatud ekspositsiooniaegade vahemikus (1—6 t.) alati ühele ja samale tasemele. Sellest järeidub, et valguse stimuleeriv efekt antotsüaanide ja rutiini moodustumisele ei ole seotud tema otsese mõjuga mingile spetsiifilisele lülile flavonoidide biosünteesi ahelas, vaid tuleneb valguse toimest üldisema tähtsusega valgustundlikusse fermentsüsteemisse (tõenäoliselt nn. kõrge energia süsteemisse), mis varustab flavonoidide biosünteesiprotsessi substraadiga. Kõik erinevused antotsüaanide ja rutiini biosünteesi valgusliku sõltuvuse vahel ning valguse mõjus mõlemale protsessile hüpokotüülides ja idulehtedes on seletatavad nende protsesside erineva küllastatusega selle substraadi suhtes.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Saabus toimetuses
20. V 1969

LEMBE HÄLLOP, U. MARGNA

THE INFLUENCE OF LIGHT ON THE FORMATION OF ANTHOCYANINS
AND RUTIN IN BUCKWHEAT SEEDLING COTYLEDONS*Summary*

It was found that the time course of anthocyanin and rutin formation in cotyledons during the inductive light period and the subsequent dark phase is essentially similar to that revealed in hypocotyls. However, the dependence of the stimulatory effect of light upon the duration of the illumination period was considerably different in both organs. Concerning light-stimulated formation of anthocyanins, the linearity of responses typical for these processes in hypocotyls could not be observed in cotyledons, but the increase in the duration of light periods resulted only in a comparatively small increase in pigment content. This was accompanied by a rather rapid decrease of light efficiency as the expositions became longer. In rutin synthesis, the differences between hypocotyls and cotyledons were still more drastic. In cotyledons, the process showed no dependence upon the duration of light period at all, and the content of rutin synthesized in this organ remained the same practically within all of the range of expositions (1—6 h) used. A conclusion was made that the stimulatory effect of light on the formation of anthocyanins and rutin in buckwheat seedlings is not related to its direct influence on some specific light-sensitive step in the chain of flavonoid biosynthesis, but is a result of the action of light via a light-absorbing enzyme system of more general importance (most probably a part of the system responsible for the so-called high energy reaction of photomorphogenesis), which produces a substrate needed for flavonoid biosynthesis. All differences revealed between the light dependence of the formation of anthocyanins and rutin on the one hand, and of both of these processes in cotyledons and hypocotyls on the other, are presumably called forth merely by the different rate and degree of saturation of these processes with this unknown substrate.

*Academy of Sciences of the Estonian SSR,
Institute of Experimental Biology*

Received
May 20, 1969