

<https://doi.org/10.3176/biol.1969.2.07>

L. HALLOP, U. MARGNA

RUTIINI MOODUSTUMISE KINEETIKA TATRAIDANDITE HÜPOKOTÜÜLIDES OLENEVALT VALGUSTUSEST

Valgustundlike biosünteesiprotsesse taimedes jaotatakse tavaliselt kahte rühma: reaktsioonid, mille toimuma hakkamiseks on valgus obligatoorne, ja protsessid, mis võivad kulgeda ka pimedas, kuid mille kiirust ja ulatust valgus väga tugevasti suurendab. Esimeste klassikaliseks näiteks on antotsüaanide süntees etioleerunud tatraidandite hüpokotüülides, teiste puhul on sageli viidatud rutiini sünteesile sealsamas (Grisebach, Bopp, 1959; Scherf, Zenk, 1967b).

Kirjanduse andmetest flavonoidide sünteesi kohta jääb mulje, et antotsüaanide ja ülejäänud flavonoidide sünteesi puhul on valguse mõju neile protsessidele printsiipselt erinev. H. Harraschain ja H. Mohr (1963) on seisukohal, et flavonoididele iseloomulik oksüdatsioonaste on saavutatav ka pimedas, kuid etioleerunud idandite ainevahetuses toimuvad valguse mõjul olulised nihked, mille tagajärjel tõuseb flavonoidskeleti eellaste hulk ja lõppkokkuvõttes stimuleerub kõikide flavonoidide süntees. Antotsüaanide kui redutseerunud ühendite sünteesiks vajatakse aga lisaks otsestele eellastele veel taandatud püridiinnukleotiidide suuremaid varusid, mille teket võimaldab ainevahetuse oluline ümberkorraldumine valguse mõjul.

Antotsüaanide sünteesi sõltuvust mitmesugustest välisfaktoritest, eiti valgusest, on mitmekülgsest uuritud paljudes objektides. Teiste flavonoidide biosünteesi tingimustega on tegeldud suhteliselt vähe, piirdues enamasti selle asjaolu esiletoomisega, et valgus nende sünteesi soodustab. H. A. Stafford (1965) leidis, et sorgoidandis esinevate flavonoidsete ühendite süntees on erineva valgusevajadusega, mistõttu eri ühendite erikaal flavonoidide üldsummas on erinev mitte ainult etioleerunud ja valgustatud taimedes, vaid ka erineva intensiivsusega valguse kasutamise puhul. Ka ühe ja sama ühendi sünteesi sõltuvus valgusest on eri objektides sageli osutunud erinevaks. Seepärast on valguse toimemehhanismide uurimisel hädavajalik kõrvutada samas objektis toimuvaid biosünteesiprotsesse.

Üheks sobivamaks objektiks kompleksseteks uurimisteks on etioleerunud tatraidandid, mille kudedes leidub üheaegselt mitmesse flavonoidide klassi kuuluvaid ühendeid: hüpokotüülis esineb peale antotsüaanide rutiini — flavonoolide klassi kuuluva aglükooniga kvartsetiin-3-glükosiidi —, idulehed aga sisaldavad lisaks nimetatutele veel nelja flavoon-C-glükosiidi: orientiini, homo-orientiini, viteksiini ja saponaretiini (Тохвер и др., 1967).

Seniste uurimuste põhjal (Grisebach, Bopp, 1959; Scherf, Zenk, 1967b) on teada, et hüpokotüülides valguse toimel algav antotsüaanide

süntees kulgeb peaaegu paralleelselt rutiini omaga. Reaktsioonide kineetika üle otsustamiseks aga ei ole need andmed piisavad. H. Scherfi ja M. H. Zenki (1967b) katsetes jälgiti rutiinisisalduse muutust ainult 12-tunnise valgustuse ja sellele järgnenud 12-tunnise pimedas toimunud inkubatsiooni kestel; H. Grisebach ja M. Bopp (1959) alustasid analüüse alles pärast 10-tunnise valgustamise lõppu. Ka kasutatud valguse intensiivsused ei ole võrreldavad.

Selle lünga vähendamiseks uuriti käesolevas töös rutiini sünteesi kineetika sõltuvust induktiivse valgustuse kestusest ja valguse intensiivsusest ning tulemusi võrreldakse nendega, mis saadi antotsüaanide sünteesi jälgimisel analoogilistes tingimustes (Hallop, Margna, 1968).

Metoodika

Katsealused idandid kasvatati tatrastordi 'Jõgeva valik' 1966. aasta lõikuse seemnetest. Seemnete ettevalmistamist ja idandite kasvatamist on põhjalikult kirjeldatud meie eelmises töös (Hallop, Margna, 1968).

68 tundi pärast külvi algas idandite valgustamine luminesentslampidega (ЛДЦ-30) raamide all, kus temperatuur tasside tasapinnas hoiti 25 ± 1 °C piirides. Rutiini biosünteesi kineetika uurimiseks olenevalt induktiivse valgustuse kestusest kasutati 1–48-tunniseid ekspositsioone valguse intensiivsusega $27\,300 \pm 700$ erg · cm⁻² · sec⁻¹ ja olenevalt induktiivse valguse intensiivsusest — 5-tunniseid ekspositsioone valguse intensiivsusega vastavalt $13\,300 \pm 700$, $27\,300 \pm 700$ ja $59\,000 \pm 4000$ erg · cm⁻² · sec⁻¹. Pärast ekspositsiooni hoiti idandid katse lõpuni pimedas.

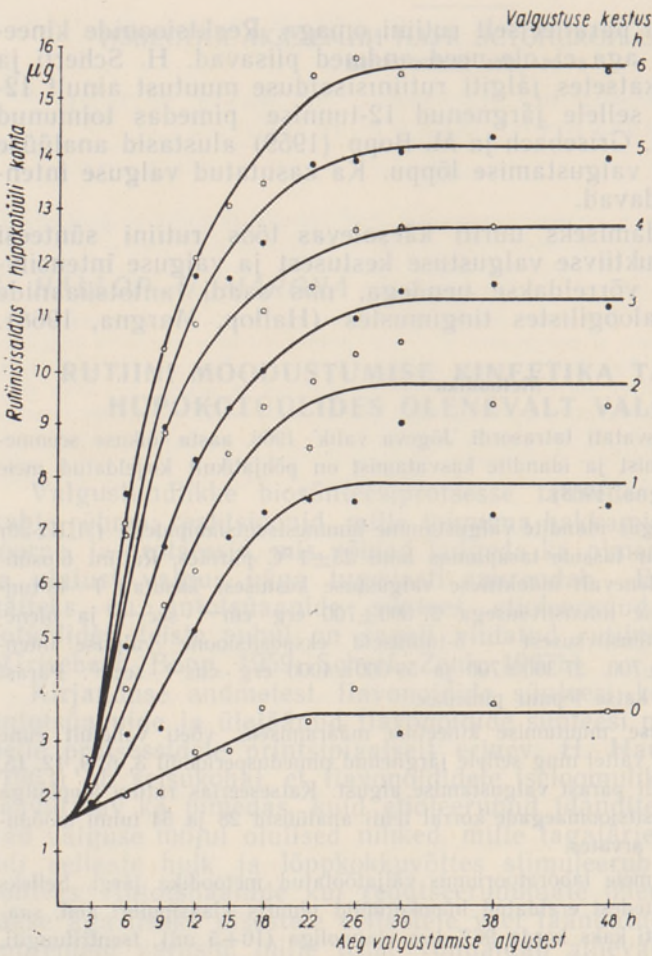
Analüüsid rutiinisisalduse muutumise kineetika määramiseks võeti vahetult enne ekspositsiooni, ekspositsiooni vältel ning sellele järgnenud pimedusperioodil 3, 6, 9, 12, 15, 18, 22, 26, 30, 38 ja 48 tundi pärast valgustamise algust. Katseerias rutiini lõpphulga määramiseks pikemate ekspositsiooniaegade korral tehti analüüsid 28 ja 54 tunni möödumisel valgustamise algusest arvates.

Rutiinisisaldus määrati meie laboratooriumis väljatöötatud metoodika järgi. Selleks peenestati juurtest ja idulehtedest eraldatud hüpokotüülid uhmris klaaspulbri abil, saadud homogenaati ekstraheeriti kaks korda 96%-lise etanooliga (10+5 ml), tsentrifuugiti, tsentrifugaadid ühendati ning aurutati seejärel toatemperatuuril kuivaks. Aurutusjäák lahustati 1 ml destilleeritud vee ja 1 ml 96%-lise etanooli segus ning kanti sellest 0,2 ml kromatograafiapaberile Filtrak FN-11 (SDV firma VEB Spezialfabrik Niederschlag/Erzgeb. toode). Kromatogramme voolutati toatemperatuuril tõusva kromatograafia meetodil, kasutades selleks kahte voolutit: esimesena isoamüülalkoholi-petrooleetri-äädikhappe-vee segu vahekorras 3:1:3:3 (ülemine faas), teisena 3%-list äädikhapet. Kuivatatud kromatogrammidel märgiti ultravioletvalguses rutiini laigud, mis seejärel lõigati välja, peenestati ja elueeriti 5 ml 95%-lise etanooliga 3 tundi, kolbe perioodiliselt lokutatades. Pärast filtreerimist määrati spektrofotomeetri CF-4A abil eluaadi optiline tihedus 360 nm juures. Kontroll-lahusena kasutati eluaali samades lahustites voolutatud puhta kromatograafiapaberi vastavast piirkonnast. Elueerimist korraldi, seekord kahe tunni vältel, ja saadud mõõtmistulemused liideti eelmistega. Rutiinisisaldus väljendati mikrogrammides 1 hüpokotüüli kohta (Margna, Margna, 1969).

Katsed tehti 6–9 korduses. Katsetulemuste variatsioonstatistiliseks töötlemiseks kasutati dispersioonanalüüsi koos Duncani testiga (Weber, 1961; Снедекор, 1961).

Katsete tulemused

Rutiini biosünteesi kineetika sõltuvus induktiivse valgustuse kestusest. Valguse poolt indutseeritud rutiini sünteesi kineetilisi kõveraaid vaadates näeme, et paaritunnisele lag-faasile järgneb rutiinisisalduse ühtlane, praktiliselt lineaarne tõus, mis hakkab umbes 18. tunnil pärast valgusta-



mise algust aeglustumata, kusjuures rutiinisaldus saavutab 26.—30. tunniks maksimumi (joon. 1). Dispersioonanalüüs (tab. 1), samuti kineetiliste kõverate üksikutele ajamomentidele vastavate rutiinihulkade keskmiste väärtuste võrdlemine Duncani testiga (joon. 2) kinnitavad, et alates 26. tunnist ei ole rutiinisalduse muutumine statistiliselt oluline. Seega on rutiini sünteesi kineetiliste kõverate üldkujuga analoogiline

Joon. 1. Rutiini pimedusliku biosünteesi kineetika sõltuvus induktiivse valgustuse kestusest. Valgustuse intensiivsus $27\,300 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

antotsüaanide omaga (Hallop, Margna, 1968), kusjuures ka rutiini pimedusliku sünteesi kiirus lineaarsel perioodil ekspositsiooniaja pikenedes suureneb. Põhiliselt analoogiline antotsüaanidega on ka sünteesitud rutiini lõpphulga sõltuvus induktiivse valgustuse kestusest, kuid siin tulevad siiski esile teatud erinevused. Kui moodustunud antotsüaanide lõpphulk oli praktiliselt lineaarses sõltuvuses valgustamisajast suhteliselt pikas ekspositsiooniaegade vahemikus (vähemalt kuni 16 tunni), siis rutiini puhul esineb lineaarne sõltuvus ainult umbes kuni 8 tunni piiris. Lineaarse sõltuvuse esinemist viimasel puhul kinnitab ilmekalt 1—6-tunniste ekspositsiooniaegadega saadud tulemuste dispersioonanalüüs (tab. 2). Näeme, et lineaarsus kehtib mitte ainult rutiini lõpphulga osas, vaid kõikidel vaadeldud ajamomentidel ka üleminekuperioodil ühtlase kiirusega sünteesilt (kõverate lineaarne osa) dünaamilise tasakaalu olukorrale (plato). Pikemaajalisel valgustamisel aga ilmneb valgushulga suhtelise efektiivsuse vähenemine, mida demonstreerivad joonisel 3 toodud rutiini sünteesi kineetilised kõverad.

Ulevaate sünteesitud rutiini lõpphulga sõltuvusest valgustuse kestusest annab joonis 4. Selles katseseerias kestis induktiivne valgustus kuni 48 tundi. Rutiinisaldus määrati kõikides variantides 28 ja 54 tundi

Tabel 1

Rutiini pimedusliku biosünteesi dispersioonanalüüs

| Varieeruvuse allikas | Vabadus- astmete arv | Hälvete ruutude summa | Keskmine ruut |
|---|----------------------------|-----------------------------|------------------|
| Totaalne | 539 | 157 876 | |
| A. Valgustuse kestus | 6 | 55 690 | 9 282** |
| Sellest | | | |
| valgustatud variantide (1—6 tundi) sees | 5 | 20 501 | 4 100** |
| kontrollvariandi ja valgustatud variantide vahel | 1 | 35 189 | 35 189** |
| B. Aeg valgustamise algusest ana- lüüsini | 11 | 71 826 | 6 530** |
| Sellest | | | |
| I. 0—18 ja 22—48 tunni vahel | 1 | 36 470 | 36 470** |
| 0—18 tunni sees | 6 | 34 964 | 5 827** |
| 22—48 tunni sees | 4 | 392 | 98 |
| II. 0—22 ja 26—48 tunni vahel | 1 | 28 820 | 28 820** |
| 0—22 tunni sees | 7 | 42 946 | 6 135** |
| 26—48 tunni sees | 3 | 60 | 20 |
| Koosmõju A×B | 66 | 13 418 | 203** |
| J ä ä k | 456 | 16 942 | 37 |

** Oluline erinevus ($P \leq 0,01$)

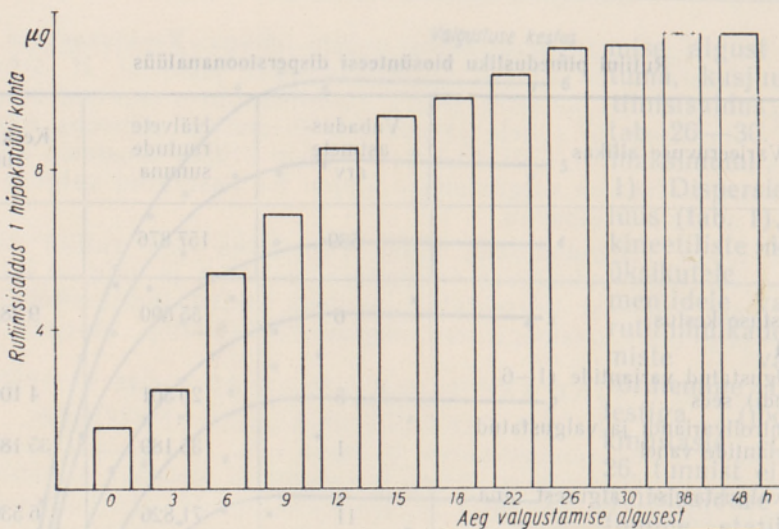
Tabel 2

Dispersioonanalüüs moodustunud rutiini hulga ja induktiivse valgustuse kestuse vahelise sõltuvuse linearsuse kontrollimiseks

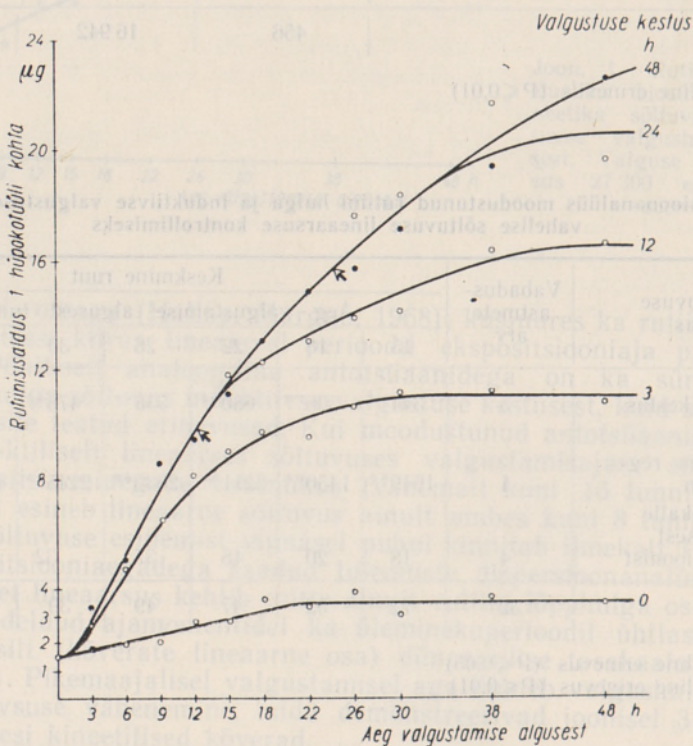
| Varieeruvuse allikas | Vabadus- astmete arv | Keskmine ruut | | | | | | |
|---|----------------------------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | | Aeg valgustamise algusest tundides | | | | | | |
| | | 15 | 18 | 22 | 26 | 30 | 38 | 48 |
| Valgustuse kestus | 5 | 344** | 306** | 680** | 556** | 475** | 880** | 706** |
| Sellest | | | | | | | | |
| lineaarne reg- ressioon | 1 | 1649** | 1450** | 3211** | 2633** | 2245** | 4128** | 2845** |
| kõrvalekalle lineaarsest regressioonist | 4 | 18 | 20 | 48 | 37 | 32 | 68 | 171* |
| V i g a | 32 | 72 | 52 | 47 | 49 | 39 | 81 | 62 |

* Oluline erinevus ($P \leq 0,05$)** Oluline erinevus ($P \leq 0,01$)

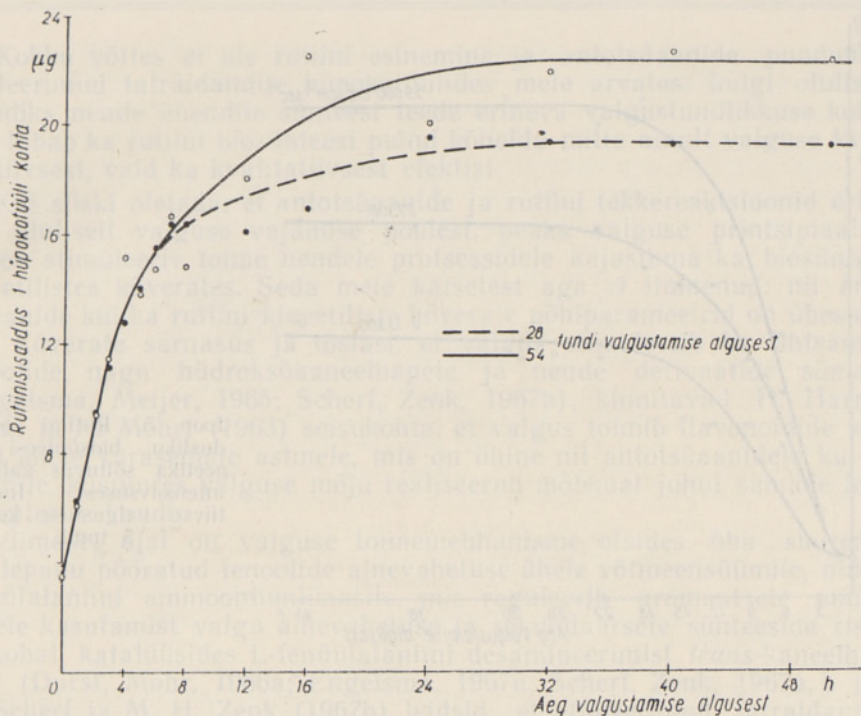
pärast valgustamise algust. Nagu selgub, realiseerub juba 4-tunnise valgustuse mõjul 50% tatraidandi üldisest rutiini sünteesi võimest. 8 tundi pikemad ekspositsiooniajad ei suurenda sünteesitud rutiini lõpphulka



Joon. 2. Kõikide variantide keskmine rutiinisaldus teatud ajamomendil valgustamise algusest arvates. Diagrammi all on joonega ühendatud keskmised, mis Duncani testi alusel omavahel oluliselt ei erine.



Joon. 3. Rutiini biosünteesi kineetika 3-, 12-, 24- ja 48-tunnise valgustuse korral. Valguse intensiivsus $27\,300 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

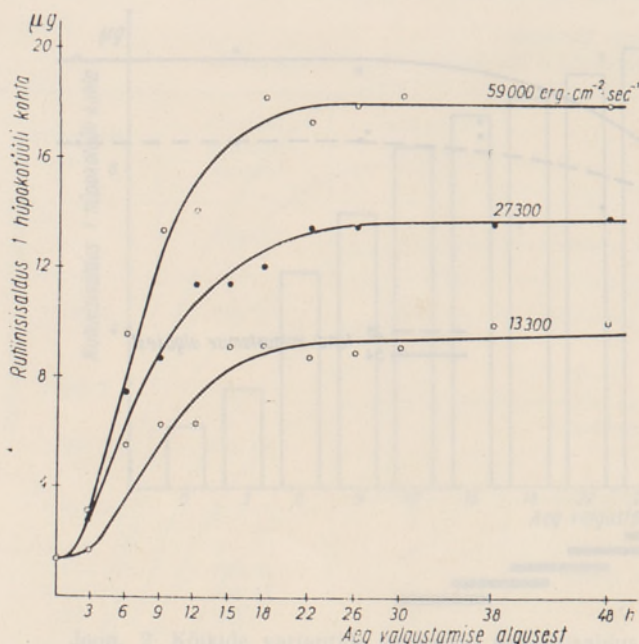


Joon. 4. Rutiini lõpphulk 28 ja 54 tundi pärast valgustamise algust, sõltuvalt valgustuse kestusest. Valguse intensiivsus $27\,300 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$.

kuigi oluliselt, alates 24-tunnisest valgustusest aga on rutiini süntees valgushulga suhtes praktiliselt küllastunud. Jooniseid 1, 3 ja 4 võrreldes võib järeldada, et kuni 6–8-tunniste valgustuste puhul on kõverate platoo saavutatud 28. tunniks, 8–24-tunnise valgustamise korral jätkub rutiinihulga suurenemine ka pärast seda. Kui mitte arvestada sünteesiprotsesside üldkestust valgustamise algusest peale, vaid ainult pimedusliku sünteesi, arvates valgustamise lõpetamisest, siis näeme, et lühema ekspositsiooniaegade puhul on see keskmiselt 20–22 tundi, pikkade korral (24 tundi ja rohkem) on rutiini süntees valgustamise lõppedes juba lähedane küllastumisele ning jätkub pimedas lühemat aega (kineetilised kõverad joonistel 3 ja 4).

Rutiini biosünteesi kineetika sõltuvus kasutatud valguse intensiivsusest. Rutiini sünteesi kineetika määrati valguse kolme erineva intensiivsuse ($13\,300$, $27\,300$ ja $59\,000 \text{ erg} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{sec}^{-1}$) puhul, kusjuures kasutati 5-tunnist induktiivset valgustust.

Katsete tulemused (joon. 5) näitavad, et antotsüaani sünteesil ilmnenud seaduspärasused avalduvad ka rutiini puhul: sünteesitud rutiini lõpphulk on lineaarses sõltuvuses kasutatud valguse intensiivsusest, samuti on analoogiline kineetiliste kõverate üldkuju: pärast paaritunnist lagifaasi algab rutiinisalduse lineaarne tõus, mis kestab praktiliselt muutumatu kiirusega umbes 15. tunnini valgustamise algusest arvates. Edasi sünteesi kiirus väheneb ja 22.–26. tunnist alates jääb rutiinisaldus praktiliselt muutumatuks.



Joon. 5. Rutiini pimedusliku biosünteesi kineetika sõltuvus valguse intensiivsusest. Induktiivse valgustuse kestus 5 tundi.

Arutelu

Vastuse otsimisel küsimusele, kas mingi ühendi sünteesiahelas valgustundlik lüli puudub või esineb, peetakse tavaliselt kõige olulisemaks kriteeriumiks seda, kas etioleerunud idandid suudavad ilma induktiivse valgusimpulsita antud ühendit sünteesida või mitte. Silmas pidades pimedakontrolli rutiinisaldust, võib näida, et tatra puhul ongi meil tegemist esimese juhuga. R. Bassler (1957) leidis, et üldflavonooli hulk tatra etioleerunud idulehtedes ületab 23-kordselt selle sisalduse seemnes, seega ei saa etioleerunud tatraidandis esinev rutiin pärineda valmis kujul seemnest. Tundub aga, et ainuüksi see asjaolu ei anna veel küllaldast alust pidada, rutiini sünteesi protsessiks, mille toimumiseks valgus ei ole obligatoorne. Pimeduses tekkiiv rutiin sünteesitakse ilmselt seemnes leiduvate juba eelmisel vegetatsiooniperioodil normaalsetes valgustustingimustes moodustunud eellaste arvel. Selle seisukoha kaudseks toetuseks võiks pidada meie laboratooriumis täheldatud asjaolu, et etioleerunud tatraidandi idulehtedes, kus algab seemne varuainete transformatsioon, tekib pimedas mitte ainult rutiini, vaid ka teatud, kuigi väike, hulk antotsüaanide (avaldamata andmed). Etioleerunud tatraidandites esinev rutiinisaldus ei kujuta püsivat fooni, vaid muutub katse vältel (joon. 1). Võib oletada, et olemasolevad eellased ei ole meie katsetes analüüsitud alguseks (idandite vanus 68 tundi) veel lõplikult ära kasutatud ning rutiini pimeduslik süntees etioleerunud idandis kestab nende umbes 90-tunniseks saamiseni; H. Scherfi ja M. H. Zenki (1967b) poolt kasutatud 138-tunnistes idandites rutiini hulk pimedas enam ei muutu. Tekib küsimus, miks kulutatakse olemasolevad flavonoidide eellased hüpokotüülides just rutiini, mitte aga antotsüaanide sünteesiks. J. B. Harborne'i (1962) järgi on antotsüaanide biosünteesi tee astmete arv suurem kui vastavate flavoonide ja flavonoolide oma, mistõttu nende kõikide üheaegseks sünteesiks võimelistes kudedes esineb reeglina viimaseid rohkem kui sama substituutsioonistmega antotsüaanide.

Kokku võttes ei ole rutiini esinemine ja antotsüaanide puudumine etioleerunud tatraidandite hüpokotüülides meie arvates kuigi oluliseks tõendiks nende ühendite sünteesi teede erineva valgustundlikkuse kohta, mis lubab ka rutiini biosünteesi puhul kõnelda mitte ainult valguse kvantitatiivsest, vaid ka kvalitatiivsest efektist.

Kui siiski oletada, et antotsüaanide ja rutiini tekkereaktsioonid erinevad oluliselt valguse vajaduse poolest, peaks valguse printsiipiaalselt erinev stimuleeriv toime nendele protsessidele kajastuma ka biosünteesi kineetilistes kõverates. Seda meie katsetest aga ei ilmnenud: nii antotsüaanide kui ka rutiini kineetiliste kõverate põhiparameetrid on ühesugused. Kõverate sarnasus ja tõsiasi, et valgus stimuleerib ka lihtsamate fenoolide, nagu hüdroksükaneelhapete ja nende derivaatide sünteesi (Engelsma, Meijer, 1965; Scherf, Zenk, 1967b), kinnitavad H. Harraschani ja H. Mohri (1963) seisukohta, et valgus toimib flavonoidide sünteesi ühele varasemale astmele, mis on ühine nii antotsüaanidele kui ka rutiinile, kusjuures valguse mõju realiseerub mõlemal juhul samade fotoretseptorite kaudu.

Viimasel ajal on valguse toimemehhanisme otsides üha suuremat tähelepanu pööratud fenoolide ainevahetuse ühele võtmeensüümile, nimelt fenüülalaniini ammooniumlüaasile, mis reguleerib aromaatsete aminohapete kasutamist valgu ainevahetuse ja sekundaarsete sünteeside ristumiskohal, katalüüsides L-fenüülalaniini desamineerimist *trans*-kaneelhappeks (Durst, Mohr, 1966a; Engelsma, 1967a; Scherf, Zenk, 1967a, b jt.). H. Scherf ja M. H. Zenk (1967b) leidsid, et etioleerunud tatraidandite hüpokotüülides tõusis valguse toimel pärast 3-tunnist valgustamist selle ensüümi aktiivsus *de novo* sünteesi tagajärjel, saavutades maksimumi 10 tundi pärast valgustamise algust. Pidevas valguses ei jäänud ensüümi aktiivsus konstantseks, vaid langes 12. tunnist alates pidevalt, kuigi palju aeglasemalt kui uuesti pimedusse asetatud idandites. Ka hernes (Attridge, Smith, 1967) ja sinepis (Durst, Mohr, 1966b) vähenes või koguni kadus ensüümi aktiivsus pärast valgustamise lõppu kiiresti. Uuritud objektides korreleerub fenüülalaniini ammooniumlüaasi aktiivsus flavonoidide sünteesiga (Creasy, 1968). Lisaks leiti, et antotsüaanide sünteesi ja käsitletava ensüümi aktiivsuse sõltuvus valguse intensiivsusest on paralleelne (Scherf, Zenk, 1967b).

Meie poolt saadud kineetilised kõverad antotsüaanide ja rutiini sünteesi kohta on kooskõlas fenüülalaniini ammooniumlüaasi aktiivsuse muutustega tatraidandis (Scherf, Zenk, 1967b): uuritud ühendite sünteesi närgatav kiirenemine algab umbes 3 tunni möödudes valgustamise algusest, sünteesi aeglustumise tendents ilmneb mitte varem kui 10–12 tundi pärast valgustamise algust. Kahjuks pole ensüümi aktiivsuse muutusi jälgitud eri pikkusega valgustusaegade korral ning pikema aja kui 24 tunni jooksul, mistõttu ei saa öelda, kas see kokkulangevus on juhuslik või seaduspärane ja kas rutiini hulga suurenemise lõpp langeb ajaliselt kokku nimetatud ensüümi aktiivsuse langemisega algnivoole.

On uuritud ka kaneelhappe hüdroksülaasi kui polüfenoolide sünteesi-ahela järgmist lüli vahendava ensüümi aktiivsuse muutusi valguse toimel (Engelsma, 1966) ja leitud need olevat analoogilised eelmise omadega, kusjuures limiteerivaks astmeks osutus siiski fenüülalaniini ammooniumlüaas. G. Engelsma (1967a) leidis sealjuures, et regulatsioonimehhanism, mis kontrollib viimase aktiivsust, funktsioneerib nii, et valguse intensiivsusest ja valgustamisajast hoolimata jõuab ensüümi hulk maksimumi hüpokotüüli vastavas piirkonnas alati ühel ja samal ajal valgustamise algusest arvates. See asjaolu võiks seletada, miks meie katsete kõikides variantides saabub pöördepunkt sünteesi kiiruses samaaegselt.

Raske on otsustada, millest on tingitud erinevused rutiini ja antotsüaanide lõpphulga sõltuvuses valgustamise kestusest, s. t. miks väheneb valgusperioodi pikenedes valguse suhteline efektiivsus rutiini sünteesil. Seda ei tohiks põhjustada substraatide puudus, sest samades tingimustes, kus valgushulga suurenemine rutiini sünteesi enam ei mõjuta, kasvab antotsüaanide sisaldus tunduvalt. Kuna kineetiliste kõverate platoo piirkonnas ei ole tegemist mitte sünteesi täieliku lakkamise, vaid dünaamilise tasakaaluga, siis on tõenäoline, et rutiini sünteesi üksikute reaktsioonide pöörduvuse tõttu esineb pikaajaliste valgusperioodide lõpul kudedes hulk sünteesi vaheprodukte. Kui rutiini ja antotsüaanide sünteesist osavõtvaid ensüümsüsteeme iseloomustab erinev «mahtvus», saavutab rutiini süntees teatud tingimustes küllastatuse ning olemasolevad vaheproduktid ja energiavarud kasutatakse antotsüaanide sünteesiks. Seda võimalust võiks võrrelda W. Wille (1967) poolt kirjeldatud olukorraga, kus leukoantotsüaan ei ole küll antotsüaani otseseks eellaseks, kuid selle degradatsiooniprotsessid varustavad antotsüaanide sünteesi materjaliga. H. A. Stafford (1965, 1966) leidis, et sorgoidandeis, kus esineb kolm erinevat antotsüaniini, näivad nende sünteesi teed sageli konkureerivat üksteisega või teiste biosünteesi teedega kas substraatide või sünteesikohtade pärast. Küllaldase intensiivsusega valguse ja piisava hulga eellaste esinemisel on selles objektis eelistatud biosünteesi tee, mis viib tsüanidiini moodustumisele.

H. Scherf ja M. H. Zenk (1967b) näitavad, et antotsüaanide sünteesi indutseerimiseks on fenüülalaniini ammooniumlääsi aktiivsuse tõus (seega lanelhapete hulga suurenemine) küll vajalik, mitte aga ainulimiteeriv, ja oletavad, et antotsüaanide sünteesiahelasse kuulub vähemalt üks ensüüm, mida sünteesitakse ainult valguse otsesel toimel.

Reas töödes on püütud leida üksikute flavonoidide sünteesi konkreetset valgustundlikku lüli. Rutiini aglükooni kvartetsetiini kohta arvatakse, et fütokroomsüsteemi kontrolli all on hüdroksüülrühma lülitumine molekuli B-rõnga 3. süsinikuaatomi külge (Bottomley jt., 1966). Ei ole aga teada, kas see toimub juba kohvihappe tekkel p-kumaarhappesest või hiljem, 4-hüdroksühalkooni muutumisel 3,4-dihüdroksühalkooniks. Ka tsüanidiin, tatraidandi antotsüaanide ühine aglükoon, sisaldab 3'-hüdroksüülrühma. Uurides sorgoidandeis esinevaid antotsüaane, leidis H. A. Stafford (1966), et valgus polnud limiteeriv apigeninidiini sünteesil, kuid kiirendas luteolinidiini moodustumist, mis erineb eelmisest hüdroksüülrühma esinemise poolest B-rõnga 3'-asendis, ja oli obligatoorne tsüanidiini tekkeks, millel on B-rõngas kaks hüdroksüülrühma.

Tatraidandites ootab lähemat käsitlemist idulehtedes esinev flavonoidide kompleks, mille uurimise tulemused peaksid aitama heita täiendavat valgust flavonoidide sünteesi seaduspärasustele.

Järeldused

1. Rutiini pimedusliku sünteesi kineetiliste kõverate üldkuju on kõikidel uuritud juhtudel ühesugune, sõltumata induktiivse valgustuse kestusest ja intensiivsusest: paaritunnisele lag-faasile järgneb rutiinisalduse praktiliselt lineaarne tõus, mis kestab ligikaudu 18. tunnini valgustamise aigusest arvates; edasi sünteesi kiirus aeglustub ja saavutab püsiva lõppväärtuse umbes 26. tunnil.

2. Moodustunud rutiini hulk on kasutatud intensiivsuste vahemikus lineaarses sõltuvuses valguse intensiivsusest ja 1–6-tunniste ekspositsioonigaegade puhul ka valgustuse kestusest.

3. Pikemate kui 6—8-tunniste valgustuste kasutamisel ei suurene sünteesitud rutiini lõpphulk enam lineaarselt valgustamisajaga. 24-tunniste ja pikemate ekspositsiooniaegade korral on rutiini süntees valgushulga suhtes praktiliselt küllastunud.

4. Töö tulemused näitavad, et rutiini sünteesi kineetika on analoogiline antotsüaanide sünteesi omaga, ja lubavad järeldada, et meie katsetes ei ilmnenud põhimõttelist erinevust antotsüaanide ja rutiini biosünteesi valgustundlikkuse vahel.

KIRJANDUS

- Attridge T. H., Smith H., 1967. A phytochrome-mediated increase in the level of phenylalanine ammonia-lyase activity in the terminal buds of *Pisum sativum*. Biochem. Biophys. Acta 148 (3) : 805—807.
- Bassler R., 1957. Der Einfluß ökologischer und ontogenetischer Faktoren auf die Flavone von *Fagopyrum sagittatum* Gilib. Pharmazie 12 (11) : 758—772; 12 (12) : 834—841.
- Bottomley W., Smith H., Galston A. W., 1966. Flavonoid complexes in *Pisum sativum* — III. The effect of light on the synthesis of kaempferol and quercetin complexes. Phytochemistry 5 : 117—123.
- Creasy L. L., 1968. The increase in phenylalanine ammonia-lyase activity in strawberry leaf disks and its correlation with flavonoid synthesis. Phytochemistry 7 : 441—446.
- Durst F., Mohr H., 1966a. Phytochrome-mediated induction of enzyme synthesis in mustard seedlings (*Sinapis alba* L.). Naturwissenschaften 53 (20) : 531—532.
- Durst F., Mohr H., 1966b. Half-life of phytochrome-induced phenylalanine deaminase in mustard seedlings (*Sinapis alba* L.). Naturwissenschaften 53 (24) : 707.
- Engelsma G., 1966. The influence of light of different spectral regions on the synthesis of phenolic compounds in gherkin seedlings in relation to photomorphogenesis. III. Hydroxylation of cinnamic acids. Acta Bot. Neerl. 15 : 394—405.
- Engelsma G., 1967a. Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings. I. Effect of blue light. Planta 75 (3) : 207—219.
- Engelsma G., 1967b. Photoinduction of phenylalanine deaminase in gherkin seedlings. II. Effect of red and far-red light. Planta 77 (1) : 49—57.
- 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 hüpokotülides, olenevalt indutseeriva valgusperioodi kestusest ja valguse intensiivsusest. ENSV TA Toimetised, Biologia 17 (2) : 154—163.
- 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 51 (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, Biologia 18 (1) : 40—50.
- Scherf H., Zenk M. H., 1967a. Induction of anthocyanin and phenylalanine ammonia-lyase formation by a high energy light reaction and its control through the phytochrome system. Z. Pflanzenphysiol. 56 (2) : 203—206.
- Scherf H., Zenk M. H., 1967b. Der Einfluß des Lichtes auf die Flavonoidsynthese und die Enzyminduktion bei *Fagopyrum esculentum* Moench. Z. Pflanzenphysiol. 57 (5) : 401—418.

- Stafford H. A., 1965. Flavonoids and related phenolic compounds produced in the first internode of *Sorghum vulgare* Pers. in darkness and in light. *Plant Physiol.* **40** (1) : 130—138.
- Stafford H. A., 1966. Regulatory mechanisms in anthocyanin biosynthesis in first internodes of *Sorghum vulgare*: effect of presumed inhibitors of protein synthesis. *Plant Physiol.* **41** (6) : 953—961.
- Weber E., 1961. Grundriß der biologischen Statistik. Jena, VEB Gustav Fischer Verlag.
- Wille W., 1967. Markierungsversuche zur Kinetik der Leukoanthocyan- und Anthocyan-synthese im Hypokotyl von *Impatiens balsamina* L. *Z. Pflanzenphysiol.* **57** (2) : 134—150.
- Тохвер М., Халлоп Л., Маргна Э., Маргна У., 1967. Хроматографическая и спектрофотометрическая характеристика флавоноидов проростков гречихи. *Изв. АН ЭССР, Биол.* **16** (2) : 136—148.
- Снедекор Дж. У., 1961. Статистические методы в применении к исследованиям в сельском хозяйстве и биологии. М.

*Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalsooia Instituut*

Saabus toimetusse
1. VII 1968

Л. ХАЛЛОП, У. МАРГНА

КИНЕТИКА ОБРАЗОВАНИЯ РУТИНА В ГИПОКОТИЛЯХ ПРОРОСТКОВ ГРЕЧИХИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УСЛОВИЙ ОСВЕЩЕНИЯ

Резюме

Изучалась кинетика образования рутина в гипокотылях гречихи при воздействии на этиолированные проростки светом разной продолжительности (1—48 ч) и интенсивности (13 300, 27 300 и 59 000 эрг · см⁻² · сек⁻¹).

Установлено, что общая форма полученных кинетических кривых темнового биосинтеза рутина при всех изученных условиях одинакова. Во всех случаях за короткой лаг-фазой следует период линейного возрастания количества рутина в гипокотылях, однако примерно через 18 ч после начала экспозиции скорость синтеза рутина начинает постепенно уменьшаться, и кривые переходят на плато. Динамическое равновесие в темновом биосинтезе рутина достигается в среднем через 26 ч после начала освещения.

Скорость синтеза в линейной фазе накопления рутина и, следовательно, конечное количество его зависят от продолжительности освещения и интенсивности света, причем в пределах использованных в работе интенсивностей и при более коротких экспозициях (1—6 ч) эта взаимосвязь выражается в виде прямолинейной зависимости между количеством света и количеством синтезированного рутина. При более длительных экспозициях относительная эффективность стимулирующего влияния света снижается, при экспозициях продолжительностью 24 ч и больше практически наблюдается уже полное насыщение процесса.

Полученные результаты показывают, что кинетика образования рутина в гипокотылях гречихи в принципе аналогична кинетике накопления антоциана в том же объекте при соблюдении тех же условий освещения (Hallop, Margna, 1968), свидетельствуя о том, что по световой зависимости биосинтеза между антоцианами и рутином существенных качественных различий нет.

*Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
1/VII 1968

L. HALLOP, U. MARGNA

**A CONTRIBUTION TO THE KINETICS OF RUTIN BIOSYNTHESIS
IN HYPOCOTYLS OF BUCKWHEAT SEEDLINGS IN DEPENDENCE
ON THE CONDITIONS OF LIGHT TREATMENT**

Summary

The authors determined the kinetics of the light-induced formation of rutin in etiolated buckwheat hypocotyls depending on the duration of the inductive illumination period and on the light intensity. During the first 68 hours the seedlings under examination were grown in complete darkness; after that they were exposed to light of different durations (up to 48 h) or of various intensities (13,300; 27,300; 59,000 ergs · cm⁻² · sec⁻¹, light from white fluorescent tubes) and subsequently returned to darkness. The amount of rutin formed in the hypocotyls during the light period and during the subsequent development of seedlings in darkness was determined by means of repeated one-dimensional paper chromatography followed by spectrophotometrical measurement of the absorbance of the ethanol eluate of the rutin spot at 360 nm, taking samples for rutin assay periodically at certain time intervals during a period of up to 48 hours from the beginning of the light treatment.

The experimental data obtained show that the shape of the kinetic curves was similar in all the cases investigated. After a short lag-phase, the amount of rutin increased linearly during a period of up to 18 hours from the beginning of irradiation; after that the rate of synthesis decreased gradually, the amount of rutin reaching its maximum in about 26 hours.

Within the range of the light intensities used and of the durations of irradiation from 1 to 6 hours, the rate of synthesis in the course of the linear period of rutin accumulation and, consequently, the final amount of rutin formed in hypocotyls were linearly dependent upon the amount of the light energy absorbed. More prolonged irradiations resulted in a gradual saturation of the rutin synthesis, the lengthening of the inductive light period above 24 hours causing no additional increase in the final amount of rutin.

Comparing the time course of the rutin formation with the kinetics of the anthocyanin biosynthesis in buckwheat seedling hypocotyls investigated in our previous work (Hallop, Margna, 1968), it seems to be reasonable to suggest that there are no essential qualitative differences between the light requirements of the two biosynthetic pathways and that they can equally be regarded to be light-dependent processes.

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

Received
July 1, 1968