

<https://doi.org/10.3176/biol.1974.3.03>

УДК 582. 657.2:581.19

Удо МАРГНА, Лембе ЛААНЕСТ, Эви МАРГНА, Тийу ВАЙНЪЯРВ

АКТИВНОСТЬ ФЕНИЛАЛАНИН-АММОНИЙ-ЛИАЗЫ И НАКОПЛЕНИЕ АНТОЦИАНОВ В ПРОРОСТКАХ РЖИ И РЕДИСА

Дезаминирование фенилаланина в *транс*-коричную кислоту, катализируемое фенилаланин-аммоний-лиазой (ФАЛ, КФ 4.3.1.5), является первым звеном в цепи специфических обменных реакций, в результате которых в растительных клетках образуются различные фенольные соединения — как сравнительно простые формы типа фенилпропанондов, так и многочисленные производные более сложной структуры типа флавоноидов. В последние годы накоплено довольно много фактического материала об особенностях указанной реакции дезаминирования и установлено, что изменения активности ФАЛ часто весьма хорошо коррелируют с количественными изменениями в содержании флавоноидов (см. сводки Zucker, 1972; Samt, Towers, 1973). Это привело к распространению убеждения о том, что ФАЛ играет первичную роль в регуляции формирования флавоноидных соединений в растительных организмах.

Учитывая ключевую позицию ФАЛ на общем пути биосинтеза фенольных соединений, она такую функцию в принципе вполне могла бы выполнять. Следует, однако, отметить, что четкий параллелизм в накоплении флавоноидов и активности ФАЛ обнаруживается не во всех случаях (Rissland, Mohr, 1967; Bellini, van Poucke, 1970; Amrhein, Zenk, 1971), в определенных условиях соответствующие изменения могут иметь даже противоположный характер (Лаанест, Маргна, 1972, 1974). Еще более настораживает явное отсутствие эквивалентности как между общим уровнем каталитического потенциала ФАЛ и интенсивностью формирования флавоноидов, так и между размерами сдвигов в обоих параметрах при изменении условий внешней среды. Так, расчеты с проростками гречихи показали, что система ФАЛ этого объекта была бы способна пропустить в 6—10 раз больше эквивалентов фенилаланина, чем фактически понадобилось бы для обеспечения формирования флавоноидных соединений (Лаанест, Маргна, 1972). В проростках ржи, по ориентировочным расчетам, указанное количественное соотношение еще больше сдвинуто в сторону преобладания суммарной каталитической мощности ФАЛ над размерами фактического синтеза флавоноидов (Лаанест, Маргна, 1974). Т. Суэйн и Ч. Уиллиамс проанализировали с этой точки зрения данные многих авторов и пришли к выводу, что в ряде объектов активность ФАЛ уже в темноте (при самом низком уровне) вполне достаточна для того, чтобы обеспечить максимальную скорость образования фенольных соединений на свету (Swain, Williams, 1970). Это указывает на то, что ФАЛ может быть одним из так называемых

конститутивных энзимов, уровень активности которых, как известно, не имеет лимитирующего значения для протекания зависящих от них реакций. Если это справедливо, то непосредственной количественной зависимости накопления флавоноидов от активности ФАЛ и не должно быть, и весь процесс, очевидно, контролируется другими механизмами.

В настоящей работе изложены результаты ряда сравнительных экспериментов с проростками ржи (*Secale cereale* L. var. *cereale*) и редиса (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*), поставленных нами с целью несколько расширить общее представление о возможных количественных связях между ФАЛ и накоплением флавоноидов. В обоих объектах флавоноидный комплекс сравнительно прост и представлен в основном антоцианами при сопутствии только следовых количеств отдельных неидентифицированных флавоноидов, которые в работе не изучались. В качестве фактора воздействия использовалась обработка проростков растворами азотнокислого аммония, глюкозы и фенилаланина, при введении которых в растительные клетки обычно наблюдаются характерные сдвиги в накоплении флавоноидных соединений (Маргна, 1970, 1971; Маргна и др., 1972).

Материал и методика

Использованные в работе молодые проростки выращивали на дистиллированной воде по стандартной методике нашей лаборатории (Hallor, Margna, 1968) с некоторым варьированием общего режима в зависимости от целей и характера отдельных экспериментов.

При изучении активности ФАЛ проростки, как правило, в течение первых 72 ч инкубировали в темноте, затем материал перемещали в световую камеру, где в течение 18 ч экспонировали на свету (люминесцентные лампы ЛДС-30, интенсивность света $29\,000 \text{ эрг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$). В одной серии экспериментов экспозиции подвергали интактные проростки, в другой — их изолированные органы, отделенные с этиолированных проростков непосредственно перед освещением. Анализ материала проводили сразу после окончания светового периода (т. е. в возрасте материала 90 ч), что, согласно кинетическим данным (см. ниже), обеспечивало сравнение эффектов при достаточно высоком и стабильном уровне активности энзима. В кинетических экспериментах использовали иные схемы опытов, подробности которых указаны при изложении соответствующих результатов.

Активность ФАЛ определяли по методическим принципам, разработанным М. Цукером (Zucker, 1965) и подробно описанным нами ранее (Лаанест, Маргна, 1972). Об активности энзима судили по скорости образования коричной кислоты в реакционной смеси в течение трехчасового периода инкубации при 35°C. Результаты выражали в микрограммах коричной кислоты на 1 проросток в час, применяя для перечислений коэффициент экстинкции $0,88 \cdot 10^7$ (Лаанест, Маргна, 1972). Так как у проростков ржи уровень ФАЛ в колеоптилях оказался слишком низким для достоверных измерений, а у проростков редиса не удалось получить прозрачных вытяжек из семядолей, то в первом объекте изменения активности энзима изучали только в первичном листе, в другом — только в гипокотылях.

При изучении содержания антоцианов начальный темновой период выращивания проростков был подобран несколько короче и продолжался 56 ч. Затем проростки подвергали 16-часовой световой экспозиции, чему следовала (для завершения в материале процесса формирования пигментов) 24-часовая дополнительная инкубация в темноте. Материал для экспериментов с изолированными органами брали с 80-часовых этиолированных проростков. Анализ материала проводили после окончания заключительного темнового периода, т. е. в возрасте 96 ч при работе с интактными проростками и 120 ч при работе с изолированными органами. Содержание антоцианов определяли фотоколориметрически путем измерения оптической плотности подкисленных водно-этанольных экстрактов из свежего материала с помощью фотоэлектрического колориметра

ФЭК-56М (10-миллиметровые кюветы, зеленый светофильтр с максимумом пропускания при 540 нм). Количество пигментов в материале выражали в микрограммах на 1 проросток, применяя для перечисленных коэффициентов экстинкции для цианидин-3-глюкозида $2,7 \cdot 10^7$ (Scherf, Zenk, 1967).

Действующие вещества в виде водных растворов вводили в среду выращивания проростков перед освещением; в отдельных экспериментах семена непосредственно высевали на соответствующие растворы. В обоих случаях концентрация веществ в среде равнялась: NH_4NO_3 — 0,1%, глюкоза — 1%, *L*-фенилаланин — 10^{-2} М. При работе с изолированными органами отделенный от этиолированных проростков материал сперва в течение 3—5 мин намачивали действующими растворами указанной концентрации (в контроле — водой), а после этого для прохождения световой и заключительной темновой (при изучении антоцианов) фаз инкубации раскладывали на фильтровальную бумагу, намоченную теми же растворами.

Все эксперименты проводили в 3—5 повторностях; температура опытов 25°. Результаты обрабатывали вариационно-статистически с использованием *t*-критерия.

Результаты

Кинетика активности ФАЛ. При изучении ФАЛ в *in vivo* ситуации всегда необходимо иметь в виду, что активность этого энзима подвергается заметным колебаниям как в зависимости от возраста и стадии развития материала, так и от ряда основных факторов среды (свет, температура), являющихся неотъемлемыми атрибутами любого эксперимента. Особенно сложный характер имеет зависимость от условий светового режима.

Результаты многочисленных исследований (Zucker, 1972; Samt, Towers, 1973) свидетельствуют о том, что активность ФАЛ под влиянием света в общем значительно возрастает, достигая иногда уровня в 5—6 раз выше, чем в неосвещенном материале (Amrhein, Zenk, 1971). В типичных случаях индуцированный высокий уровень ФАЛ долго не сохраняется, а вскоре вслед за достижением максимума следует более или менее резкий спад активности. Диапазон, продолжительность и прочие особенности световой индукции ФАЛ, также как и характер последующего уменьшения ее активности определяются свойствами объекта и могут сильно варьироваться. Из этого следует, что в экспериментах с освещенными растениями всегда могут иметь место определенные светобусловленные изменения энзиматической активности, которые перед изучением действия других факторов должны быть хотя бы ориентировочно охарактеризованы.

В проростках гречихи, подробнее изученных нами в этом отношении ранее, период светоиндуцированного повышения активности ФАЛ был сравнительно коротким и продолжался всего лишь 6—12 ч, после чего сразу начинался обратный процесс без сколько-нибудь заметного поддержания активности энзима на достигнутом уровне. Уже примерно к 20—24-му часу с начала освещения активность ФАЛ как в семядолях, так и в гипокотылях понижалась почти до такого же уровня, как до световой экспозиции, продолжая понижаться и в дальнейшем (Лаанест, Маргна, 1972).

В первичном листе ржи (рис. 1) характер соответствующих изменений оказался иным. Освещение приводило здесь к не особенно резкому, но довольно устойчивому увеличению активности энзима, которое с почти неизменной скоростью продолжалось в течение всего 24-часового периода освещения лишь с некоторой тенденцией к более раннему прекращению процесса стимуляции у проростков, подвергнутых световой экспозиции в несколько более старом возрасте.

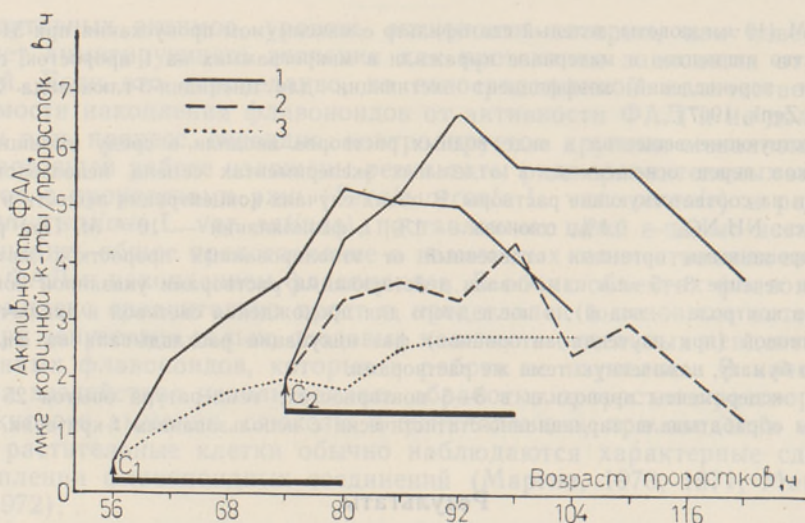


Рис. 1. Кинетика изменения активности ФАЛ в первичном листе проростков ржи. 1 — интактные проростки (освещенные); 2 — изолированный первичный лист (освещенный); 3 — неосвещенные интактные проростки. Начало освещения указано стрелочкой, продолжительность освещения — жирными горизонтальными линиями под кривыми.

Достигнутый высокий уровень ФАЛ поддерживался почти без изменений еще в течение 12 ч и в темноте. Примерно таким же был характер изменений в активности ФАЛ и в изолированном материале, но общий диапазон стимуляции был значительно меньше эффекта света в интактных проростках и обнаруживалась тенденция к несколько более быстрому снижению уровня энзима сразу после окончания световой экспозиции. Следует, однако, отметить, что в проростках ржи постепенное и довольно заметное увеличение активности ФАЛ имело место даже в отсутствие света, вследствие чего темновой фон энзима у 104-часовых этилированных проростков оказался в 4 раза выше, чем, например, у 56-часовых растений. В проростках гречихи того же возраста наблюдалась обратная картина с уменьшением активности ФАЛ в течение 48-часового периода до 5—5,5 раз в семядольных листочках и примерно в 1,8 раза в гипокотылях (Лаанест, Маргна, 1972).

В гипокотылях проростков редиса (рис. 2) общая активность ФАЛ была заметно меньше, чем в первичном листе ржи, оставаясь на сравнительно низком уровне, по абсолютному значению, также после световой экспозиции. Относительное увеличение активности было, однако, довольно значительным, причем, в отличие от проростков ржи (и также гречихи; см. Лаанест, Маргна, 1972), особенно ярко это выражено в изолированном материале. Как видно из рис. 2, к концу 24-часового светового периода, когда активность энзима приближалась к максимуму, уровень ФАЛ в изолированных гипокотылях примерно в 5 раз превышал уровень, до которого в течение этого же промежутка времени возрастала активность ФАЛ в гипокотылях интактных проростков. Остальные параметры светиндуцированных изменений в активности ФАЛ в гипокотылях редиса оказались весьма сходными с таковыми у проростков ржи, т. е. повышение активности энзима продолжалось и здесь с неизменной скоростью в течение всего периода световой экспозиции, а достиг-

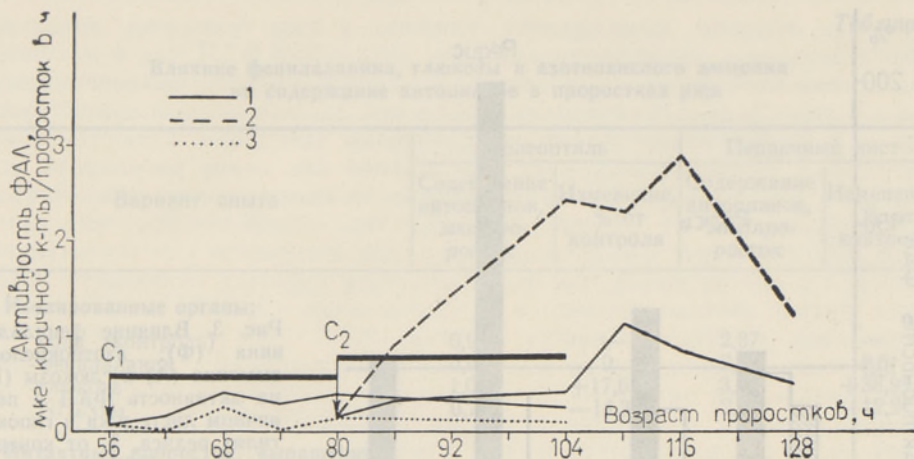


Рис. 2. Кинетика изменения активности ФАЛ в гипокотылях проростков редиса. 1 — интактные проростки (освещенные); 2 — изолированные гипокотыли (освещенные); 3 — неосвещенные интактные проростки. Начало освещения указано стрелочкой, продолжительность освещения — жирными горизонтальными линиями над кривыми.

нутый высокий уровень активности также сохранялся довольно продолжительное время после прекращения освещения.

Большое сходство общей кинетической картины изменений в активности ФАЛ у обоих объектов позволило применить для постановки последующих серийных экспериментов единую методическую схему со сравнением активности энзима в материале в один и тот же срок как с момента посева семян, так и с момента начала световой экспозиции. Исходя из установленных кинетических особенностей, этим сроком был определен 18-й ч после начала освещения 72-часового этиолированного материала. Приурочение анализа к указанному временному моменту обеспечивало измерение активности ФАЛ на максимальном или почти на максимальном ее уровне. Одновременно это соответствовало такому периоду в развитии проростков, когда активность ФАЛ уже более или менее стабилизировалась и, следовательно, возможные вторичные сдвиги (по отношению действия основных факторов) были сведены до минимума.

Эффект глюкозы, фенилаланина и азотнокислого аммония. Введение в проростки указанных метаболически активных веществ приводило во всех случаях к довольно заметным изменениям в активности ФАЛ, направление которых определялось главным образом свойствами введенных веществ и оставалось одинаковым как у того, так и другого объекта вне зависимости от степени интактности материала (рис. 3). Несколько отличались в этом отношении только интактные проростки ржи, которые сравнительно слабо реагировали на обработку.

Наиболее ярким оказался эффект фенилаланина. Введение его вызывало значительное снижение активности ФАЛ, в результате чего уровень ее, например, в гипокотылях редиса понижался до значения, равного только 15—30% от уровня контроля. В первичном листе ржи уменьшение активности было несколько меньше, но также весьма существенно, достигая в изолированном материале 40% от активности энзима у контрольной партии материала. К снижению активности ФАЛ приводила также обработка материала раствором азотнокислого аммония, но об-

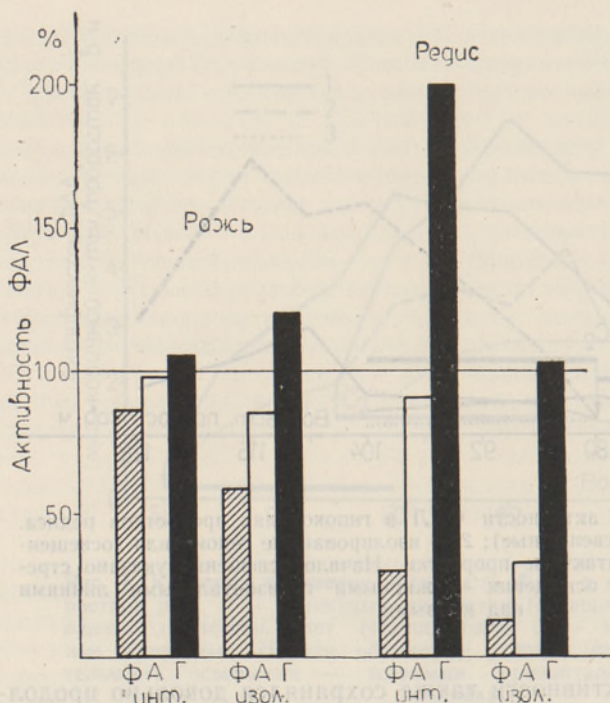


Рис. 3. Влияние фенилаланина (Ф), азотнокислого аммония (А) и глюкозы (Г) на активность ФАЛ в первичном листе ржи и гипокотылях редиса, % от контроля. Линия 100% (контроль) соответствует следующим уровням активности ФАЛ (мкг коричной к-ты/проросток в ч): интактные проростки ржи — 7,5; изолированный первичный лист ржи — 3,3; интактные проростки редиса — 0,9; изолированные гипокотили редиса — 2,6.

щий подавляющий эффект был меньшим по размерам и в интактных проростках ржи вообще не достигал значимого уровня. Под влиянием глюкозы активность ФАЛ в материале, наоборот, возрастала. Особенно значительным это было в гипокотылях интактных проростков редиса, где в результате обработки наблюдалось примерно двукратное повышение уровня энзима над контрольным фоном.

При сравнении этих результатов с данными, которые были нами получены в аналогичных экспериментах с проростками гречихи (Лаанест, Маргна, 1972), легко можно заметить полное сходство действия фенилаланина, глюкозы и азотнокислого аммония во всех трех объектах, что указывает на весьма закономерный характер обусловленных этими веществами изменений.

Не пытаясь осмыслить возможные причины уменьшения или увеличения активности ФАЛ в рассмотренных условиях, приступим к анализу влияния тех же веществ на содержание антоцианов. Соответствующие данные представлены в табл. 1 и 2.

Все три вещества вызывали заметные количественные изменения и в данном показателе, причем эти изменения по своему общему направлению также имели достаточно регулярный характер, проявляя при этом те же типичные особенности, которые обычно наблюдаются у большинства других объектов: фенилаланин и глюкоза, как правило, стимулировали накопление антоцианов, а азотнокислый аммоний, наоборот, подавлял этот процесс (Маргна, 1970, 1971; Marгна и др., 1972). На этом общем фоне обнаруживались лишь отдельные отклонения, которые, очевидно, обусловлены некоторыми специфическими свойствами изученного материала. В частности, фенилаланин оказался неэффективным при введении его в изолированные колеоптили и первичный лист проростков ржи, а экзогенный азот в двух случаях вместо обычного подавления способствовал накоплению пигментов.

Таблица 1

Влияние фенилаланина, глюкозы и азотнокислого аммония на содержание антоцианов в проростках ржи

| Вариант опыта | Колеоптиль | | Первичный лист | |
|--|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| | Содержание антоцианов, мкг/проросток | Изменение, % от контроля | Содержание антоцианов, мкг/проросток | Изменение, % от контроля |
| Изолированные органы: | | | | |
| вода (контроль) | 0,91 | — | 2,37 | — |
| фенилаланин | 0,91 | 0 | 2,24 | —5,5 |
| глюкоза | 1,07 | +17,6* | 3,29 | +38,9* |
| NH ₄ NO ₃ | 0,78 | —14,3* | 2,08 | —12,2* |
| Интактные проростки, выращенные на растворах действующих веществ | | | | |
| вода (контроль) | 2,62 | — | 3,78 | — |
| фенилаланин | 2,82 | + 7,6 | 4,50 | +19,1* |
| глюкоза | 2,92 | +11,4* | 3,75 | — 0,8 |
| NH ₄ NO ₃ | 2,42 | — 7,6 | 4,52 | +19,6* |
| Интактные проростки, действующие вещества введены в среду перед освещением: | | | | |
| вода (контроль) | 2,62 | — | 3,78 | — |
| фенилаланин | 2,87 | + 9,5* | 4,22 | +11,6* |

* Статистически значимый эффект, $P \leq 0,05$.

Таблица 2

Влияние фенилаланина, глюкозы и азотнокислого аммония на содержание антоцианов в интактных проростках редиса

| Вариант опыта | Гипокотили | | Семядольные листочки | |
|---|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|
| | Содержание антоцианов, мкг/проросток | Изменение, % от контроля | Содержание антоцианов, мкг/проросток | Изменение, % от контроля |
| Проростки выращены на растворах действующих веществ: | | | | |
| вода (контроль) | 2,75 | — | 3,27 | — |
| фенилаланин | 4,73 | +72,0* | 4,67 | +42,8* |
| глюкоза | 3,43 | +24,7* | 4,48 | +37,0* |
| NH ₄ NO ₃ | 3,35 | +21,8* | 2,53 | —22,6* |
| Действующие вещества введены в среду перед освещением: | | | | |
| вода (контроль) | 2,75 | — | 3,27 | — |
| фенилаланин | 4,65 | +69,1* | 3,87 | +18,3* |
| глюкоза | 2,77 | + 0,7 | 3,47 | + 6,1 |
| NH ₄ NO ₃ | 2,90 | + 5,5 | 2,30 | —29,7* |

* Статистически значимый эффект, $P \leq 0,05$.

Таким образом, фенилаланин, глюкоза и азот оказались довольно эффективными в модифицировании как активности ФАЛ, так и накопления антоцианов в обоих объектах и, следовательно, количественная связь между этими показателями, если она на самом деле существует, могла бы быть обнаруживаться достаточно отчетливо. Сопоставление же данных, однако, показывает, что о более или менее регулярном совпадении соответствующих изменений по их направлению можно говорить только в случае введения глюкозы. При обработке растений азотнокислым аммонием ожидаемый параллелизм выражен уже значительно слабее, а в случае подкормки фенилаланином сдвиги в активности ФАЛ даже прямо противоположны к одновременным сдвигам в накоплении антоцианов (см. также Лаанест, Маргна, 1972).

Из этого следует, что во многих из рассматриваемых здесь случаев непосредственная зависимость изменений в накоплении антоцианов от предшествующих изменений в уровне активности ФАЛ полностью исключена. В условиях, когда между изменениями наблюдалась положительная корреляция, наличие такой зависимости более реально, однако вполне возможно, что установленная корреляция и в этих случаях не отражает истинной причинной связи, а является результатом случайного совпадения событий.

Обсуждение

Полученные результаты в очередной раз свидетельствуют о том, что ФАЛ, несмотря на ее ключевую позицию в цепи биосинтеза фенольных соединений, либо вообще не может играть лимитирующую роль в регуляции накопления флавоноидов, либо выполняет такую функцию только в ограниченных случаях.

Одним объяснением такой ситуации может быть наличие в растительных клетках альтернативного пути биосинтеза флавоноидных соединений, который не связан со стадией L-фенилаланин-*транс*-коричная кислота и, таким образом, не зависит от каталитического действия ФАЛ. Хотя трудно себе представить формирование флавоноидного скелета без промежуточной стадии коричных кислот, существование такого альтернативного пути на основании некоторых экспериментальных данных с чайным растением постулируется. При этом высказано предположение, что C₆—C₃-фрагменты для построения молекул флавоноидов могут быть представлены в таком случае не коричными кислотами или их эфирами, а лабильными производными хоризмовой или префеновой кислот (Запрометов, Бухлаева, 1973). Кажется, однако, весьма маловероятным, что любой из возможных путей с минованием стадии дезаминирования фенилаланина мог бы иметь сколько-нибудь существенное или даже доминирующее значение в формировании флавоноидных соединений. Этому противоречит значительный стимулирующий эффект фенилаланина на накопление флавоноидов у большинства изученных до сих пор объектов (табл. 1 и 2, см. также Маргна, 1971; Margna и др., 1972), а также общераспространенные и ярко выраженные сбалансированные взаимоотношения между процессами биосинтеза белков и формирования флавоноидов в растениях, которые в принципе могут развиваться только благодаря контактам между обоими процессами на уровне фенилаланина как общего для них предшественника (Маргна, 1971, 1972а).

Другим и более вероятным, как нам кажется, объяснением малой контролирующей способности ФАЛ в накоплении флавоноидов может быть значительно более высокий уровень суммарной каталитической мощности ФАЛ в материале, чем это фактически понадобилось бы для

Таблица 3

Каталитический потенциал ФАЛ в первичном листе проростков ржи

| Промежуток экспериментального периода | Средняя активность ФАЛ*, мкг коричной к-ты/ч проросток | Кол-во коричной к-ты, которое при данном уровне ФАЛ могло бы образовываться | | Кол-во синтезированных антоцианов, мкмоль/проросток |
|--|--|---|------------------|---|
| | | мкг/проросток | мкмоль/проросток | |
| Интактные проростки, начало освещения в возрасте 56 ч | | | | |
| 16-часовой период освещения | 2,3 | 36,8 | 0,249 | — |
| Первые 12 ч темновой инкубации после освещения | 3,7 | 44,4 | 0,300 | — |
| Заключительные 12 ч темновой инкубации | 2,5 | 30,0 | 0,203 | — |
| Всего за 40 ч | — | 111,2 | 0,752 | 0,0084 |
| Изолированный первичный лист, начало освещения в возрасте материала 80 ч | | | | |
| 16-часовой период освещения | 3,1 | 49,6 | 0,335 | — |
| 24-часовой период темновой инкубации после освещения | 2,4 | 57,6 | 0,389 | — |
| Всего за 40 ч | — | 107,2 | 0,724 | 0,0053 |
| Этилированные проростки, инкубированные в темноте 40 ч (в возрасте 56—96 ч) | | | | |
| | 1,9 | 76,0 | 0,514 | — |

* Вычислена по технике регрессионного анализа на основании кинетических данных рис. 1.

реализации имеющихся возможностей биосинтеза флавоноидов. В начале статьи мы уже упоминали о некоторых данных, подтверждающих существование такой ситуации во многих растениях (Swain, Williams, 1970; Лаанест, Маргна, 1972), причем было указано, по ориентировочным расчетам, что и в проростках ржи каталитический потенциал ФАЛ значительно может превышать фактическую интенсивность формирования флавоноидов (Лаанест, Маргна, 1974). Если соответствующие расчеты сделать более тщательно и, исходя из кинетических данных (рис. 1), фактический потенциал дезаминирования фенилаланина вычислять с учетом изменений активности ФАЛ во времени, получаются цифры, представленные в табл. 3.

Выясняется, что при использованном в работе режиме выращивания и возрасте материала каталитическая система ФАЛ первичного листа проростков ржи была бы способна дезаминировать в 90 раз, а в случае изолированного материала даже примерно в 140 раз больше эквивалентов фенилаланина, чем потребовалось бы для формирования антоцианов. Уже темновой уровень ФАЛ данного объекта настолько высок, что позволял бы продуцировать в 60 раз больше антоцианов, чем было их фактическое количество в освещенных проростках. При такой большой каталитической мощности совершенно очевидно, что любые изменения активности ФАЛ только в редких случаях могут достигать таких критических размеров, чтобы это уже отразилось на накоплении антоцианов. Весьма вероятно, что при умеренных воздействиях, когда жизнедеятельность

тельность проростков еще поддерживается в пределах физиологической нормы, таких изменений в активности ФАЛ вообще никогда не бывает.

В свете этих данных заслуживает некоторого анализа вопрос низкого уровня ФАЛ в колеоптилях ржи, оказавшегося в данной работе недостаточным для проведения корректных измерений. Среднее содержание антоцианов в колеоптилях колеблется в пределах 0,005—0,006 мкмоль на один проросток, что при теоретически минимальном соотношении каталитического потенциала ФАЛ и количества продукта (1:1) может быть обеспечено уже примерно в 130 раз меньшей активностью этого энзима, чем у первичного листа. Исходя из этого можно вычислять, что уровень ФАЛ в колеоптилях должен был бы равняться в таком случае примерно 0,02 мгк коричной кислоты в час на один проросток. При примененной в работе технике это около 5 раз ниже минимального предела измерения. Из этого следует, что хотя активность ФАЛ в колеоптилях и является настолько низкой, что даже не поддается точной количественной оценке, она тем не менее может быть более чем достаточной для эффективного накопления антоцианов в тех масштабах, в которых этот процесс в данном органе на самом деле происходит.

Расчеты каталитического потенциала ФАЛ в гипокотилиях редиса приводят в принципе к аналогичным результатам. В случае интактных проростков этот потенциал примерно в 13 раз больше фактического синтеза антоцианов, в изолированных же гипокотилиях соответствующее соотношение приблизительно равно 50—60 : 1. В этиолированных гипокотилиях фон ФАЛ весьма низок, но и этого было бы вполне достаточно, чтобы обеспечить формирование антоцианов примерно в 5 раз больше, чем у освещенных растений. Общий вывод из этих расчетов таковой же, как и в случае проростков ржи: каталитический потенциал ФАЛ в гипокотилиях редиса настолько много превышает фактическую интенсивность накопления антоцианов, что изменения в ее активности практически не могут иметь значения в их накоплении, вследствие чего и отсутствие параллелизма между этими показателями вполне закономерно.

Кончая этим анализ данных изложенных экспериментов, почти неизбежным кажется заключение, что в проростках ржи и редиса ФАЛ не может играть первичную роль в регуляции накопления флавоноидов. Контроль над этим процессом, очевидно, осуществляется другим механизмом, важнейшим звеном которого может быть субстратная обеспеченность на уровне фенилаланина (Маргна, 1972б).

ЛИТЕРАТУРА

- Запрометов М. Н., Бухлаева В. Я., 1973. О возможности существования альтернативных путей биосинтеза флавоноидов в чайном растении. Биохимия 38 (3) : 520—526.
- Лаанест Л. Э., Маргна У. В., 1972. Роль фенилаланин-аммиак-лиазы (КФ 4.3.1.5) в накоплении флавоноидов в проростках гречихи. Физиол. раст. 19 (6) : 1157—1164.
- Лаанест Л. Э., Маргна У. В., 1974. Влияние температуры на активность фенилаланин-аммоний-лиазы в проростках ржи и гречихи. Физиол. биох. культ. раст. 6 (в печати).
- Маргна У., 1970. О взаимоотношениях образования флавоноидных соединений с углеводным обменом у растений. Изв. АН ЭССР. Биол. 19 (2) : 143—166.
- Маргна У., 1971. О биологическом значении образования флавоноидов в растениях. Изв. АН ЭССР. Биол. 20 (3) : 242—249.
- Маргна У. В., 1972а. Конкурентные отношения между биосинтезом белков и образованием флавоноидных соединений и их биологическое значение. В сб.: Регуляция роста и питание растений. Минск : 64—72.
- Маргна У., 1972б. Субстратная регуляция накопления флавоноидных соединений и ее значение в метаболизме растений. Тезисы докл. семинара по физиол. и биохим. фенольных соед. раст. Тарту : 33—38.

- Amrhein N., Zenk M. H., 1971. Untersuchungen zur Rolle der Phenylalanin-Ammonium-Lyase (PAL) bei der Regulation der Flavonoidsynthese im Buchweizen (*Fagopyrum esculentum* Moench). Z. Pflanzenphysiol. **64** (2) : 145—168.
- Bellini E., van Poucke M., 1970. Distribution of phenylalanine ammonia-lyase in etiolated and far-red irradiated radish seedlings. *Planta* **93** (1) : 60—70.
- Camm E. L., Towers G. N. H., 1973. Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochem.* **12** (5) : 961—973.
- Hallop L., Margna U., 1968. Antotsüaani moodustumise kineetika tatraidandite hüpokotüülides, olenevalt indutseeriva valgusperioodi kestusest ja valguse intensiivsusest. ENSV TA Toimet., Biol. **17** (2) : 154—163.
- Margna U., Vainjärv T., Margna E., 1972. The dependence of leucoanthocyanidin accumulation upon metabolic shifts caused by externally introduced nutritive factors. ENSV TA Toimet., Biol. **21** (3) : 219—222.
- Rissland I., Mohr H., 1967. Phytochrom-induzierte Enzyymbildung (Phenylalanin-desaminase), ein schnell ablaufender Prozess. *Planta* **77** (3) : 239—249.
- 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.
- Swain T., Williams C. A., 1970. The role of phenylalanine in flavonoid biosynthesis. *Phytochem.* **9** (10) : 2115—2122.
- Zucker M., 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* **40** (5) : 779—784.
- Zucker M., 1972. Light and enzymes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **23** : 133—156.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
18/I 1974

Udo MARGNA, Lembe LAANEST, Evi MARGNA, Tiit VAINJÄRV

FENÜÜLALANIINI-AMMOONIUMLÜAASI AKTIIVSUS JA ANTOTSÜAANIDE BIOSÜNTEES RUKKI- NING REDISEIDANDEIS

Resüme

Uuriti eksogeense lämmastiku (NH_4NO_3), glükoosi ja fenüülalaniini mõju fenüülalaniini-ammooniumlúaasi (FAL) aktiivsusele ja antotsüaanide moodustumisele rukki primaarlehes ja redise hüpokotüülis ning võimalikke kvantitatiivseid seoseid nende biokeemiliste tunnuste vahel. Glükoosi sisseviimise korral mõlemad näitajad reeglina tõusid ning vastavad muutused olid omavahel positiivses korrelatsioonis. Ammooniumnitraadiga mõjutamisel langes FAL-i aktiivsus. Paljudel juhtudel vähenes samal ajal ka pigmentide-sisaldus. See paralleelism aga ei olnud üldise iseloomuga. Katsetes fenüülalaniiniga olid muutused vastassuunalised: samal ajal kui FAL-i aktiivsus järsult langes, suurenes antotsüaanidesisaldus oluliselt. Seega ei saanud nihked antotsüaanidesisalduses olla otseselt seotud muutustega FAL-i aktiivsuses. Sama kinnitasid FAL-i summaarse katalüütilise potentsiaali hindamiseks sooritatud arvutused, millest selgus, et rukki primaar-lehes on vastav potentsiaal vajalikust kuni 140 korda kõrgem, ka redise hüpokotüülis on see märksa suurem antotsüaanide sünteesi faktilisest intensiivsusest. Sellest järeldatakse, et uuritud objektides ei limiteeri FAL flavonoidsete ühendite biosünteesi ega etenda olulist osa mehhanismides, mis reguleerivad selle protsessi intensiivsust.

Eesti NSV Teaduste Akadeemia
Eksperimentaalbioloogia Instituut

Toimetusse saabunud
18. I 1974

Udo MARGNA, Lembe LAANEST, Evi MARGNA, Tiit VAINJÄRV

THE ACTIVITY OF PHENYLALANINE AMMONIA-LYASE AND THE ACCUMULATION OF ANTHOCYANINS IN RYE AND RADISH SEEDLINGS

Summary

Using exogenous feeding with glucose, phenylalanine and ammonium nitrate, the possible causal relationship between the changes in the level of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and the content of anthocyanins in radish hypocotyls and in the first primary leaf of rye seedlings has been studied. When the seedlings were fed with glucose, both the activity of PAL and the content of pigments showed an increase, and a close positive correlation was established between the two parameters. Exogenous azote evoked a decrease in the enzymic activity. In a number of occasions the decrease was accompanied by a similar change also in the formation of anthocyanins, but the correlation was not regular in that case. When phenylalanine was fed to the seedlings, parallel changes were not observed at all: the activity of PAL was considerably lowered by this treatment, while in the content of anthocyanins a marked opposite change occurred regularly. The results indicate that the anthocyanin changes cannot be directly related to the shifts in the level of PAL and can hardly be regarded as a consequence of these enzymic changes. This suggestion was further confirmed by a comparison of the total catalytic capacity of PAL in the plants studied with the amount of anthocyanins actually synthesized in this material. The calculations showed that the deaminating potential of PAL in rye primary leaf is up to 140 times higher than necessary for anthocyanin formation, and considerably exceeds the actual range of pigment accumulation also in radish hypocotyls. A conclusion has been drawn that in rye and radish seedlings PAL cannot operate as a primary limiting factor for flavonoid biosynthesis, and, consequently, does not play any important role in the mechanisms which may be involved in the regulation of this process.

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

Received
Jan. 18, 1974