

Маргарете ОТТЕР, Удо МАРГНА

СОДЕРЖАНИЕ ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ГИПОКОТИЛЯХ ПРОРОСТКОВ ГРЕЧИХИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ РЕЖИМАХ ПИТАНИЯ И ТЕМПЕРАТУРНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

В ходе предыдущих исследований нашей лаборатории были получены комплексные данные о влиянии света, температуры, режима выращивания, различных питательных веществ и ряда других факторов на формирование флавоноидов в проростках гречихи (Халлоп, Маргна, 1970а, б; Маргна, 1970; Margna и др., 1972а, б; 1973а, б; 1974а, б и др.). Эти данные показали, что накопление указанных соединений сравнительно легко модифицируется под воздействием любых внешних условий. Изменения обычно охватывают весь флавоноидный комплекс объекта, имея в принципе по отдельным производным одинаковый характер, хотя и могут отличаться по относительным размерам, а иногда и направлению. Есть достаточно оснований предполагать, что все эти изменения обусловлены одним и тем же внутренним механизмом, который, по всей вероятности, связан со сдвигами в обеспеченности аппарата биогенеза флавоноидов фенилаланином — важным для всех флавоноидных производных предшественником (Маргна, 1971, 1972; Лаанест, Маргна, 1972; Margna и др., 1974а, б).

Ключевая позиция фенилаланина на пути биосинтеза не только флавоноидов, но и ряда родственных полифенолов (Neish, 1964; Grisebach, 1965) позволяет, однако, думать, что указанный механизм играет определенную роль и в регуляции накопления некоторых других полифенольных соединений. Это в первую очередь касается хлорогеновой кислоты — сложного эфира кофейной кислоты с хинной, который наряду с флавоноидами повсеместно распространен в высших растениях. Изложенные ниже данные подтверждают это предположение.

Материал и методика

Опыты проводили с молодыми проростками гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench), выращенными на дистиллированной воде по стандартной методике нашей лаборатории (Hallor, Margna, 1968).

В экспериментах с интактными растениями проростки в течение первых 56 ч инкубировали в темноте, затем переносили в световую камеру, где в течение 16 ч экспонировали на свету (люминесцентные лампы ЛДЦ-30, интенсивность света $29\,000 \text{ эрг} \cdot \text{см}^{-2} \cdot \text{сек}^{-1}$), а после этого на 24 ч снова оставляли в темноте; действующие вещества в виде водных растворов вводили в среду выращивания проростков перед освещением в следующей концентрации: NH_4NO_3 — 0,1%, глюкоза — 1%, *L*-фенилаланин — 10^{-2} М. Материал для опытов с изолированными гипокотильями брали с 80-часовых этиолирован-

ных проростков; отделенные гипокотили в течение 3—5 мин намачивали действующими растворами указанной концентрации (в контроле — водой), после чего на протяжении 40 ч (16 ч на свету + 24 ч в темноте) инкубировали на фильтровальной бумаге, намоченной теми же растворами.

Температура опытов во всех фазах выращивания проростков и инкубации материала равнялась 25 °С. Исключение составляли эксперименты по изучению действия температурного режима. В этих сериях материал держали при 25° только до окончания световой экспозиции, затем, разделив на три части, помещали в разные термостаты с температурой соответственно 15, 25 (контроль) и 35° и оставляли до конца темновой инкубации (24 ч).

Для определения содержания хлорогеновой кислоты свежий материал дважды экстрагировали этанолом, объединенный экстракт высушивали при комнатной температуре досуха и сухой остаток растворяли в небольшом объеме смеси этанол—вода (1 : 1); аликвоты полученного раствора наносили на хроматографическую бумагу марки «Filtrak FN-11» и разделяли по восходящей технике в 3%-ной уксусной кислоте. Расположение пятен хлорогеновой кислоты на хроматограммах устанавливали по их характерной голубой флуоресценции в ультрафиолетовом свете, применяя для сравнения контрольные хроматограммы с аутентичной хлорогеновой кислотой (препарат фирмы «Austrowaren», Австрия). Количество хлорогеновой кислоты в пятнах определяли спектрофотометрически путем измерения оптической плотности их водно-этанольных (1 : 1) элюатов при 328 нм. Результаты выражали в микрограммах на один проросток с использованием для пересчетов установленного нами коэффициента экстинкции $1,80 \cdot 10^7$.

Все эксперименты проводили в 3—4 повторностях. Результаты обрабатывали вариационно-статистически с использованием *t*-критерия.

Результаты

Влияние питательной среды. Как видно из табл. 1, содержание хлорогеновой кислоты в гипокотилиях проростков гречихи довольно существенно зависит от состава питательной среды.

Наиболее отчетливыми были изменения при работе с изолированными гипокотилиями: фенилаланин в этом материале во всех случаях значительно стимулировал накопление хлорогеновой кислоты, а экзогенный азот, наоборот, подавал этот процесс. Глюкоза на содержание хлорогеновой кислоты в этих условиях влияния не оказывала.

При сравнении этих данных с результатами, полученными раньше по флавоноидам (Маргна, 1971; Margna и др., 1972б; 1974б), хорошо видна аналогия между ними. Исключение составляет только глюкоза: обработка изолированных гипокотилей раствором этого сахара обычно приводит к увеличению накопления флавоноидных соединений (Маргна, 1970; Margna и др., 1972а, б; см. также Труер, 1964а, б). Отсутствие аналогии в данном случае, однако, вряд ли имеет принципиальное значение. Опыт нашей лаборатории с проростками гречихи показал, что глюкоза и другие сахара в изолированных гипокотилиях оказываются недейственными иногда и в отношении флавоноидов (см. также Amrhein, Zenk, 1971).

В опытах с интактными проростками общая эффективность отдельных факторов была меньшей, чем в случае изолированных гипокотилей; при этом наблюдалось несколько большая разбросанность данных по отдельным сериям (те же особенности обнаруживались и при изучении флавоноидов; см. Margna и др., 1972б, 1974а, б). Вследствие этого влияние фенилаланина — эффективного стимулятора формирования в гипокотилиях антоцианов (Маргна, 1971) — проявилось здесь не совсем определенно. Тем не менее и эти данные показали до-

вольно ясные тенденции, в частности введение в среду азота приводило к уменьшению накопления хлорогеновой кислоты, что полностью совпадает с общим направлением эффекта этого фактора на аккумуляцию флавоноидов (Margna и др., 1974б). Устойчивая тенденция ослабления формирования хлорогеновой кислоты наблюдалась также при внесении в проростки глюкозы. Имея в виду действие сахаров у большинства

Таблица 1

Содержание хлорогеновой кислоты в гипокотылях проростков гречихи на различных питательных средах

Вариант опыта	Хлорогеновая кислота мкг/проросток	Изменение, % от контроля
Изолированный материал		
Вода (контроль)	14,1	—
Фенилаланин	16,7	+18,4*
Глюкоза	14,2	+0,7
NH ₄ NO ₃	12,2	-13,5*
Интактные проростки		
Вода (контроль)	13,8	—
Фенилаланин	13,5	-2,2
Глюкоза	11,8	-14,5**
NH ₄ NO ₃	11,3	-18,1**

* Статистический значимый эффект на уровне $P \leq 0,05$;

** то же на уровне $0,05 < P \leq 0,10$.

Влияние температуры. Следовавшая за периодом освещения инкубация (24 ч) материала при разных температурах приводила во всех сериях к весьма определенным изменениям в накоплении хлорогеновой кислоты (табл. 2): при повышении температуры среды ее содержание в гипокотылях заметно уменьшалось, а при понижении возрастало. Наиболее резко это обнаруживалось в интервале температур от 25 до 35°. В пределах 15—25° изменения уровня накопления хлорогеновой кислоты были меньшими, однако имели достаточно регулярный характер.

Эти результаты полностью совпадают с данными о влиянии температуры на накопление антоцианов в проростках гречихи (Troyer, 1964а; Margna и др., 1973а), а также антоцианов и родственных полифенолов во многих других растительных объектах (Blank, 1958; Margna и др., 1973а), в том числе и с более ранними данными некоторых других авторов по хлорогеновой кислоте (Коеппе и др., 1970; Andersen, Kasperbauer, 1971; Tanguy, Martin, 1972).

Обсуждение результатов

Резюмируя изложенный материал можно прийти к выводу, что накопление хлорогеновой кислоты в проростках гречихи подвергается в принципе таким же изменениям, какие в рассмотренных условиях имеют место в накоплении флавоноидов. Аналогия проявлялась не только в совпадении общего направления изменений, но в ряде случаев и в одинаковой «неуверенности» эффектов в обоих процессах как по флавоноид-

других объектов (Margna, 1970), такой результат несколько неожидан, хотя и этот эффект имеет свои параллели по флавоноидам. Аналогичная тенденция подавления при внесении глюкозы в проростки гречихи систематически наблюдалась и при изучении накопления антоцианов (Margna и др., 1972а; 1974а).

Таблица 2

Содержание хлорогеновой кислоты в гипокотылях проростков гречихи в зависимости от температуры, мкг/проросток

Материал	Температура, °С		
	15	25	35
Гипокотыли интактных проростков	16,2	15,1	11,7
Изолированные гипокотыли	9,9	9,0	7,7

дам, так и по хлорогеновой кислоте (эксперименты с введением питательных веществ в интактные проростки, обработка изолированных гипокотилей глюкозой). Это указывает на синхронность этих изменений в клетках и, очевидно, на единый механизм возникновения.

Анализ накопленного нашей лабораторией материала по флавоноидам показал, что важнейшую роль в указанном механизме должна играть обеспеченность биосинтеза этих соединений необходимым субстратом — фенилаланином (Маргна, 1971, 1972; Лаанест, Маргна, 1972). По аналогии можно, таким образом, предположить, что та же самая субстратная обеспеченность фенилаланином имеет основное значение и в регуляции накопления хлорогеновой кислоты. Полная идентичность путей биосинтеза основного фенилпропаноидного фрагмента обоих веществ и узловая позиция на этом пути фенилаланина, с дезаминирования которого в коричную кислоту этот специфический путь биосинтеза свое начало фактически и получает (Neish, 1964; Grisebach, 1965), делают такое предположение весьма правдоподобным.

Зависимость накопления хлорогеновой кислоты в первую очередь от наличия доступного для ее биосинтеза фенилаланина подтверждается весьма очевидным распространением характерных для флавоноидов сбалансированных взаимоотношений с процессами белкового обмена также на хлорогеновую кислоту и некоторые родственные полифенолы типа связанных форм гидроксикоричных кислот. При наличии этих соединений в растительной ткани одновременно с флавоноидами (например в проростках гречихи) такой вывод автоматически вытекал бы из изложенных обстоятельств и не требовал бы дополнительных экспериментальных доказательств специально по данной группе веществ. Некоторые наблюдения ряда авторов такую специальную информацию, тем не менее, предоставляют. Так, наблюдения над растениями табака, зараженными мозаичными вирусами, весьма наглядно свидетельствуют о существовании ожидаемой сбалансированности «биосинтез белка — формирование хлорогеновой кислоты и родственных полифенолов»: в условиях, способствующих развитию системного заражения и интенсивному синтезу вирусного белка в тканях, всегда обнаруживается значительное снижение содержания хлорогеновой кислоты (и других полифенолов) в листьях больного растения, в то время как обратные сдвиги в накоплении полифенолов начинаются только после задержки синтеза вирусного белка (Fritig, Hirth, 1971; Tanguy, Martin, 1972; Fritig и др., 1972). Реальное существование этой сбалансированности подтверждают и наблюдения об обратном характере изменений в накоплении производных фенолкарбоновых кислот и синтезе белка у растений люпина, обработанных гербицидами (Ламан, 1970), а также о синхронных изменениях в содержании белка и полифенолов в суспензионной культуре клеток розы (Davies, 1972) и некоторые другие.

Все это в конечном счете позволяет рассматривать формирование флавоноидов и хлорогеновой кислоты как две составные одного и того же процесса — процесса связывания свободных гидроксикоричных кислот, образующихся при дезаминировании фенилаланина соответствующей аммоний-лиазой в ходе катаболизма этой аминокислоты. В одну группу с хлорогеновой кислотой в этом отношении входит, очевидно, и формирование некоторых менее распространенных, но близких по структуре к хлорогеновой кислоте форм полифенолов.

ЛИТЕРАТУРА

- 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** : 1157—1164.
- Ламан Н. А., 1970. Фенольные соединения желтого люпина и изменение их содержания под влиянием некоторых гербицидов. Автореф. дисс. канд. биол. н., Минск.
- Маргна У., 1970. О взаимоотношениях образования флавоноидных соединений с углеводным обменом у растений. Изв. АН ЭССР. Биол. **19** : 143—166.
- Маргна У., 1971. О биологическом значении образования флавоноидов в растениях. Изв. АН ЭССР. Биол. **20** : 242—249.
- Маргна У., 1972. Субстратная регуляция накопления флавоноидных соединений и ее значение в метаболизме растений. Тезисы докл. семинара по физиол. и биохим. фенольных соед. раст. : 33—38. Тарту.
- Халлоп Л., Маргна У., 1970а. О светозависимости образования антоцианов и рутина в семядольных листочках проростков гречихи. Изв. АН ЭССР. Биол. **19** : 17—24.
- Халлоп Л., Маргна У., 1970б. Влияние света на образование гликофлавонов в проростках гречихи. Изв. АН ЭССР. Биол. **19** : 167—171.
- 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** : 145—168.
- Andersen R. A., Kasperbauer M. J., 1971. Effects of near-ultraviolet radiation and temperature on soluble phenols in *Nicotiana tabacum*. Phytochem. **10** : 1229—1232.
- Blank F., 1958. Anthocyanins, flavones, xanthenes. *Encycl. Plant Physiol.* **10** : 300—353.
- Davies M. E., 1972. Polyphenol synthesis in cell suspension cultures of Paul's Scarlet rose. *Planta* **104** : 50—65.
- Fritig B., Hirth L., 1971. Biosynthesis of phenylpropanoids and coumarins in TMV-infected tobacco leaves and tobacco tissue cultures. *Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.* **6** : 21—29.
- Fritig B., Legrand M., Hirth L., Ourisson G., 1972. Biosynthesis of phenolic compounds in healthy and diseased tobacco plants and tissue cultures. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353** : 134—135.
- Grisebach H., 1965. Biosynthesis of flavonoids. In: *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*. London—New York : 279—308.
- Hallop L., Margna U., 1968. Antotsüaani moodustumise kineetika tatraidandite hüpokotüülides, olenevalt indutseeriva valgusperioodi kestusest ja valguse intensiivsusest. *ENSV TA Toimet., Biol.* **17** : 154—163.
- Koeppel D. E., Rohrbaugh L. M., Rice E. L., Wender S. H., 1970. The effect of age and chilling temperatures on the concentration of scopolin and caffeoylquinic acids in tobacco. *Physiol. Plant.* **23** : 258—266.
- Margna U., Laanest L., Margna E., Otter M., Vainjärv T., 1973a. The influence of temperature on the accumulation of flavonoids in buckwheat and some other plant seedlings. *ENSV TA Toimet., Biol.* **22** : 163—175.
- Margna U., Laanest L., Margna E., Vainjärv T., 1973b. Light-stimulated accumulation of leucoanthocyanidins and other flavonoids in buckwheat seedlings. *ENSV TA Toimet., Biol.* **22** : 226—231.
- Margna U., Laanest L., Margna E., Otter M., Vainjärv T., 1974a. Sugar effects on the formation of buckwheat flavonoids: some new aspects and concluding remarks. *ENSV TA Toimet., Biol.* **23** : 19—29.
- Margna U., Laanest L., Margna E., Otter M., Vainjärv T., 1974b. Azote-induced changes in the accumulation of buckwheat seedling flavonoids. *ENSV TA Toimet., Biol.* **23** : 298—304.
- Margna U., Vainjärv T., Margna E., 1972a. The influence of exogenous sugar feeding on the accumulation of anthocyanins and rutin in buckwheat seedling hypocotyls. *ENSV TA Toimet., Biol.* **21** : 141—150.
- Margna U., Vainjärv T., Margna E., 1972b. The dependence of leucoanthocyanidin accumulation upon metabolic shifts caused by externally introduced nutritive factors. *ENSV TA Toimet., Biol.* **21** : 219—222.
- Neish A. C., 1964. Major pathways of biosynthesis of phenols. In: *Biochemistry of Phenolic Compounds*. London—New York : 295—359.
- Tanguy J., Martin C., 1972. Phenolic compounds and the hypersensitivity reaction in *Nicotiana tabacum* infected with tobacco mosaic virus. *Phytochem.* **11** : 19—28.

- Troyer J. R., 1964a. Anthocyanin formation in excised segments of buckwheat seedling hypocotyls. *Plant Physiol.* **30** : 907—912.
 Troyer J. R., 1964b. Leucoanthocyanin formation in buckwheat seedling hypocotyls. *Phytochem.* **3** : 535—539.

*Институт экспериментальной биологии
 Академии наук Эстонской ССР*

Поступила в редакцию
 23/IX 1974

Margareete OTTER, Udo MARGNA

TATRA HÜPOKOTÜÜLIDE KLOROGEENHAPPESISALDUSE SÖLTUVUS IDANDITE TOITEREŽIIMIST JA KESKKONNA TEMPERATUURIST

Resümee

Artiklis on esitatud andmeid glükoosi, fenüülalaniini, ammoniumnitraadi ja varieeruvate temperatuuritingimuste mõju kohta tatraidandite hüpokotüülide klorogeenhappesisaldusele. Tulemused näitavad, et klorogeenhappesisaldus muutub enamikul juhtudel samas suunas, nagu see toimub flavonoididegi puhul: eksogeenne lämmastik üldiselt pidurdab selle polüfenooli sünteesi, fenüülalaniin stimuleerib. Isoleeritud hüpokotüülidesse sisestatud glükoos mõju ei avaldanud, kuid intaktsetes idandites vähendas ta klorogeenhappe moodustumist; samasuguseid tulemusi on varem saadud ka antotsüaanide uurimisel. Madalamad temperatuurid ootuspäraselt stimuleerivad klorogeenhappe sünteesi, kõrgemad temperatuurid, vastupidi, mõjuvad pidurdavalt. Leitud analoogia põhjal oletatakse, et klorogeenhappe ja flavonoidide biosüntees taimerakus kujutavad endast ühe ja sama primaarse protsessi — fenüülalaniini katabolismi — kaht erinevat haru, mis mõlemad täidavad selles protsessis tekkivate vabade hüdroksükaneelhapete blokeerimise funktsiooni.

*Eesti NSV Teaduste Akadeemia
 Eksperimentaalbioloogia Instituut*

Toimetusse saabunud
 23. IX 1974

Margareete OTTER, Udo MARGNA

THE INFLUENCE OF EXOGENOUS FEEDING AND TEMPERATURE ON THE ACCUMULATION OF CHLOROGENIC ACID IN BUCKWHEAT HYPOCOTYLS

Summary

The effect of varying temperatures and of feeding glucose, phenylalanine and ammonium nitrate upon the formation of chlorogenic acid in buckwheat seedling hypocotyls was studied. In most cases the changes in the accumulation of chlorogenic acid were found identical to those observed earlier in the formation of flavonoids, i.e. feeding exogenous azote inhibited the accumulation of the polyphenol, while a treatment with phenylalanine tended to stimulate this process. Glucose introduced to the excised hypocotyls showed no definite influence, yet in intact seedlings, similar to its influence on anthocyanins, it brought about a suppression of chlorogenic acid synthesis. Lower temperatures, as expected, stimulated the accumulation of chlorogenic acid, while at higher temperatures the process was considerably retarded. By the analogy found here a suggestion is made that the biosynthetic pathways leading to the formation of flavonoids and chlorogenic acid in plant cells, may be regarded as the two related branches of one and the same primary process — the catabolism of phenylalanine, both of the two branches having the same function to block the free hydroxycinnamic acids forming during this catabolic process after deamination of phenylalanine by an ammonium-lyase.

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

Received
 Sept. 23, 1974