

Антс ТОХВЕР, Урве ЫННЕПАЛУ

О РОЛИ ШИКИМАТНОГО ПУТИ В ФОТОСТИМУЛЯЦИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТОЦИАНОВ В ПРОРОСТКАХ ГРЕЧИХИ

Результаты изучения зависимости накопления антоцианов в проростках гречихи от интенсивности освещения и спектрального состава света указывают на то, что в процессе действия света участвуют две светочувствительные реакции (Тохвер, Воскресенская, 1971). Первая из них проявляется при низких интенсивностях освещения (до 2 Вт/м^2) и служит основным ограничивающим образование антоцианов фактором. При повышении интенсивности освещения эта реакция быстро утрачивает свою регулирующую роль, однако зависимость образования антоцианов от дальнейшего повышения освещенности сохраняется, причем определяющим фактором, очевидно, становится другая светочувствительная реакция. Эти две реакции по-разному реагируют на спектральный состав света. При низких интенсивностях освещения ($< 1 \text{ Вт/м}^2$), когда проявляется первая (низкоэнергетическая) реакция, максимум светочувствительности находится в дальней красной области спектра. При более высоких интенсивностях освещения ($> 3 \text{ Вт/м}^2$) наиболее эффективным оказывается свет в синей области спектра. Следовательно, вторая (высокоэнергетическая) реакция наиболее чувствительна к синему свету.

Новые возможности для дальнейшего изучения фоторегуляции образования антоцианов, уточнения и проверки изложенного выше положения открыло применение гербицида глифосата (N-[фосфонометил]глицина), который, по данным Н. Амрхайна с сотрудниками (Amrhein и др., 1980; Holländer, Amrhein, 1980), является специфическим ингибитором шикиматного пути биосинтеза ароматических соединений. Под его действием в гипокотиле гречихи происходит накопление шикимовой кислоты, причем свет сильно стимулирует этот процесс (Amrhein, Holländer, 1981). Кроме того, наблюдается подавление накопления фенольных соединений (Holländer, Amrhein, 1980). В настоящей работе представлены результаты изучения зависимости действия глифосата от интенсивности освещения.

Методика

Отделенные гипокотили и семядольные листья проростков гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench.), которые были выращены в темноте при 25°C в течение 80 ч, помещали в чашки Петри на фильтровальную бумагу, обильно смоченную водой или водным раствором глифосата, и инкубировали на синем свету различной интенсивности. Инкубирование проводили в термостатной камере при 25° в течение 20 ч. Сразу после инкубирования антоцианы экстрагировали из размельченной ткани. Экстракцию проводили сперва с 1%-ной HCl в 96° этаноле, а затем два раза с 1%-ной HCl в смеси этанол—вода (1:1 по объему). Размельченную ткань отделяли от вытяжки центрифугированием. По-

лученные вытяжки объединяли, выдерживали в холодильнике в течение суток и центрифугировали. В полученном экстракте (10 мл) определяли поглощение света при 534 нм. Количество антоцианов выражали через оптическую плотность 10-миллиметрового слоя экстракта, приходящуюся на 1 проросток.

Для освещения использовали специальные люминесцентные лампы синего света с фильтром из синего оргстекла. Спектральная полоса применяемого света находилась в интервале 380—500 нм и более подробно охарактеризована ранее (Тоhver, Воскресенская, 1971). Опыты проведены в трех повторностях.

Результаты и обсуждение

Как видно из рис. 1 и 2, с повышением концентрации глифосата его подавляющее действие на накопление антоцианов как в гипокотильях, так и в семядолях проростка гречихи увеличивается. При этом заслуживает внимания тот факт, что в рассматриваемом интервале интен-

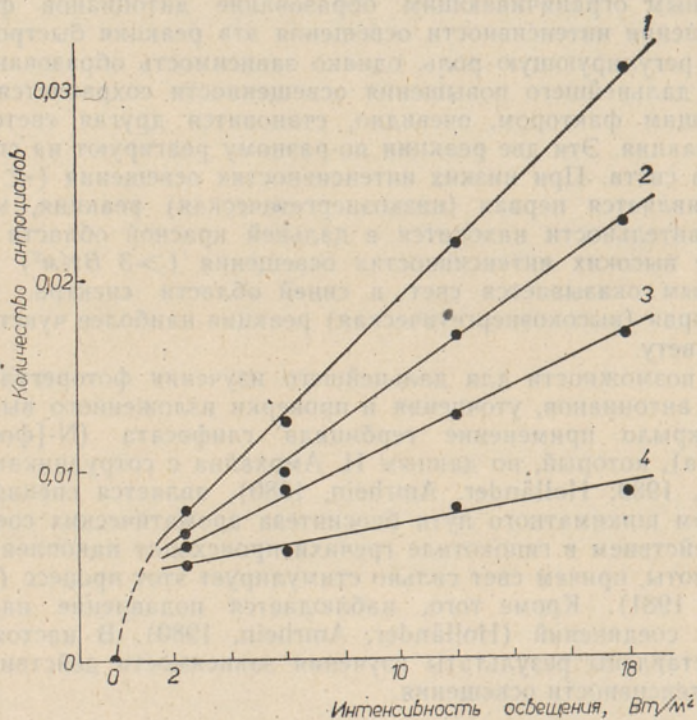


Рис. 1. Влияние глифосата на световую кривую накопления антоцианов в гипокотиле гречихи. Концентрация глифосата в воде: 1 — 0, 2 — $5 \cdot 10^{-5}$ М, 3 — 10^{-4} М, 4 — $5 \cdot 10^{-4}$ М.

сивностей сохраняется линейность зависимости накопления антоцианов от интенсивности освещения (т. н. световая кривая). Увеличение концентрации действующего вещества в инкубационной среде вызывает уменьшение наклона линейного участка световой кривой (ср. кривые 1—4 на рис. 1).

Следует иметь в виду, что световая кривая накопления антоцианов в целом является нелинейной. При понижении интенсивности освещения (ниже 2 Вт/м^2) она изгибается, ее наклон довольно резко увеличи-

вается — образуется т. н. крутой скачок. Особенно хорошо этот скачок выражен у световой кривой при дальнем красном свете (Тохвер, Воскресенская, 1971). Как видно по рис. 1 и 2, он хорошо заметен и при синем свете: начальная точка световой кривой (темновое накопление антоцианов) находится явно ниже кривых 1—4. Примечательно, что в области начального скачка накопление антоцианов менее чувствительно к действию глифосата, особенно в случае гипокотилей, где высота скачка практически одинакова при всех интенсивностях освещения.

Обнаруженное действие глифосата подтверждает гипотезу о том, что при очень слабых интенсивностях освещения световая кривая накопления антоцианов отражает функционирование одной, а при более высоких интенсивностях — другой светочувствительной реакции (Тохвер, Воскресенская, 1971). Поскольку глифосат подавляет зависимость накопления антоцианов от изменения интенсивности освещения преимущественно при высоких значениях последнего (в прямолинейной области световой кривой), то можно предположить, что эта часть световой кривой фактически отражает фотостимуляцию шикиматного пути. Другими словами, светочувствительная реакция, которую мы

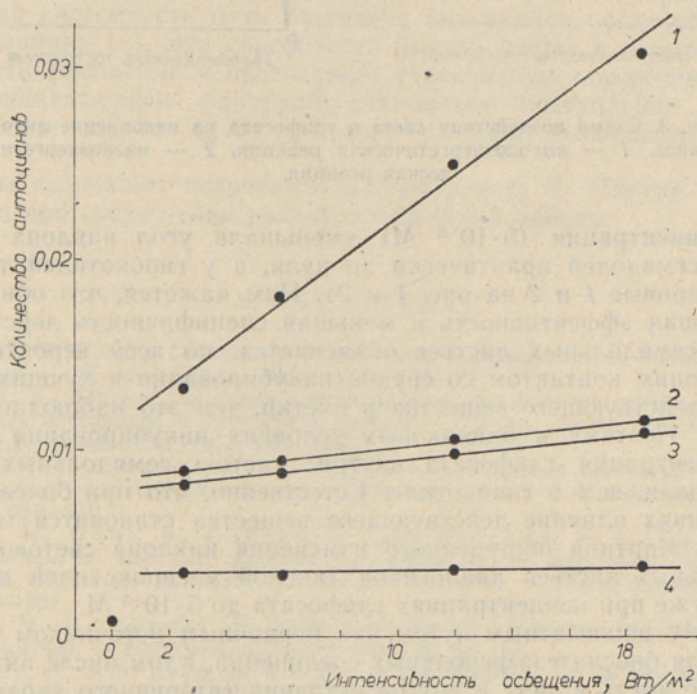


Рис. 2. Влияние глифосата на световую кривую накопления антоцианов в семядольных листьях гречихи. Обозначения см. на рис. 1.

условно назвали высокоэнергетической, связана с фотостимуляцией биосинтеза шикимовой кислоты. Блокирование шикиматного пути глифосатом препятствует проявлению этой светочувствительной реакции на уровне накопления антоцианов. Проявлению первой, низкоэнергетической реакции глифосат в умеренных концентрациях не препятствует.

Правда, в случае семядольных листьев повышение концентрации глифосата в инкубационной среде все же вызывало заметное уменьшение высоты начального скачка. В этой связи отметим, что самая

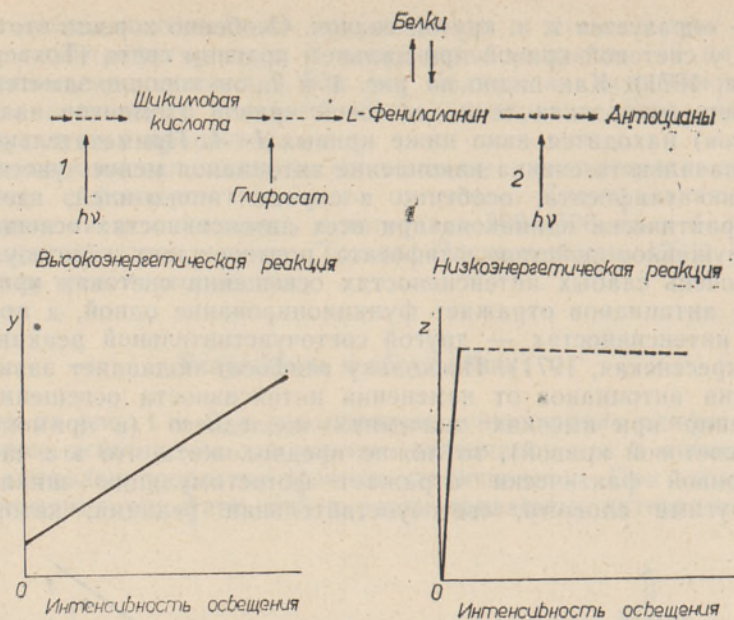


Рис. 3. Схема воздействия света и глифосата на накопление антоцианов. 1 — высокоэнергетическая реакция, 2 — низкоэнергетическая реакция.

слабая концентрация ($5 \cdot 10^{-5}$ М) уменьшала угол наклона световой кривой у семядолей практически до нуля, а у гипокотилей только на 30% (ср. кривые 1 и 2 на рис. 1 и 2). Нам кажется, что обнаруживаемая большая эффективность и меньшая специфичность действия глифосата у семядольных листьев объясняется, по всей вероятности, их более хорошим контактом со средой инкубирования и лучшим проникновением действующего вещества в клетки, чем это наблюдается у гипокотилей. Поэтому в одинаковых условиях инкубирования фактическая концентрация глифосата внутри клеток семядольных листьев более высокая, чем в гипокотиле. Естественно, что при более высоких концентрациях влияние действующего вещества становится менее специфичным. Картина постепенного изменения наклона световой кривой у семядольных листьев аналогична таковой у гипокотилей и обнаруживается уже при концентрациях глифосата до $5 \cdot 10^{-5}$ М.

Наряду с шикиматным путем как первичным источником L-фенилаланина для биосинтеза фенольных соединений, в том числе антоцианов, необходимо иметь в виду и другой источник (вторичного характера) — катаболическое расщепление белков (Krause, 1978; Маргна, 1980). Вероятно, в условиях, когда шикиматный путь подавлен глифосатом, а метаболизм растения, в первую очередь белковый синтез, еще не очень сильно нарушен, большая часть субстрата (L-фенилаланина) получается в результате диссимиляции белка.

Аналогичная ситуация может иметь место при очень слабом освещении и в темноте, когда синтез по шикиматному пути происходит медленно (Amrhein, Holländer, 1981). При постепенной активации шикиматного пути повышением интенсивности освещения доля поступающего L-фенилаланина должна соответственно возрастать, что и отражается в светозависимости накопления антоцианов.

Следует отметить, что использование эндогенного L-фенилаланина в качестве субстрата для образования антоцианов регулируется светом. В темноте в гипокотиле гречихи антоцианы не образуются

(рис. 1), а в семядольных листьях они обнаруживаются в очень малых количествах (рис. 2). То же самое можно сказать об использовании экзогенного фенилаланина в биосинтезе антоцианов (Тохвер, 1976). В гипокотиле действие *L*-фенилаланина также проявляется только на свету, однако в семядольных листьях освещенные сильно (более 10 раз) повышает его эффект. При этом увеличение накопления антоцианов, которое соответствует данному уровню экзогенного *L*-фенилаланина, наблюдается почти в полном объеме уже при низкой интенсивности освещения (примерно 2 Вт/м²). Очевидно, решающим является действие света при посредстве низкоэнергетической светочувствительной реакции, которая контролирует доступность *L*-фенилаланина для биосинтеза антоцианов.

Наконец представим схему (рис. 3) факторов, воздействующих на образование антоцианов, и приведем предполагаемые характеристики обеих светочувствительных реакций. Действие света с участием т. н. высокоэнергетической реакции определяет уровень потока субстрата по шикиматному пути — скорость образования любого метаболита (*y*) этого пути, например, шикимовой кислоты или фенилаланина. Действие света при посредстве низкоэнергетической реакции проявляется в пропускной способности пути биогенеза антоцианов после образования *L*-фенилаланина (*z*). Эта способность быстро растет с повышением интенсивности освещения и превосходит субстратную обеспеченность так, что ограничивающим фактором становится поступление субстрата (*L*-фенилаланина), т. е. по существу это уже высокоэнергетическая реакция.

Авторы выражают искреннюю благодарность У. Маргна за ценные замечания при обсуждении результатов данной работы.

ЛИТЕРАТУРА

- Маргна У. В. О месте биосинтеза флавоноидов в общей системе метаболизма растений. — Ж. общей биол., 1980, 41, 68—79.
- Тохвер А. К. Влияние экзогенного фенилаланина на светочувствительность накопления антоцианов в проростках гречихи. — В кн.: Регуляция роста и питание растений. Рига, 1976, 133—139.
- Тохвер А. К., Воскресенская Н. П. Световые кривые накопления антоцианов в проростках гречихи при разном качестве света. — Физиол. растений, 1971, 18, 904—910.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P., Steinrücken, H. C. The site of the inhibition of shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation *in vivo* and *in vitro*. — Plant. Physiol., 1980, 66, 830—834.
- Amrhein, N., Holländer, H. Light promotes the production of shikimic acid in buckwheat. — Naturwissenschaften, 1981, 68, 43—46.
- Holländer, H., Amrhein, N. The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. I. Inhibition by glyphosate of phenylpropanoid synthesis in buckwheat. — Plant Physiol., 1980, 66, 823—829.
- Krause, J. Über die Bedeutung des Endosperms für die Flavonoidsynthese in den Kotyledonen von *Fagopyrum esculentum* Moench. — Z. Pflanzenphysiol., 1978, 90, 319.

Институт экспериментальной биологии
Академии наук Эстонской ССР

Поступила в редакцию
23/IX 1981

ANTOTSÜAANIDE JA ŠIKIMHAPPE BIOSÜNTEESI VALGUSTUNDLIKKUSE OMAVAHELISEST SEOSEST TATRAIDANDITES

Artiklis on käsitletud aromaatsete ühendite biosünteesi šikimaatse tee inhibiitori glüfoosaadi mõju antotsüaanide akumulatsiooni sõltuvusele idandite kiiritatusest. Katsetest ilmnes, et kontsentratsioonidel $5 \cdot 10^{-5}$ — $5 \cdot 10^{-4}$ M mõjub glüfosaat antotsüaanide akumulatsioonile väikese kiiritustiheduse ($< 2 \text{ W/m}^2$) korral vähe, kuid inhibeerib tugevasti intensiivsema kiirguse korral. Idulehed on glüfosaadile tundlikumad kui iduvarred. Kiiritustiheduse suurenedes üle 2 W/m^2 lakkab antotsüaanide edasine akumulatsioon idulehtedes, kui glüfosaadi kontsentratsioon inkubatsioonikeskkonnas on $5 \cdot 10^{-5}$ M, ja iduvartes, kui see on $5 \cdot 10^{-4}$ M.

On oletatud, et antotsüaanide akumulatsiooni sõltuvus kiiritustihedusest tuleneb kahe valgustundliku reaktsiooni olemasolust antotsüaanide biosünteesi protsessis. Ühe mõju avaldub nõrgas valguses ja see reaktsioon ei ole glüfosaadi suhtes kuigi tundlik; nähtavasti reguleerib ta L-fenüülalaniini kasutamist antotsüaanide biosünteesiks. Šikimhape ja järelikult ka L-fenüülalaniini sünteesi stimuleerib valgus teise valgustundliku reaktsiooni vahendusel, mille toime ilmneb intensiivsema kiirguse korral.

ON THE ROLE OF SHIKIMATE PATHWAY IN THE LIGHT-STIMULATED ANTHOCYANIN FORMATION

The shape of the light curve of anthocyanin accumulation indicates that two photosystems, a low irradiance and a high irradiance system, are involved in the light-mediated anthocyanin synthesis in buckwheat seedlings. The low irradiance system has the action maximum in the far-red region, and the high irradiance system — in the blue region. In the present study the influence of the herbicide glyphosate, a potent inhibitor of shikimate pathway, on the light curve of anthocyanin accumulation in blue light was investigated. Data show that incubation of hypocotyls and cotyledons in 0.5 mM and in 0.05 mM glyphosate, respectively, almost entirely prevents the action of the high irradiance system to be expressed, without, however, affecting the low irradiance system. It is concluded that the promotion of shikimate pathway by light is mediated only by the high irradiance blue light system. The low irradiance system probably controls the utilization of a late precursor of anthocyanin synthesis, possibly L-phenylalanine. The latter statement is based on the fact that in buckwheat seedlings anthocyanin synthesis from endogenous substrates as well as from exogenous L-phenylalanine proceeds at a substantial level only in the light. The L-phenylalanine feeding effect reached its maximal value already at low irradiance values.