

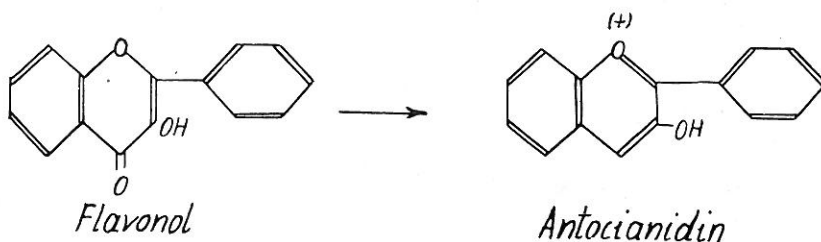
Az antociánok képződésének élettanáról

GIMESI N., GARAY A., POZSÁR B. és FARKAS G.

Eötvös Loránd Tudományegyetem Nővénytudományi Intézete, Budapest

Bevezetés

Az antociánok növényi festékanyagok közé tartoznak, melyeket rendszerint a szíromlevelekben, illetőleg termésekben találunk, de megellelhetők a növények minden szervében, a gyökérképletben, a levélképletben és a függelékes képletben egyaránt. Willstätter vizsgálata szerint az antociánok glikozidák, amelyeknek aglikon része a flavanolokból redukció útján levezethető fenil-benzo- γ -pirillium. (5, 6.)



A redukált flavanol gyökhöz különböző számú hidroxil és metoxi csoport kapcsolódhat miáltal antocianidinek jönnek létre, melyek, a természetben minden valószínűség szerint oxónium-sók alakjában fordulnak elő (16).

Szerepük tisztázatlan, képződésükre vonatkozóan igen kevés vizsgálat ismeretes. Az irodalom első jelentései a század elejéről valók. Johansen (3) megállapította, hogy narkotizált növényekben nem képződik antocián. Alig valamivel Johansen közlése után Richter (13) észrevette, hogy az antocián tartalmú borsó csíranövényképek különböző gázokkal fertőzött levegőben nem termelnek antociánt. Hasonló kísérleteket végzett Molisch (11). Zea mays magvakat szűrőpapíron, világosságban csíráztatott és azt tapasztalta, hogy a gyökerek megpirosodtak. Azután a csírázó magvakat üvegborító alá helyezte egy almával együtt. Az alma illó anyagainak hatására a megpirosodás nem jelentkezett.

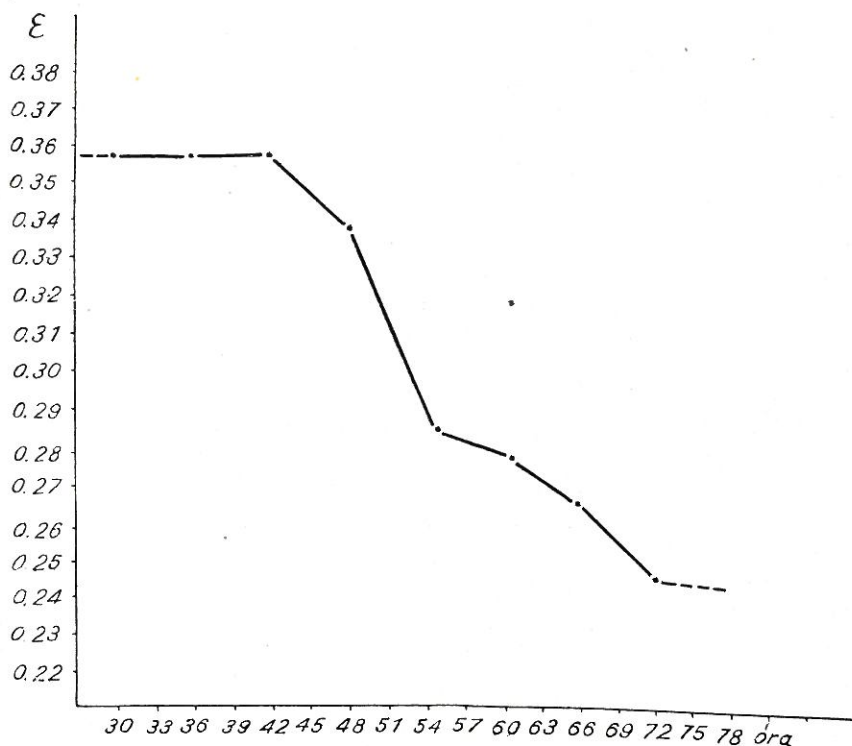
Később Harder (2) és munkatársai végeztek idevonatkozó vizsgálatokat. Megállapították, hogy a hőmérséklettől függően változó lehet a virágok színe. Így pl. az *Erodium gruinum* 20 fokon kék, magasabb hőmérsékleten rózsaszínű, még magasabban színtelen virágokat hoz. Később azt is megállapították, hogy

bizonyos növények virága fejlődésében rövid ideig tartó szakasz figyelhető meg, melyben a hő hatására érzékeny (1). Ebben a szenzibilis periódusban a különböző hőfokkal kezelt növények különböző színű virágokat hoznak. H a r d e r kísérletei szerint a virágok antocián képződéséhez bizonyos esetekben fény is szükséges.

Kísérleti rész

A fény és antocián képződés között levő összefüggésre vonatkoznak kísérleteink. Megfigyeltük, hogy a sötétben csírázott *Amaranthus caudatus* L. nem termel antociánt, míg a világosban csírázóké igen élénk vörös színűek. Az antocián képződés és a fény között levő összefüggés nyilvánvaló. Remélhettük tehát, hogy az ilyen irányban való kísérletezés az antocián képződésének élettanához új adatokat szolgáltathat.

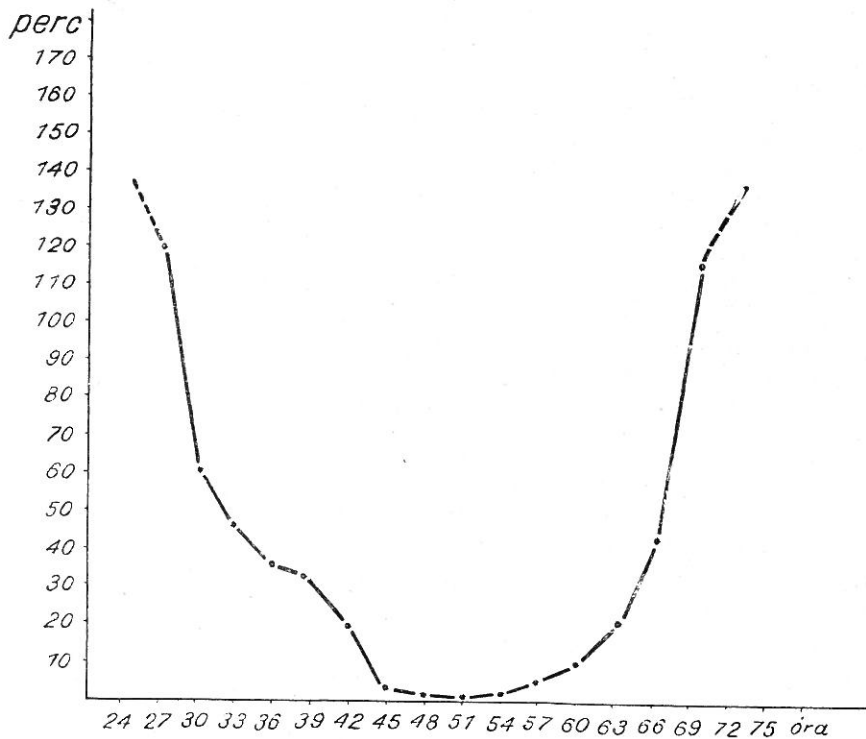
Feltűnő, hogy a 3—4 napig sötétben csírázott növények már akkor sem pirosodnak meg, ha később fényre helyezük őket. Úgy látszik ebből, hogy a fény csak meghatározott időben hat az antocián képződésére. A pontosabb vizsgálatokat úgy végeztük, hogy Petri-csészében nedves szűrőpapíron, sötétben csíráztattuk növényeinket és 6 óránként egy-egy Petri-csészét szórt napfényre helyeztünk. Az elsötétítést kettős fényszigetelő borítóval oldottuk meg, mivel már a legkisebb fényinger is meghamisítja az eredményeket. Azt tapasztaltuk, hogy 42 órás sötétben csírázás után a világosba helyezett növényekben ugyanolyan mennyiségű antocián képződött, mintha a csírázás megindulásától kezdve fény érte volna



1. ábra

őket. A 48—66 órás sötét kezelés után fényre került növények már lényegesen kevesebb antociánt termelnek, ha pedig 72 óráig voltak a csírázó növények sötétben, s ezután helyeztük őket világosra, nem pirosodtak meg. A jelzett eredményeket számszerűen a mellékelt grafikonon tüntettük fel (1. ábra). Vízszintes tengelyén a csíra-növények kora, függőleges tengelyén pedig a kivont antocián-oldat fotométerrel mért extinkciója olvasható. Az antocián kivonására és tisztítására eljárást dolgoztunk ki, mivel fotométeres vizsgálatok céljaira a közönségesen használt módszerekkel készült kivonatok nem alkalmasak. (Csíranövényekből 5 cg-t 10 ml vízzel kémcsőbe helyeztünk. Ezután a kémcsövet forró vízre tettük 90 mp-re. Ezalatt az idő alatt az antocián kioldódott. A mutakozó gyenge opaleszcencia megszüntetése céljából feles mennyiségű kristályos Seignette-sót adtunk az oldathoz. Ezzel alaposan összeráztuk, majd szűrtük).

E kísérlethől kiderült, hogy az *Amaranthus caudatus* csíranövények antociánképzésre vonatkozó érzékeny szakasza 72 órás korig tart (10). Ellenőrző kísérleteink azt is igazolják, hogy amennyiben e szakaszban az említett szórt napfény érte a növényeket, azután már sötétben is termelnek antociánt. Igen érdekes, hogy a csíranövények fényérzékeny szakasza nem mindig tart 72 óráig. Március hónapban végzett kísérleteink szerint már 48 órában elvesztik szenzibilitásukat, szemben a grafikon július hónapban nyert adataival. A két mérés között levő eltérés annál érdekesebb, mivel a csíráztatás mindkét esetben 19—21 fokon történt.



2. ábra

A továbbiakban annak megállapítására törekedtünk, vajjon szükséges-e, hogy az egész szenzibilis szakaszban fény érje a csíranövényt, vagy elég rövid ideig tartó fényinger az antociánképződés megindításához. A kérdés eldöntése céljából szűrőpapíron sötétben csírázó *Amaranthus* magvak közül minden 3 órában kivettünk tíz tenyészetet, s ezek közül 1—1-t különböző ideig tartottunk villanyfényen (40 wattos izzó, 1 m távolságról). Az eredmények azt tanúsították, hogy 27 órás csíranövények esetében 120 perces megvilágítás szükséges az antociánképzés megindításához, viszont 48—51 órás csíranövények prezentációs idejét két percnél találtuk. 69 órás csíranövények pedig csak akkor képeztek antociánt, ha 120 percig világítottuk meg őket. Az eredményeket grafikonon is ábrázoltuk (2. ábra). Az abszcisszán a csíranövények korát, az ordinátán az antociánképzés megindulásához szükséges megvilágítás időtartamát tüntettük fel. A méréseket 1950. júliusának első felében végeztük.

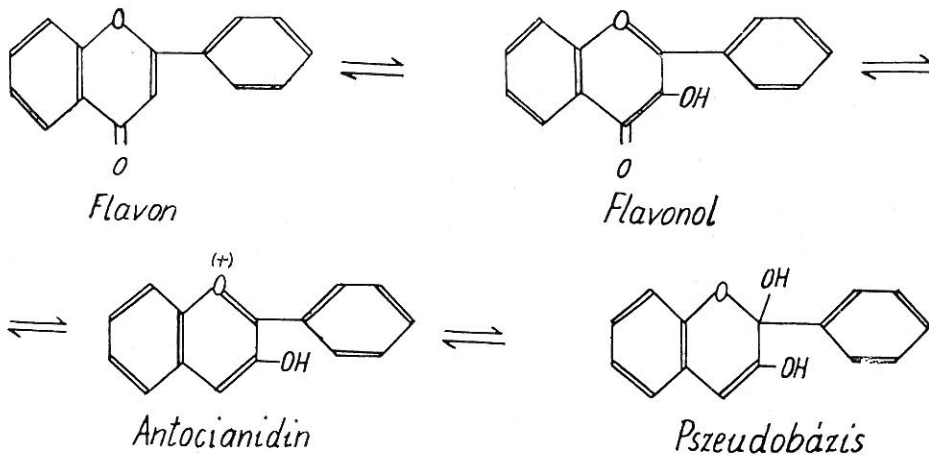
Ismeretes, hogy a fototropiás ingerfelvétel helye meghatározott. Megvizsgáltuk, vajjon az antociánképzéshez szükséges fényinger felvétele is helyhez kötött-e? E célból a növények szikleveleit eltávolítottuk, szárukra pedig különböző helyeken önlemezgyűrűt helyeztünk és így tettük világosságra. Az előző esetben azt találtuk, hogy a csíranövények szára levél nélkül is megpirosodott. Az utóbbi kísérlet technikailag nehezen kivihető, tekintve, hogy az önlemezkevel becsavart gyenge növénykékké megsérültek és elpusztultak. Az ilyen vizsgálatokhoz tehát más kísérleti tárgyat kerestünk. Alkalmassnak mutatkozott a *Ricinus communis var. purpurea* csíranövénye. Sötétben nevelt példányok szárát megfelelő helyen önlemezgyűrűvel fedtük és fényre helyeztük. Néhány nap múlva levéve a gyűrűt az tapasztaltuk, hogy a csíranövény szára az önlemeznek megfelelő helyen nem pirosodott meg. Ebből kiderül, hogy a fényinger felvételének helye nem meghatározott.

Az említett kísérletek eredményei alapján arra a megállapításra juthatunk, hogy az *Amaranthus caudatus* csak fejlődésének megfelelő szakaszában rendelkezik az antociántermelés képességével. Az antociánképzés külső feltételei közé tartozik a fény, belső feltételei pedig sajátos anyagszere folyamatok, melyek a fejlődés folyamán megváltoznak. Azok a vizsgálatok, melyek a szóbanforgó anyagcsere-folyamatok részletesebb megismerésére irányultak, nem jártak sikerrel. Mindössze annyit állapíthattunk meg, hogy az érzékeny szakasz megszűnése és a nyújtózasos növekedés, valamint az autotrofiás táplálkozás megindulása között összefüggés lehetséges, minthogy a három jelenség mindig együtt következett el.

További kísérleteink a fényhatás mechanizmusának tisztázására irányultak. Abból a feltevésből indultunk ki, hogy a fényhiány nemcsak alapvető életfolyamatokat érint, hanem specifikus hatása van az antociánképződés menetében is.

A növényekben található, számításba jövő három nagy festékcsoport a flavonok, flavonolok és antocián festékek (az antocián-pszudobázis is ide tartozik) kémiai szerkezetüket illetően egymással közeli rokonok.

A flavonok és flavonolok közé számos sárga növényi festékanyag tartozik. Egyes glikozidáik a fehér virágokban is megtalálhatók (15). Az antociánok aglikonjait antocianidineknek nevezik. A flavonok, flavonolok és antocianidinek egymásba átredukálhatók, illetőleg oxidálhatók. Willstätter pl. cink, magnézium és sósav segítségével kvercetin cianidinné redukált (5). Minden valószínűség szerint a növény is képes ilyenféle átalakításokra. A *Polygonum compactum*, *Peonia* sp.-en, *Hibiscus mutabilis*en végzett ilyen irányú kísérletek szerint az antociánok előanyaga — kromogen — lenne (8, 9). Ezzel szemben Noack (12) a *Cobea scandens*en és *Victoria regina*en végzett kísérletei alapján azt állítja, hogy az antociánok »alacsonyabb szintű» vegyületekből közvetlenül képződnek. Újabb



Jonesco (4) és Kozlowsky (7) nem osztják Noack felfogását. Alábbi kísérleteink is azt a felfogást támasztják alá, hogy az *Amaranthus caudatus* antociánja nem »alacsonyabb szintű« vegyületekből, hanem flavonolokból képződik.

A fényhatás mechanizmusának megállapítása céljából négy napja sötétben csírázott *Amaranthusok* kivonatát kémiai analízisnek vetettük alá. Azt kerestük, hogy megtalálható-e a kivonatban az antocián valamelyik feltételezhető előanyaga.

1. Először megvizsgáltuk, hogy pseudobázis van-e jelen. A kimutatás során Robinson (14) idevonatkozó eredményeit használtuk, amelyek szerint a pseudobázisok 10%-os vizes sósavoldatban állandóak. 10%-os alkoholos sósavban lassan átalakulnak antocianidinekké, amelyeket színükről észlelhetünk. Az átalakulást a magas hőmérséklet elősegíti.

Porcelán mozsárban szétdörzsöltük a kérdéses növényrészeket, 10%-os metilalkoholos sósavval kémcsőbe mostuk s néhány percig főztük. Minthogy antocián színeződést nem észlelhetünk, arra kellett következtetnünk, hogy a csíranövényekben pseudobázis nem volt jelen.

2. A flavonok legbiztosabb kimutatása ultraibolya abszorpciós spektrumuk vizsgálata révén történhet. Megfelelő technikai berendezés hiányában e vizsgálatokat nem végezhetjük el. Ezért a flavonok kémiai reakcióiból indultunk ki, amelyet Rupe és Schaefer írnak le, az egyes flavonokra külön-külön, táblázatos alakban a Handbuch der Pflanzenanalyse III/2. kötetében. A reakciók külön-külön nem döntöek, együttes jelentkezésük azonban elég megbízhatóan utal flavonok jelenlétére. Ugyanezeket a reakciókat Strömer és Witsch (16) is használták pozitív eredménnyel a kerti petunián végzett vizsgálataik során, amelyekben a flavonok jelenlétét UV abszorpciós spektroszkópiával is ellenőrizték.

A reakciók közül egyik legfontosabb az alkoholos kivonatok 5%-os FeCl_3 -al adott, leggyakrabban zöld, egyes flavonok esetében barnás színeződése, illetőleg csapadék. Számításba jövő reakciók még: báriumhidroxiddal narancssárga csapadék, alkoholos telített ólomacetáttal sárga csapadék, az ammóniákos ezüst-nitrátot hidegben is erősen redukálja, a Fehling oldatot csak erős forralás után. Ammóniumhidroxiddal intenzív sárga színeződést ad. — Erre vonatkozó vizsgálataink negatív eredménnyel zárultak, ami arra utal, hogy a csíranövények flavonokat nem tartalmaznak.

3. A flavonolok vizsgálatát Noack (12) adatai alapján végeztük, aki Willstätter (18) eredményeit használta fel, amelyek szerint a flavonolok savanyú közegben in vitro antociánokká redukálhatók.

A savanyú vizes kivonatokat amilalkoholba ráztuk át, amely a flavonolok igen jó oldószere. A sárgás színű amilalkoholos fázist háromszor vízzel átráztuk, majd magnéziumszalag jelenlétében sav hozzáadásával megindítottuk a redukciót. Oldatunk csakhamar megpirosodott annak jeléül, hogy flavonol volt jelen, amely antocianidinné redukálódott.

Ugyanezt a módszert alkalmazta Strömer és Witsch (16) is flavonoloknak petunia pártájában való kimutatására. Vizsgálataikat modell kísérletekkel is alátámasztották, amennyiben ismert flavonolt (kvercetint) adagolva a kivonatok egy részéhez a redukció elvégzése után mindig erősebb, de azonos jellegű piros színeződést kaptak (cianidin).

Kísérletek megbeszélése

Vizsgálataink azt igazolják tehát, hogy az *Amaranthus caudatus* csíranövénye a sötétben flavonolt termel. A fény tehát a flavonol antociánná alakításában szerepel. Jelentkezik a kérdés, vajon miben rejlik a fény hatása? Azt vélhetnénk, hogy a flavonol a fényenergiát közvetlenül felhasználhatja redukcióra fényabszorpciós képessége révén. E feltevés helytelenségét kísérletileg igazoltuk a következő úton:

Sötétben csírázó *Amaranthus*okat az érzékeny periódusban különböző színű fények hatásának vetettük alá. Színszűrő üvegeink nem voltak szigorúan véve monokromatikusak (abszorpciós maximumaik: 420—500, 500—560, 560—620, 720—750 m μ) 10 órás megvilágítás után feljegyeztük az eredményeket. Legerősebben a pirosszínű fény hatott, a kék fényvel megvilágított növények már kevesebb antociánt termeltek, a sárga- és zöldszínű fény pedig alig hatott az antocián képzésére. A fényhatás sorrendje tehát a következő:

piros > kék > sárga > zöld

Ha a flavonol az abszorbeált fényt használná redukcióra, leghatásosabbnak a kék fénynek kellene lennie, minthogy a flavonolok ezt abszorbeálják legerősebben. Úgy látszik tehát, hogy a fény nem közvetlenül működik, hanem feltételezésünk szerint valamely enzimre hat, amely a flavonol-antocián reakciót katalizálja. Ilyen enzim létezésére következtethetünk abból a megfigyelésünkéből, hogy a forró vízzel óvatosan kivont antociánok állandóbbak, hosszabb ideig tarthatók el, mint a dörzsölés útján készült antocián kivonatok.

Összefoglalás

Az *Amaranthus caudatus* csíranövények fény nélkül nem termelnek antociánt. Megállapítottuk, hogy a csíranövények életét egy érzékeny szakasz jellemzi, mely egészen fiatal korra, a nyújtózásos növekedést megelőző időre esik. Ha ebben a szakaszban nem éri fény a csíranövénykét, antociánt nem termel többé akkor sem, ha később fényre kerül. Sikertült meghatározni a fényinger prezentációs idejét 2—3 perc időtartamban. A fényhatás mechanizmusára vonatkozóan a sötétben csírázó *Amaranthus*ból kivonatot készítettünk és megállapítottuk, hogy flavonol keletkezik. A fény tehát flavonol \rightarrow antocián reakcióban jutna szerephez. Vizsgálataink szerint e reakcióban a fényenergia közvetlenül nem

hasznosítható, minthogy a piros fény a leghatásosabb, a flavonolok abszorpciós maximuma pedig a kék színtartományba esik. A reakció létrejöttének csak külső feltétele a fény. Belső feltétele sajátos, részleteiben még ki nem kutatott anyagcsere, mely a csíranövények nyúlásos növekedését és autotrofiás táplálkozásának kialakulását megelőző korra esik. Ezután a fény már nem hatásos.

Érkezett: 1951. október 26.

Irodalom

1. Bünning, E.: *Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze*. Berlin, 1948. Springer.
2. Harder, R.: *Naturw.* 26. 723. 1938.
3. Johannsen, W.: *Das Ätherverfahren beim Frühreiben*. Jena, 1906.
4. Jonesco, St.: *Ann. Sc. Nat. Bot. Paris.* 12. 249. 1930.
5. Karrer, P.: *Anthocyane* (Klein G.: *Handbuch der Pflanzenanalyse*. III. 2. Wien. 1933. Springer.)
6. Karrer, P.: *Lehrbuch der organischen Chemie*. Leipzig, 1942. Thieme.
7. Kozłowski, A.: *Acta Soc. Polon.* 12. 275. 1935.
8. Kuilman, L. W.: *Rec. Trav. Bot. Néerl.* 27. 787. 1930.
9. Kuiper, J.: *Rec. Trav. Bot. Néerl.* 28. 1. 1931.
10. Lisenko, T. D.: *Agrobiológia*. Budapest, 1950. Mezőgazdasági Könyv és Folyóirat Kiadó.
11. Molisch, H.: *Der Einfluss einer Pflanze auf die andere, Allelopathie*. Jena, 1937. Fischer.
12. Noack, K.: *Zeitschr. f. Bot.* 10. 561. 1918.
13. Richter, O.: *Mediz. Klinik.* 34. 1. 1907.
14. Robinson, M. & R.: *Biochemic. J.* 27. 206. 1933.
15. Rupe H. & Schaerer M.: *Flavone, Flavonone, Isoflavone und Xanthone gelbe Blütenfarbstoffe*. (Klein G.: *Handbuch der Pflanzenanalyse*. III. 2. Wien. 1933. Springer.)
16. Störmer I. & Witsch H.: *Planta.* 27. 1. 1938.
17. Thomas, M.: *Plant Physiology*. 1949.
18. Willstätter, R. & Burdick, Ch.: *Liebigs Ann.* 412, 217. 1917.

О ФИЗИОЛОГИИ ОБРАЗОВАНИЯ АНТОЦИАНОВ

Н. Гимеши, А. Гараи, Б. Пожар и Г. Фаркаш

Институт Физиологии Растений при Университете имени Этвеш Лоранда, Будапешт

Выводы

Всходы *Amarantus caudatus* в темноте не образуют антоциан. Образование последнего не происходит и в том случае, если предварительно пророщенные в темноте растения позже (через 3–4 дня) попадут под действие света. Этот факт указывает на то, что действие света эффективно только в определенной стадии развития. Согласно результатам исследования по определению чувствительной стадии, растения, прошедшие предварительное пророщивание в темноте и после 42 часов поставленные на свет, образовали такое количество антоцианов, прорастающие в темноте в течение 72 часов, уже не покраснели. Содержание антоцианов определялось фотометром из вытяжек на горячей воде.

Светочувствительная стадия обнаруживает сезонные изменения, поскольку в месяце июле длительность светочувствительной стадии продолжается до 72 часового возраста, а в марте проростки в 48 часовом возрасте уже теряют чувствительность.

Во время чувствительной стадии нет необходимости в постоянном освещении. В результате соответствующего времени освещения растений различного возраста, презентационное время проростков 48–51 часового возраста в месяце июле составляло 2 минуты. Растения младшего (27 часового) и старшего (69 часового) возраста образовали антоциан только после более длительного (120 минут) освещения. В противоположность восприятию фототропического стимула, место восприятия светочувствительного стимула неопределенное, о чем свидетельствует следующий факт. Гипокотиль проростков, выращенных в темноте и в светочувствительной стадии оловянной пластиной, после перемещения проростков на свет, не покраснел на том месте, где раньше был покрыт оловянной пластиной.

Свет является внешним условием образования антоцианов. Внутренним условием образования антоцианов является особый тип обмена веществ, изменяющийся в процессе развития. Между прекращением светочувствительной стадии, ростом в высоту и началом автотрофного питания может быть известная взаимосвязь. Химический анализ амилалкогольных вытяжек, полученных из выращенных в темноте проростков — на основании восстановительной способности раствора — обнаружил в нем наличие флавонола. Следовательно, свет участвует в превращении флавонола в антоциан. Световая энергия не используется непосредственно на восстановление, так как флавонолы поглощают лучше всего синий свет, на образование же антоциана более всего поощряюще влияет красный свет.

Предполагается, что свет влияет косвенно на некоторый фермент, катализирующий восстановление флавонола антоцианом. Это подтверждается опытом, согласно которому вытяжки, полученные горячей водой, более постоянны, чем вытяжки, приготовленные путем разтерки. Известный факт, согласно которому в определенном возрасте уже несколько минутное освещение оказывается весьма эффективным, представляет возможность сделать вывод, что свет играет роль не в деятельности предполагаемого фермента, но более вероятно в его образовании и активизации.

On the Biology of the Formation of Anthocyan

N. GIMESI, A. GARAY, B. POZSÁR and G. FARKAS

Institute of Plant Physiology, Eötvös Lóránd University, Budapest

Summary

The seedling of *Amaranthus caudatus* does not produce anthocyan in darkness. Anthocyan is absent as well when the seedlings-germinated in darkness- are placed in sunlight only later, after 3—4 days. This shows that light is only effective in certain stages of development. According to the data of an experiment designed to examine the light sensitive stage, seedlings prior germinated in darkness and then placed in light after 42 hours, developed as much anthocyan as when kept in sunlight from the start of germination. Seedlings germinated for 72 hours in darkness showed no development of red colour. The content of anthocyan was determined by photometer, in extracts prepared with hot water.

The light sensitive stage showed seasonal changes since the light sensitive stage lasted in July for 72 hours, contrary to seedlings in March which lost their sensitivity in an age of 48 hours already.

No constant exposure to light is necessary in the sensitive stage. The exposure to light of plants of various age proved that in July 2 minutes were satisfying for anthocyan production in seedlings aged 48 to 51 hours, whereas 120 minutes exposure was needed for the development of anthocyan in younger (aged 27 hours), respectively older (aged 69 hours) seedlings.

Contrary to the phototropic stimulus uptake, the place of stimulus uptake is not defined, since the hypocotilum of seedlings in the light sensitive age, germinated in darkness and enrolled in a tin sheet did not turn red under the tin sheet when kept in light for several days.

Light is apparently the external condition of anthocyan development. The inner condition is a special type of metabolism changing during development. Some correlation is possible between termination of the light sensitive stage, the start of plant growth by elongation and the start of autotroph nutrition. The chemical analysis of the amylic alcoholic extracts of seedlings grown in darkness refers — on the basis of the reducing effect of the solution — to flavonol. Light seems thus to play a role in the conversion flavonolanthocyan. Light energy is not consumed directly for reduction since flavonols absorb blue rays most vigorously whereas red rays are most effective on the formation of anthocyan.

Light presumably influences certain enzyme catalysing the reduction process flavonolanthocyan. This is affirmed by the experience of the authors that extracts by hot water proved more stable than those prepared by rubbing. The fact that a relative short exposure to light (for some minutes only) is very effective in certain age of seedlings allows to draw the conclusion that light has no role in the activity of the supposed enzyme but rather in its formation or activation.