Wpływ długości fali światła na biogenezę barwnika antocyjanowego w tkance winorośli hodowanej *in vitro*.

*On the influence of the wave length of light on the biogenesis
of anthocyanin pigment in the Vitis vinifera tissue in vitro*

A. SŁABECKA-SZWEYKOWSKA

WSTĘP

Wśród czynników posiadających istotne znaczenie dla powstawania antocyjanin w roślinach znajduje się także światło. Istnieją wprawdzie nieliczne wyjątki i znane są przykłady tworzenia się antocyjanin w ciemności. Tak na przykład M o l i s c h (1928) wykazał u przedstawicieli kilku rodzin (*Crassulaceae*, *Balsaminaceae*, *Melastomaceae*, *Compositae*) występowanie barwnika antocyjanowego w wierzchołkach wzrostu korzeni. Kiełkujące rośliny czerwonej kapusty również bez dostępu światła tworzą antocyjaninę. Jak jednak podkreśla K a r s t e n s, w tych przypadkach w organach produkujących barwnik antocyjanowy znajdują się na ogół duże ilości substancji zapasowych, wśród których mogą być pewne związki niezbędne do wytworzenia barwnika. Z drugiej zaś strony, ze względu na ogromne rozpowszechnienie antocyjanin w różnych grupach systematycznych i w różnych warunkach występowania roślin prawdopodobna jest różnorodność mechanizmów syntezy tych barwników. Podobnie jak w przypadku chlorofilu są także wśród roślin wyjątki (głomy, mszaki, iglaste) zdolne do syntezy tego barwnika w ciemności.

Dla większości roślin wytwarzających antocyjaniny światło jest niezbędnym czynnikiem syntezy tego barwnika. Przez pewien czas mniemano, że wpływ światła na biogenezę antocyjanin idzie pośrednio poprzez fotosyntezę i łączono tę sprawę z tak zwaną „teorią cukrową“ O v e r t o n a (1899). W bardzo wielu przypadkach istnieje bowiem dość ścisły związek między stężeniem cukrów w tkance a powstawaniem antocyjanin. Zrozumiałe i proste było więc łączenie wpływu światła na powstawanie antocyjanin z gromadzeniem się w soku komórkowym produktów fotosyntezy, jakimi są cukry.

W nowszych czasach jednak coraz bardziej utrwalał się pogląd, że w proces syntezy antocyjanin włączona jest bezpośrednio reakcja foto-

chemiczna (K a r s t e n s 1939, T h i m a n n i E d m o n d s o n 1949, E d d y i M a p s o n 1951). Jeszcze w roku 1908 L i n s b a u e r wykazał w kiełkującej gryce prostą zależność pojawiania się antocyjanowego barwnika od ilości dostarczonego światła (intensywność $\times$ czas).

Niezbędnym etapem badania każdego fotobiologicznego mechanizmu jest stwierdzenie wpływu długości fali światła na przebieg tego procesu, porównanie otrzymanej w ten sposób krzywej aktywności światła z krzywą jego absorpcji przez substancje znajdujące się wewnątrz żywego układu i ewentualna identyfikacja substancji pochłaniającej światło w danym biologicznym procesie. Dla biogenezy antocyjanin istnieją już na ten temat pewne dane. A r t h u r (1932) wykazał, że jabłka czerwienieją tylko w świetle 2900—600 Å, a więc w przedziale widma stosunkowo słabiej czynnym w procesie fotosyntezy, przy czym najbardziej czynny okazał się krótki ultrafiolet — około 2900 Å — oraz światło niebieskie i fioletowe. W i t h r o w i i n n i (1953) stwierdzili u kiełkujących roślin fasoli i kukurydzy znacznie silniejsze tworzenie się antocyjanu w świetle czerwonym niż w niebieskim, przy czym w badaniach swych autorzy ci również wykluczyli czynnik fotosyntezy. Te sprzeczne z sobą wyniki, jak również sprzeczne wyniki różnych badań odnoszące się do innych momentów biogenezy antocyjanin, świadczą, iż u roślin istnieje więcej niż jeden tylko typ biogenezy tych barwników.

Niniejsza praca poświęcona jest zbadaniu wpływu różnych odcinków widma światła widzialnego na proces syntezy antocyjaniny w tkance winorośli hodowanej *in vitro*, która jest doskonałym obiektem do wielu badań ze względu na swój jednorodny charakter (brak zróżnicowania na organy i w związku z tym brak zróżnicowania na różne typy przemiany materii), wykluczenie czynnika fotosyntezy przez brak chlorofilu oraz znajomość warunków biogenezy antocyjaniny w tej tkance — między innymi wybitna zależność syntezy barwnika od światła — (S ł a b e c k a - S z w e j k o w s k a 1952) i możliwość ścisłego kontrolowania tych warunków.

MATERIAŁ I METODY

Do doświadczeń użyto tkanki „normalnej“ (C z o s n o w s k i 1952) *Vitis vinifera* hodowanej *in vitro* od r. 1944 (szczep paryski G. M o r e l a). Tkanka ta w normalnych warunkach hodowli jest bezbarwna, nie zawiera żadnych dostrzegalnych ilości chlorofilu ani antocyjaniny. W pewnych warunkach (wysoka zawartość cukru w pożywce, wysokie ciśnienie osmotyczne pożywki, światło) tkanka winorośli obficie wytwarza antocyjaninę — prawdopodobnie oeninę, charakterystyczny barwnik antocyjanowy winorośli. (Na marginesie należy zaznaczyć, że obecnie

w r. 1954 opisany wyżej szczep tkanki stracił już zdolność syntezy antocyjanu. Zmiana ta idzie zapewne w parze z zaobserwowanymi zmianami anatomicznymi tkanki jak gdyby w kierunku tumorowacenia). Doświadczenia przeprowadzono na wiosnę r. 1952.

Zależność tworzenia się oeniny w tkance winorośli od światła ilustruje fakt, że na świetle dziennym (w oszklonej szafie w pokoju hodowlanym) produkcja barwnika w tkance wynosi przeszło 300% w porównaniu z tkanką rosnącą w ciemności. Stwierdzono przy tym, że ten wpływ światła nie idzie poprzez zwiększoną akumulację cukrów rozpuszczalnych w tkance. Analizy cukrowców w tkankach wykazały, że czynnikowi temu (tj. zwiększonej koncentracji cukrowców rozpuszczalnych w tkance) w żadnym przypadku nie można przypisać roli decydującej o ogromnie wzmożonej syntezie antocyjaniny na świetle. Niewątpliwie w samym procesie biogenezy oeniny w tkance winorośli zawarta jest jakaś reakcja fotochemiczna (S ł a b e c k a - S z w e y k o w s k a 1952).

Pożywka, na którą wyszczepiono tkanki do doświadczeń, posiadała następujący skład:

agar	10,00 g	Fe, Mn, J, Ni, Co, Ti, Zn Cu,
sacharoza	90,00 g	Be, B ślady* traces*
Ca (NO ₃) ₂	0,50 g	cysteina 10,0 mg
KNO ₃	0,25 g	tiamina 1,0 mg
KH ₂ PO ₄	0,25 g	kw. β-indolo-octowy 0,1 mg
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,25 g	H ₂ O 1000,0 ml

* Zmodyfikowany roztwór pierwiastków śladowych według Berthelota (Modified microelements solution after Berthelot) (S ł a b e c k a - S z w e y k o w s k a 1952).

Tkanki wyszczepiano do probówek długości 12 cm i 2 cm średnicy zawierających po 12 ml skośnie zastygłej pożywki. Do każdego doświadczenia użyto 24 hodowli ułożonych ukośnie na poziomym białym kole (ryc. 1).

Jako źródła światła użyto 500 W żarówek Tungsram. Poszczególne odcinki widma wyizolowano za pomocą trzech następujących filtrów żelatynowych:

- I Błękit patentowy 1,6
- II Zielen brylantowa 0,8 + tartrazyna 3,2
- III Róża bengalska 0,5 + erytrozyna 1,0 + tartrazyna 3,2.

Cyfry obok nazwy barwnika oznaczają ilość gramów barwnika przypadającą na 1 m² powierzchni filtru. Filtry przyrządzono przez wylewanie na płytki szklane o powierzchni 400 cm², 50 ml roztworu barwnika w 6% żelatynie. Po wyschnięciu płytki łączono po dwie, powierzchniami żelatynowymi ku sobie (H ü b l 1927). Przepuszczalność filtrów zbadaną w spektrofotometrze K ö n i g - M a r t e n s a ilustruje wykres na ryc. 2.

Ryc. 1. Użyte do doświadczeń hodowle tkanki *Vitis vinifera* in vitro
na skośnej pożywce
The experimental cultures of *Vitis vinifera* tissue in vitro

Ryc. 2. Krzywe przepuszczalności filtrów świetlnych
Transmission curves of the radiation filters

Doświadczenia przeprowadzono w komorach o wymiarach $50 \times 50 \times 135$ cm (ryc. 3). W celu ochrony filtrów i komór przed przegrzaniem oraz wyeliminowania z promieniowania lamp dalszej podczerwieni pomiędzy filtrami a lampami znajdowały się płaskie metalowe chłodnice ze szklanym dnem, przez które bez przerwy przepływała woda wodociągowa.

Ryc. 3. Komory doświadczalne: a — naświetlany materiał, b — filtry świetlne, c — chłodnice, d — żarówki

Experimental chambers: a — irradiated tissue material, b — dyed gelatin filters, c — water-cooling system, d — electric bulb lamps

Lampy znajdowały się w odległości ca 15 cm od filtrów. We wszystkich trzech komorach tkanki otrzymywały izoenergetyczne ilości światła o różnym spektralnym składzie. Ilość energii przechodzącą przez filtry naświetlane 500 W żarówkami Tungsram wyliczono z krzywej względnego rozkładu energii dla tych żarówek oraz z krzywych przepuszczalności filtrów, przy czym dla filtru czerwonego uwzględniono w obliczeniach jedynie zakres przepuszczalności do $7000 \text{ \AA}$, gdyż promieniowanie bardziej długofalowe przestaje być czynne fotochemicznie. Krzywą rozkładu energii dla żarówek otrzymano z pomiarów przeprowadzonych za pomocą monochromatora *Leissa* i termoelementu *Kippa*. Znając względne ilości energii przechodzącej przez filtry i oznaczywszy empirycznie zależność intensywności światła od odległości od żarówki, wyznaczono na tej podstawie dla poszczególnych filtrów odległości od źródła światła, w których powinny się znajdować tkanki, by ilość padającej na nie energii świetlnej (do $7000 \text{ \AA}$) była jednakowa.

Tkanki po wyszczepieniu na pożywkę przez tydzień trzymano w ciemności, następnie przez 4 tygodnie naświetlano je trzema wyżej wymienionymi rodzajami światła po 10 godzin na dobę. Po 4 tygodniach tkanki zważono, następnie pokrojono na nieco mniejsze kawałki i zalało na 24 godziny mieszaniną metanolu i $n/10 \text{ HCl}$ (w stosunku 5 : 1). Barwny wyciąg zlano, odwirowano i oznaczono kolorymetrycznie absorpcję światła

przez wyciąg antocyjaniny oraz pH wyciągu. Ilość oeniny wyliczono na podstawie krzywych zależności absorpcji światła przez oeninę od jej koncentracji i od pH (S ł a b ę c k a - S z w e y k o w s k a 1952).

WYNIKI I DYSKUSJA

Doświadczenie przeprowadzone w czasie od 5.II.52 — 13.III.52 dało następujące wyniki:

maksimum przepuszcz. filtru (max. transm. of the filter) Å	świeża masa (fresh weight) mg/kult.	oenina μ g/g św. m. (μ g/g fresh weight)
4 500	470	559
5 350	655	518
6 500	508	298

Wskazują one, że w procesie biogenezy oeniny w tkance winorośli najslabiej czynne jest światło czerwone w zakresie od 6000 Å. Najsilniej działa światło o zakresie 4000—5000 Å, niewiele zaś słabiej światło zielone o długości fali 5000—6000 Å.

Stwierdzono poprzednio, że światło wpływa hamująco na wzrost tkanki. Hamujący ten wpływ zaznacza się najbardziej w świetle niebieskim, następnie w czerwonym, a najslabiej w zielonym. W tym przypadku nie widać żadnej równoległości między dwoma efektami działania światła — wzrostem i produkcją antocyjaniny — choć w wypadku działania innych czynników równoległość ta jest często bardzo wyraźna (S ł a b ę c k a - S z w e y k o w s k a 1952).

Wyniki dotyczące produkcji oeniny podobne są do tych, jakie otrzymał Arthur (1932), naświetlając jabłka różnymi zakresami długości fali. Z jakościowych danych tego autora wynika, że w jabłkach czynny jest dla produkcji barwnika krótki ultrafiolet od 312 — 290 m μ i zakres widzialny od 600 — 400 m μ, przy czym największy wpływ mają promienie niebieskie, fioletowe i nadfioletowe. Zgodność ta wskazywałaby na podobieństwo fotobiologicznego mechanizmu syntezy antocyjaniny w jabłkach i w tkance winorośli hodowanej *in vitro*. Następnie fakty te wskazują, że substancja czynna w tym mechanizmie powinna posiadać zdolność pochłaniania światła w zakresie niebieskim, fioletowym i nadfioletowym (dla jabłek), a także i zielonym (dla tkanki *Vitis*).

Substancja pochłaniająca światło w tym zakresie i związana z tworzeniem się antocyjaniny w jabłkach jest prawdopodobnie żółta lub bezbarwna. Wyniki otrzymane dla tkanki winorośli świadczą, że także świa-

tło zielone z przedziału 5000 — 6000 Å jest czynne w procesie powstawania oeniny. Substancją pochłaniającą światło w tym zakresie jest sama oenina (maksimum absorpcji oeniny = 5200 Å, maksimum przepuszczalności użytego zielonego filtra = 5350 Å) tworząca się w niewielkiej ilości również bez udziału światła. W surowym wyciągu (metanol + HCl) z tkanki znajdują się także substancje pochłaniające światło fioletowe. Krzywa ekstynkcji dla wyciągu (ryc. 4) wykazuje maksimum absorpcji dla długości fali 5200 Å (maksimum oeniny), następnie opada nieco i wreszcie począwszy od 4200 Å znów wznosi się w górę. Świadczy to o obecności w wyciągu żółtych i bezbarwnych substancji pochłaniających światło fioletowe i nadfioletowe. Substancjami tymi mogą być związki flawonowe lub garbnikowe (typu katechiny), towarzyszące antocyjaninom, chemicznie z nimi blisko spokrewnione i prawdopodobnie pozostające z nimi w genetycznym związku (P a e c h 1950).

Za wysoką efektywność światła zielonego dla produkcji oeniny mogłaby więc być odpowiedzialna sama oenina, za efektywność światła zaś niebiesko-fioletowego — pochłaniające światło fioletowe i nadfioletowe żółte oraz bezbarwne związki spokrewnione chemicznie z antocyjaninami i towarzyszące im w tkance.

Panu prof. drowi J. C z o s n o w s k i e m u, kierownikowi Zakładu Fiziologii Roślin UP, składam serdeczne podziękowanie za cenne wskazówki oraz życzliwe zainteresowanie pracą. Kierownikowi Zakładu Chemii Fizycznej UP, panu prof. drowi A. G a ł e c k i e m u, dziękuję za pozwolenie wykonania niektórych pomiarów w jego Zakładzie. Panu magistrowi M. S o k o ł o w s k i e m u dziękuję również za wiele cennych rad przy przygotowaniu filtrów świetlnych.

Ryc. 4. Krzywe absorpcji oeniny (linia kropkowana) i wyciągu z tkanek (linia ciągła) oraz poziom syntezy oeniny w tkankach w różnych obszarach widma. Rzędne z lewej strony — ekstynkcja, z prawej strony — względna procentowa zawartość oeniny w tkankach

Absorption spectra of oenine (dotted line) and of the tissue extract (continual line) together with the oenine production in various wave bands. Ordinate: left — optical density, right — relative percentage production of oenine in various wave length regions

SUMMARY

The colourless „normal“ tissue of *Vitis vinifera* cultivated *in vitro* produces abundant anthocyanin if there is a great amount of sugar, preferably saccharose in a 9 p. c. concentration, in the medium. The anthocyanin synthesis is very distinctly dependent on light which, considering the absence of chlorophyll, may be connected with the photochemical character of the process of the anthocyanin synthesis in the tissue. Using 500 W Tungram electric bulbs as the source of light and isolating the particular regions of the spectrum with the aid of dyed gelatine filters (fig. 2), the influence of the wave length of light on the biogenesis of oenin in the tissue was investigated. It was found that the influence of blue-violet light is the strongest, of green light — not much weaker, while red light exerted only a very slight influence. The author compared the results with the curves of absorption of the pigment extract (with the aid of methanol with HCl) from the tissue (fig. 4) and showed that oenin alone could be responsible for the great effectiveness of green light for the production of oenin in the tissue; the effectiveness of blue-violet light, on the other hand, would be due to the violet and ultraviolet light absorbing yellow and colourless compounds chemically related with anthocyanins (flavone or tannin compounds of the catechine type) (Paech 1950).

Laboratory of Plant Physiology
of Poznań University

LITERATURA

- Arthur J. M., 1932, Red pigment production in apples by means of artificial light sources, „Contr. Boyce Thompson Inst.“ 4, 1 — 18.
- Czoznowski J., 1952, Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek *Vitis vinifera*: normalnej, tumora bakteryjnego (crown gall) i tumora chemicznego hodowanych *in vitro* (Physiological features of three types of tissue of *Vitis vinifera*: healthy, crown-gall and chemical tumor, cultivated *in vitro*). Prace Kom. Biol. Pozn. Tow. Przyj. Nauk, XIII, 189—208.
- Eddy B. P. and Mapson L. W., 1951, Some factors affecting anthocyanin synthesis in cress seedlings, „Bioch. Journ.“ 49, 694 — 699.
- Hübl A., 1927, Die Lichtfilter, Halle, Wilhelm Knapp.
- Karstens W. K. H., 1939, Anthocyanin and anthocyanin formation in seedlings of *Fagopyrum esculentum* Moench. „Rec. Trav. Bot. Neerlandais“, 36, 85 — 179.
- Molisch H., 1928, Rote Wurzelspitzen, „Ber. Dt. Bot. Ges.“, 46, 311 — 317.
- Overton E., 1899, Beobachtungen und Versuche über das Auftreten von rotem Zellsaft bei Pflanzen, „Jahrb. wiss. Bot.“, 33, 171 — 231.
- Paech K., 1950, Biochemie und Physiologie der sekundären Pflanzenstoffe, Berlin, 189 — 200, Springer-Verlag.
- Słabecka-Szweykowska A., 1952, Warunki tworzenia się antocyjanu w tkance *Vitis vinifera* hodowanej *in vitro* (On the conditions of anthocyanin formation in the *Vitis vinifera* tissue cultivated *in vitro*). „Acta Soc. Bot. Poloniae“ XXI, 537 — 576.

Thimann K. V. i Edmondson Y. H., 1949, The biogenesis of the anthocyanin
I. General nutritional conditions leading to anthocyanin formation, „Arch.
Biochem“, 22, 33 — 53.

Withrow R. B., Klein W. H., Price L. and Elstad V., 1953, Influence of
visible and near infrared radiant energy on organ development and pigment
synthesis in bean and corn, „Plant Physiol.“, 28, 1 — 14.