

© Є. І. Шнюкова, О. М. Недуха

Інститут ботаніки ім. М. Г. Холодного НАН України, Київ

ВПЛИВ ІМІТОВАНОЇ МІКРОГРАВІТАЦІЇ НА ФОРМУВАННЯ ЗАПАСНИХ ПОЛІСАХАРИДІВ МІНІ-БУЛЬБ КАРТОПЛІ

Імітація мікрогравітації суттєво впливала на метаболізм запасних полісахаридів міні-бульб картоплі. При тривалому клиностатуванні спостерігали підвищення синтезу, накопичення крохмалю та збільшення активності фосфорилази. В той же час вміст моно- та дисахаридів знижувався, що свідчило про інтенсифікацію їхнього використання для синтезу крохмалю. Відмічено кореляцію між збільшенням активності фосфорилази та зростанням вмісту крохмалю.

Мікрогравітація здійснює суттєвий вплив на ріст і розвиток рослин [6], зокрема на формування їхніх запасальних органів, прискорюючи їхнє утворення, збільшення розмірів, спричиняючи морфологічні зміни клітин [7, 9]. Враховуючи, що умови мікрогравітації можуть впливати на окремі сторони метаболізму рослинних організмів, в тому числі на формування запасних поліглюканів, метою даної роботи було дослідження впливу імітованої мікрогравітації на розвиток та деякі аспекти вуглеводного обміну міні-бульб картоплі. Аналізувалось формування маси міні-бульб, їхня оводненість, вміст низькомолекулярних вуглеводів — моно- та дисахаридів, запасного поліглюкану — крохмалю в сухій і сирій біомасі, а також у кожній окремій бульбі у процесі формування бульб та в різні періоди року. Прослідковувались зміни активності, електрофоретичної гетерогенності ферменту обміну крохмалю — фосфорилази, однією з функцій якої поряд з гідролітичною спрямованістю є каталіз синтезу одного з компонентів крохмалю — амілози шляхом глюкозильного переносу з глюкозо-1-фосфату.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Об'єктом досліджень були міні-бульби картоплі (*Solanum tuberosum* L., сорт Адрета), які вирощувались в умовах імітованої мікрогравітації (горизонтальне клиностатування в режимі 2 об/с) та стаціонарного контролю. Біомаса аналізувалась в процесі формування бульб на 10-ту та 30-ту добу в різні періоди року. Вміст моно- і дисахаридів, крохмалю в міні-бульбах картоплі визначали фотометрично антроновим методом за Болотовою та ін.

[1]. Активність фосфорилази досліджували згідно з методикою, викладеної в роботі [3] з наступним визначенням кількості фосфору колориметрично за утворенням «молібденової сині» за [4]. Активність фосфорилази виражали в мкМ фосфору, який вивільнявся з глюкозо-1-фосфату за 1 хв при температурі $t = 37^\circ\text{C}$ на 1 г сирій або сухої маси, а також на 1 мг білку. Для характеристики ізоферментів фосфорилази застосовували вертикальний пластинчатий електрофорез в поліакриламідному гелі. Індикатором фронту служив бромфеноловий синій. Синтетична реакція ферменту здійснювалась шляхом полімеризації в гель як «затравки» глікогену або крохмалю [5]. Розраховувалась відносна електрофоретична рухливість ізоферментів (Rf). Білок визначали за методом Лоурі та ін. [8], сира та суха маса бульб, ступінь їхньої оводненості — ваговим методом. Аналізувались параметри маси та біохімічні показники 8—26 міні-бульб. Біохімічні дослідження проводились в 3—10 паралельних повторностях. Здійснювалась статистична обробка даних, достовірність різниці середніх показників вираховувалась згідно з критерієм Стьюдента з вірогідністю 95 і 99 %.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Встановлено поступове зростання вмісту крохмалю у процесі формування міні-бульб картоплі від 10-ї до 30-ї доби їхнього росту. Інтенсивність цього процесу переважала в умовах імітованої мікрогравітації порівняно із стаціонарним контролем. Так, якщо в бульбах контрольного варіанту на 30-ту добу відкладалось 57.27 ± 1.09 % крохмалю в розрахунку на суху масу, то при клиностатуванні

Таблиця 1. Вплив імітованої мікрогравітації на вміст вуглеводів та біомаси у 10- та 30-денних міні-бульбах картоплі

Показники	Вік міні-бульб картоплі, доби			
	10		30	
	контроль	клинонстатування	контроль	клинонстатування
Маса однієї міні-бульби, мг: суха	8.44±1.25	5.72±0.38	12.96±1.80	8.28±0.84
сира	29.50±5.51	24.78±2.51	42.00±6.63	29.80±2.80
Суха маса, %	28.64	23.09	30.85	27.80
Вода, %	71.36	76.91	69.15	72.20
Моно-, дисахариди, %				
сухої маси,	5.83±0.12	7.61±0.09*	5.01±0.24	3.20±0.16*
сирої маси,	1.67±0.04	1.83±0.01*	1.54±0.07	0.89±0.05*
Однієї бульби, мг	0.492	0.435	0.649	0.264
Крохмаль, %				
сухої маси,	46.02±0.72	65.96±0.95*	57.27±1.09*	70.90±1.49*
сирої маси,	12.71±0.59	15.10±0.79*	17.69±0.34*	19.95±0.54*
Однієї бульби, мг	3.880	3.760	7.422	5.873

* $P < 0.001$

Таблиця 2. Вплив імітованої мікрогравітації на вміст вуглеводів у 30-денних міні-бульбах картоплі

Вуглеводи	Період вирощування міні-бульб					
	контроль			клинонстат		
	травень	червень	жовтень	травень	червень	жовтень
Моносахариди та дисахариди, %						
сухої маси,	4.78±0.11	5.01±0.24	4.79±0.27	4.05±0.24	3.20±0.16	3.87±0.22
сирої маси	1.49±0.04	1.54±0.07	0.73±0.08	1.11±0.06	0.89±0.05	0.88±0.04
Крохмаль, %						
сухої маси	55.18±1.70	57.27±1.09	68.36±2.07	46.46±1.74	70.93±1.49	78.85±1.56
сирої маси	17.26±0.53	17.69±0.34	11.53±0.42	12.78±0.48	19.95±0.54	18.21±0.30

цей показник був суттєво вищим -70.90 ± 1.49 %.

Протилежний процес відбувався в акумулюванні низькомолекулярних незв'язаних у полімерах моно- та дисахаридів, які є субстратами синтезу крохмалю: з віком міні-бульб за обох режимів вирощування їхній вміст зменшувався. Цей процес активніше відбувався в умовах імітованої мікрогравітації, і на 30-ту добу за цих умов бульби містили лише 3.20 ± 0.16 % моно- і дисахаридів порівняно з 5.01 ± 0.24 % в контролі (табл. 1). Ця тенденція підтверджується також даними щодо суттєвого зростання з віком міні-бульб відношення вмісту крохмалю до кількості моно- і дисахаридів. Якщо на 10-ту добу цей показник становив 7.89 в контролі та 8.66 за умов імітованої мікрогравітації, то на 30-ту добу різниця між варіантами зростає майже вдвічі: 22.16 при клинонстатуванні та 11.43 в контролі.

Результати аналізів бульб 30-денного віку, вирощених при клинонстатуванні в період від травня до жовтня, свідчили про зменшення їхньої сухої маси

з 27.50 до 22.49 %. В умовах стаціонару зменшення сухої маси бульб було суттєвішим — з 31.29 до 17.06 %. Аналогічні дані одержані при порівнянні бульб 10-денного віку, вирощених в квітні та у вересні. Ці бульби навесні характеризувались вищим рівнем сухої маси порівняно з початком осені. У бульбах 30-денного віку за обох режимів вирощування відкладання крохмалю в сухій масі інтенсифікувалось восени, проте при клинонстатуванні цей процес починався раніше і був активнішим (табл. 2).

Паралельно в міні-бульбах, вирощених за умов імітованої мікрогравітації протягом 10 діб та 30 діб, досліджувалась активність фосфорилази — ферменту обміну запасних полісахаридів. Результати біохімічного аналізу фосфорилазної активності свідчать про те, що за обох режимів культивування з віком бульб вона достовірно зростала, що забезпечувало синтез та констатоване в даних дослідів зростання пулу крохмалю. Слід зазначити, що під час формування бульб в режимі імітованої мікро-

Таблиця 3. Вплив імітованої мікрогравітації на активність фосфорилази у міні-бульбах картоплі

Показники	Вік міні-бульб картоплі, доби			
	10		30	
	контроль	клиностакування	контроль	клиностакування
Маса однієї міні-бульби, мг:				
Суха	1.72±0.31	1.58±0.15	6.52±1.09	4.47±0.52
Сира	7.61±1.76	7.42±0.55	21.94±4.72	15.88±2.03
Суха маса, %	20.16	21.21	22.40	28.18
Вода, %	79.84	78.79	77.56	71.82
Активність фосфорилази: мкМ	4.129±0.171	5.290±0.227*	6.651±0.359*	9.372±0.260*
Р/г сухої маси/ хв мкМ	0.830±0.036	1.121±0.048*	1.498±0.078*	2.664±0.073*
Р/г сирої маси/ хв мкМ	0.158±0.008	0.168±0.008	0.065±0.003*	0.113±0.004*
Білок, мг/г				
Сухої маси	26.30±1.91	31.45±0.36	104.60±0.80	83.50±3.83*
Сирої маси	5.29±0.39	6.67±0.07***	23.20±1.20	23.50±0.89

* — $P < 0.001$; ** — $P < 0.01$; *** — $P < 0.05$

гравітації активність фосфорилази була вищою, ніж в контролі. Так, на 10-ту добу в умовах клиностакування цей фермент каталізував звільнення 5.290 ± 0.227 мкМ фосфору за 1 хв з ефіру Корі на 1 г сухої маси, в той час як аналогічний показник в умовах контролю складав 4.129 ± 0.171 мкМ. На 30-ту добу ця різниця стала більшою: 9.372 ± 0.260 та 6.651 ± 0.359 мкМ відповідно, що свідчило про інтенсифікацію в цих умовах процесу синтезу та відкладання в бульбах крохмалю (табл. 3).

Відомо, що фосфорилаза є у клітинах різних організмів у вигляді великої кількості молекулярних форм, що є сумішшю субодиниць, що кодуються різними генами. Показано також, що фосфорилаза, виділена з картоплі, є димером і не асоціює на мономери. Висунуто припущення, що фосфорилазам рослин не властиві складні шляхи регуляції на рівні четвертинної структури, як характерні ферментам тваринних тканин [8].

При дослідженні міні-бульб картоплі показано, що електрофоретичний спектр фосфорилази характеризується невисокою гетерогенністю. В екстрактах виявлено дві ізофосфорилази, які різняться за місцем знаходження на фореграмах, а отже за молекулярною масою білку і його зарядом: малорухливу (Rf 0.14), і анодну меншої молекулярної маси (Rf 0.36), в якій була сконцентрована максимальна фосфорилазна активність. Гістохімічний аналіз природи продуктів фосфорилазної реакції засвідчив наявність інтенсивного темносинього забарвлення реактивом J-KJ цих множинних молекулярних форм фосфорилази. Це вказувало, по-перше, на те, що в даних ділянках спектру була сконцентрована фосфорилазна активність синтетичної спрямованості, в результаті чого відбулось суттєве збільшення кількості лінійної фракції запасного поліглюкану — амілози. Вірогідно, це відбувається шляхом перене-

сення глюкозидного залишку з глюкозо-1-фосфату в напрямку молекул затравки вуглеводної природи, заполімеризованої в гель. По-друге, згідно з гістохімічним аналізом з віком бульб активність фосфорилази цих форм зонах зростала і суттєво переважала в умовах імітованої мікрогравітації.

Біохімічні дослідження активності фосфорилази і електрофоретичний аналіз її множинних молекулярних форм міні-бульб картоплі, сформованих в умовах імітації мікрогравітації, свідчили про те, що цей режим вирощування сприяв інтенсивнішому відкладанню крохмалю у бульбах як енергетичного резерву клітин.

Крохмаль, який нагромаджується в листках у процесі фотосинтезу, може швидко перетворюватися в дисахариди. Останні є найважливішою транспортною формою, у вигляді якої вуглеводи перетікають з листка у бульби, де знову використовуються у процесі синтезу крохмалю. Отримані результати вказують на стимуляторний вплив імітованої мікрогравітації на процес використання низькомолекулярних моно- і дисахаридів для синтезу та наступного відкладання крохмалю в запальних органах картоплі.

ВИСНОВКИ

У процесі формування міні-бульб картоплі (*Solanum tuberosum* L.) сорту Адрета до 30-ї доби показано поступове зростання вмісту крохмалю переважно в умовах імітованої мікрогравітації порівняно з стаціонарним контролем. З віком міні-бульб при обох режимах зменшувався вміст моно- та дисахаридів, які є субстратами синтезу крохмалю.

Встановлена тенденція до активнішого накопи-

чення запасних поліглюканів при культивуванні міні-бульб в умовах клиноштатування в осінній період. Протилежна закономірність спостерігається при аналізі низькомолекулярних вуглеводів, вміст яких восени зменшується.

Показана електрофоретична гетерогенність фосфорилази, яка у процесі формування міні-бульб мала синтетичну спрямованість. Ізоензими фосфорилази мають здатність синтезувати з глюкозо-1-фосфату при наявності затравки лінійний поліглюкан амілозу. Виявлено дві ізофосфорилази: мало-рухливу (Rf 0.14) і анодну (Rf 0.36). З віком бульб інтенсивність фосфорилазної активності цих зон зростала і суттєво переважала в умовах імітованої мікрогравітації.

Біохімічні дослідження активності фосфорилази поряд з гістохімічним аналізом її ізоформ вказують на зростання фосфорилазної активності біомаси міні-бульб у процесі їхнього формування та відкладання крохмалю з переважанням в умовах клиноштатування. Встановлена пряма залежність між рівнем активності фосфорилази та кількістю крохмалю в бульбах.

Отримані результати вказують на стимуляторний вплив імітованої мікрогравітації на процес використання низькомолекулярних моно- і дисахаридів для синтезу та наступного відкладання крохмалю в запасальних органах картоплі.

1. Болотова В. Ц., Саканян Е. И., Лесиовская Е. Е. и др. Спектрофотометрический метод определения содержания полисахаридов в листьях *Tilia cordata* Mill // Растительные ресурсы.—2001.—37, вып. 3.—С. 109—112.
2. Вульфсон П. А., Алексахина Н. В. Структура и функция фосфорилазы // Структура и функция ферментов. — М.: Наука, 1972.—С. 60—82.

Наука, 1972.—С. 60—82.

3. Ермаков А. И., Арасимович В. В., Ярош Н. П. и др. Методы биохимического исследования растений / Под ред. А. И. Ермакова: 3-е изд. — Л.: Агропромиздат, 1987.—430 с.
4. Родионов В. С., Холопцева Н. П. Определение фосфолипидов листьев растений с помощью двумерной хроматографии в тонких слоях силикогеля // Физиология и биохимия культурных растений.—1974.—6, № 2.—С. 67—87.
5. Gerbrandy S. J., Verleur J. D. Phosphorylase isoenzymes: localization and occurrence in different plant organs in relation to starch metabolism // Phytochemistry.—1971.—10, N 2.—P. 261—266.
6. Kordyum E. Biology of plant cells in microgravity and under clinostating // Int. Rev. Cytol.—1997.—171.—P. 1—78.
7. Kordyum E., Baranenko V., Nedukha O., Samoilo V. Development of potato minitubers in microgravity // Plant Cell Physiol.—1997.—38.—P. 1111—1117.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. I. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.—1951.—193, N 1.—P. 265—275.
9. Nedukha O. M., Schnyukova E. I., Leach J. E. High phosphorylase activity is corrected with increased potato minituber formation and starch content during extended clinorotation // Adv. Space Res.—2003.—31, N 10.—P. 2245—2251.

THE INFLUENCE OF SIMULATED MICROGRAVITY ON THE FORMATION OF STORAGE POLYSACCHARIDES OF POTATO MINITUBERS

Ye. I. Shnyukova, O. M. Nedukha

A simulated microgravity influenced essentially the metabolism of storage polysaccharides of the potato minitubers. An increase of synthesis and accumulation of starch and an enhancement of phosphorylase activity were observed in the minitubers during a long-term clinorotation. At the same time the mono- and disaccharides content decreased, which pointed to the intensification of their utilization for starch synthesis. The correlation between the enhancement of enzyme activity and the increase of starch content is revealed.