

ALEKSANDRA DĄBROWSKA

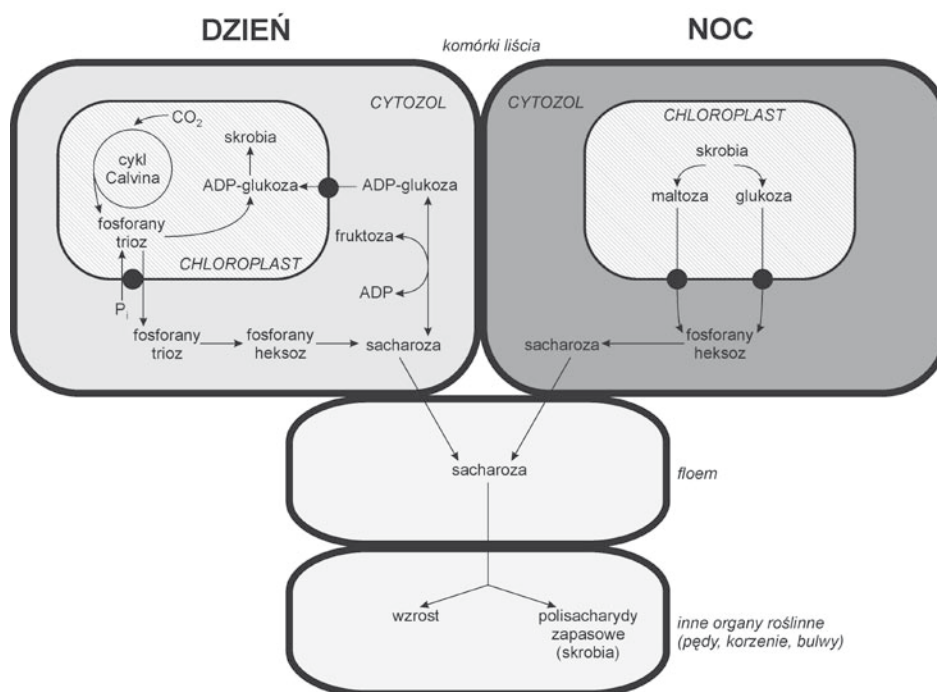
*Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin
 Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
 Uniwersytet Jagielloński
 Gronostajowa 7, 30-387 Kraków
 E-mail: dab_ola@yahoo.com*

DROGI ROZKŁADU SKROBI W ROŚLINACH

W procesie fotosyntetycznej asymilacji dwutlenku węgla powstają dwa główne produkty końcowe: sacharoza i skrobia. Losy tych produktów w roślinie przedstawiono na Ryc. 1. Sacharoza, oligosacharyd wytwarzany w cytozolu komórek liścia, jest transportowana do innych części rośliny i tam wykorzystywana w procesach metabolicznych. Natomiast nadwyżka węgla zasymilowanego w procesie fotosyntezy w ciągu dnia magazynowana jest w chloroplastach w formie skrobi. W nocy, gdy nie zachodzi fotosynte-

za, zgromadzona skrobia ulega rozkładowi i wykorzystywana jest przez roślinę na potrzeby energetyczne.

Skrobia stanowi główny materiał zapasowy roślin wyższych. Występuje ona nie tylko w chloroplastach, gdzie akumulowana jest przejściowo, aby dostarczać roślinie w okresie ciemności substratów energetycznych (tzw. skrobia przejściowa), ale również w tkankach nieaktywnych fotosyntetycznie. W tych tkankach gromadzi się ona w bezbarwnych plastydach – leukoplastach. Jeżeli zawierają one



Ryc.1. Wytwarzanie i degradacja skrobi w roślinie (wg TAIZA i ZEIGERA 2006, zmodyfikowana).

bardzo dużą ilość skrobi nazywane są amyloplastami. Przykładami organów o dużej zawartości skrobi mogą być m. in. bulwy ziemniaka lub ziarniaki zbóż. Skrobia zgromadzona w organach spichrzowych takich jak bulwy czy korzenie stanowi rezerwę energetyczną, która pomaga roślinie przetrwać w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Skrobia zapasowa w nasionach jest natomiast źródłem węgla dla młodych, kiełkujących roślin.

Pod względem struktury chemicznej skrobia jest homoglikanem zbudowanym z reszt α -D-glukozy (TETLOW i współaut. 2004, KOPCEWICZ i LEWAK 2005, SAMOJEDNY i ORZECOWSKI 2007). Występuje w dwóch formach: amylozy i amylopektyny. Amyloza jest liniowym polimerem reszt glukozy połączonych wiązaniami α -1,4-glikozydowymi. W amylopektynie występują dodatkowo wiązania α -1,6-glikozydowe, co powoduje powstanie struktury rozgałęzionej. Skrobia nie ma ustalonej masy cząsteczkowej, gdyż liczba reszt glukozy w pojedynczej cząsteczce może się wahać od kilkuset (amyloza) do kilkunastu tysięcy (amylopektyna). W plastydach skrobia tworzy nierozpuszczalne ziarna (granule) o złożonej strukturze. Występują w nich naprzemiennie warstwy o charakterze półkryształicznym i amorficznym. Ziarna skrobi zawierają zazwyczaj ok. 75% amylopektyny. To właśnie ta forma odpowiada za powstawanie struktur półkryształicznych. Odpowiednie rozmieszczenie rozgałęzień i długość łańcuchów bocznych umożliwił cząsteczkom amylopektyny formowanie podwójnych helis i tworzenie uporządkowanych układów. Ziarna skrobi mają średnicę od 0,1 do 50 μ m. Na ich powierzchni występują struktury (wgłębienia, kanały) umożliwiające dostęp enzymom biorącym udział w rozkładzie skrobi.

Synteza skrobi przebiega w stromie chloroplastów i jest złożonym procesem, na który składają się trzy kolejne etapy: inicjacja, elongacja i terminacja (TETLOW i współaut. 2004, KOPCEWICZ i LEWAK 2005, TAIZ i ZEIGER 2006). Pierwszy i ostatni z nich są dotychczas słabo poznane. Etap elongacji polega na przyłączaniu do istniejącej już cząsteczki skrobi cząsteczek ADP-glukozy. Związek ten powstaje na drodze kilku przemian enzymatycznych z metabolitu pośredniego cyklu

Calvina-Bensona: 6-fosfofruktozy. Enzymem katalizującym reakcję wydłużania łańcucha skrobiowego jest syntaza skrobi, występująca w licznych izoformach. Można je podzielić na dwie główne grupy: enzymy biorące udział w syntezie amylozy (związane z ziarnem skrobi) oraz biorące udział w syntezie amylopektyny. Powstawanie amylopektyny wymaga dodatkowo wprowadzania wiązań α -1,6-glikozydowych. Rolę tę pełnią enzymy rozgałęziające, które przyłączają krótkie fragmenty łańcucha skrobiowego do grupy hydroksylowej atomu węgla znajdującego się w pozycji 6. w reszcie glukozy, w istniejącej już cząsteczce skrobi. Paradoksalnie, istotną rolę w syntezie skrobi pełnią również enzymy usuwające rozgałęzienia (hydrolizujące wiązania α -1,6-glikozydowe): izoamylazy i pullulanaza (dekstrynaza graniczna). Ich dokładne działanie nie jest jeszcze dobrze poznane, udowodniono jednak, iż brak tych enzymów powoduje zaburzenia w syntezie skrobi. Być może ich rola polega na usuwaniu nieprawidłowo umiejscowionych rozgałęzień w cząsteczkach amylopektyny. Wyżej wymienione enzymy biorące udział w syntezie skrobi występują w postaci wielobiałkowych kompleksów. Zwiększa to wydajność syntezy polisacharydu, ułatwia osiągnięcie odpowiedniej struktury przestrzennej i chroni przed działaniem enzymów rozkładających skrobię.

Synteza skrobi podlega precyzyjnej regulacji (TETLOW i współaut. 2004, KOPCEWICZ i LEWAK 2005). Regulacja ta dotyczy przede wszystkim wyboru pomiędzy dwoma konkurencyjnymi procesami: syntezą skrobi i sacharozy. O tym, który z tych szlaków zostanie uruchomiony decyduje stężenie nieorganicznego fosforanu oraz 2,6-bisfosfofruktozy w cytozolu. Sam proces syntezy skrobi jest regulowany allosterycznie przez fosfoglicerynian i fosforan nieorganiczny. Są one odpowiednio aktywatorem i inhibitorem adenylilotransferazy glukozofosforanowej (pirofosforylasy ADP-glukozy, ADPGPazy), enzymu katalizującego syntezę ADP-glukozy. Aktywność syntazy skrobiowej jest natomiast zależna od obecności jonów K^+ . Istnieją ponadto inne drogi regulacji aktywności enzymów biorących udział w syntezie skrobi, takie jak zmiana potencjału redoks i fosforylacja białek.

ROZKŁAD SKROBI PRZEJŚCIOWEJ

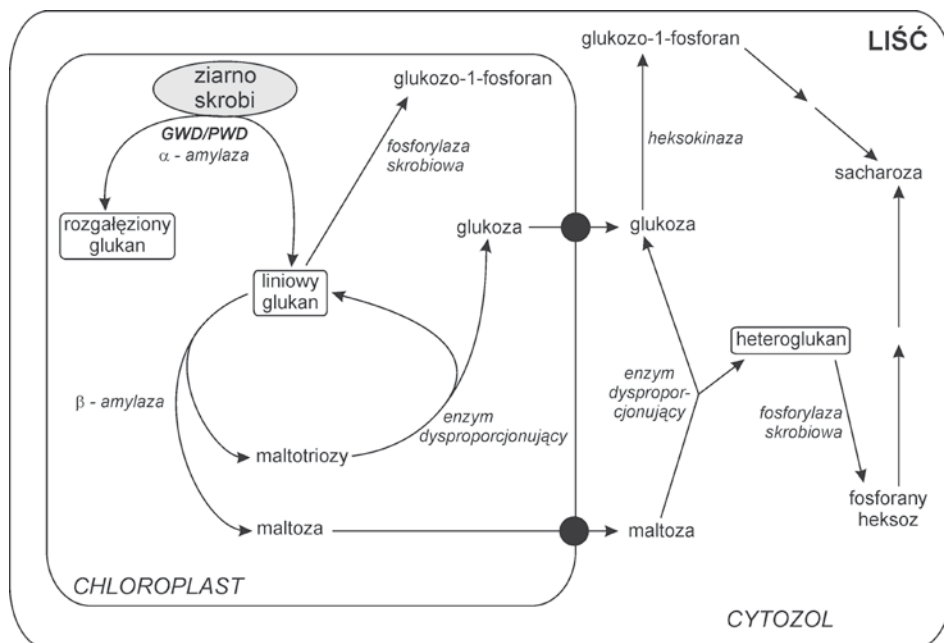
Synteza i rozkład skrobi w chloroplastach zachodzą cyklicznie. Skrobia zgromadzona w

chloroplastach w ciągu dnia jest w nocy degradowana, by dostarczyć roślinie substratów

energetycznych oraz szkieletów węglowych do syntezy innych związków. Niemal cały zakumulowany w dzień zapas skrobi ulega wówczas rozkładowi, a tempo degradacji jest tak dostosowane, by w nocy zapewnić ciągłe wytwarzanie fosforanów heksoz.

Proces rozkładu skrobi jest dotychczas słabiej poznany niż jej synteza. Wielu informacji dostarczyły jednak doświadczenia przeprowadzane na mutantach rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) z wyciszonymi genami kodującymi enzymy biorące udział w rozkładzie skrobi (TETLOW i współaut. 2004, SMITH i współaut. 2005, MCMANUS i PLAXTON 2006, TAIZ i ZEIGER 2006, SAMOJEDNY i ORZECZOWSKI 2007). To właśnie w tej roślinie metabolizm skrobi jest najlepiej scharakteryzowany. Rozkład skrobi przebiega dwuetapowo. Zostaje on zapoczątkowany przez hydrolityczny atak na ziarno skrobi, a następnie postępuje rozkład łańcuchów polisacharydowych do mniejszych cząsteczek. Reakcje rozkładu skrobi przejściowej przedstawiono na Ryc. 2. Do rozpoczęcia rozkładu skrobi konieczna jest jej wcześniejsza fosforylacja. Dokonują jej dwa enzymy: GWD – dikinaza glukan, woda (nazwa systematyczna: fosfotransferaza ATP: glukan, woda) oraz PWD – dikinaza fosfoglukan, woda (nazwa systematyczna: fosfotransferaza ATP: fosfoglukan, woda). Pierwszy z nich jest związany z ziarnem skrobi i odpowiedzialny za reakcję przeniesienia reszty β -fosforanowej z ATP na węgiel w pozycji 6. lub 3. reszty gluko-

zowej w łańcuchu skrobi (preferencyjnie fosforylowana jest amylopektyna). W reakcji tej powstaje ponadto po jednej cząsteczce wolnego fosforanu i AMP. PWD przenosi natomiast resztę fosforanową na węgiel w pozycji 3., działa jednak wyłącznie na cząsteczki amylopektyny uprzednio ufosforylowane przez GWD. Specyficzność substratowa tych dwóch enzymów jest prawdopodobnie uwarunkowana różnicami w budowie ich N-końcowych domen, które odpowiadają za wiązanie cząsteczki poliglukanu. Fosforylowane reszty glukozy stanowią tylko ok. 0,1% wszystkich reszt w cząsteczkach skrobi. Wykazano jednak, że fosforylacja skrobi jest warunkiem koniecznym do jej degradacji. Nie wiadomo natomiast co dzieje się z wprowadzonymi grupami fosforanowymi podczas dalszego rozkładu skrobi. Hydrolityczny atak na ziarna skrobi zapoczątkowują α -amylazy. Są to endoamylazy, czyli enzymy hydrolizujące wiązania α -1,4-glikozydowe znajdujące się wewnątrz cząsteczki skrobi. Z powierzchni granuli α -amylazy uwalniają rozpuszczalne łańcuchy poliglukanów, które są następnie rozkładane przez inne enzymy. Wykazano jednak, iż α -amylazy nie są niezbędne do zapoczątkowania degradacji skrobi. W mutantach *Arabidopsis* pozbawionych wszystkich trzech izoform tego enzymu proces ten nie był zaburzony. Oznacza to, iż inne enzymy mogą rekompensować ich brak. Uwolnione z granuli skrobi rozpuszczalne, liniowe lub rozgałęzione glukany są rozkładane przez



Ryc. 2. Rozkład skrobi przejściowej w liściach.

enzymy znajdujące się w stromie chloroplastu. Istnieją dwie alternatywne drogi ich degradacji. Pierwsza i podstawowa, to rozkład glukanów przez β -amylazy. Są to egzoamylazy, czyli enzymy katalizujące reakcję odłączania cząsteczek β -maltozy od nieredukującego końca łańcucha glukanu. W wyniku działania tych enzymów powstają również niewielkie ilości maltotrioz, gdyż β -amylazy mogą rozkładać jedynie łańcuchy cukrowe zbudowane z co najmniej czterech reszt glukozy. Znacznie rzadziej rozkład rozpuszczalnych glukanów zachodzi z udziałem chloroplastowej fosforylasy skrobiowej. Enzym ten odłącza cząsteczki glukozo-1-fosforanu od łańcucha glukanu. Z glukozo-1-fosforanu powstają fosforany trioz, które są transportowane do cytozolu przez specyficzny przenośnik. Aktywność fosforylasy skrobiowej nie jest jednak konieczna do prawidłowego rozkładu skrobi. Do całkowitej degradacji rozgałęzionych glukanów uwolnionych z ziaren skrobi niezbędne jest jeszcze usunięcie wiązań α -1,6-glikozydowych. Dokonują tego enzymy usuwające rozgałęzienia, te same, które uczestniczą w syntezie skrobi: izoamylazy i pullulanaza. W *Arabidopsis* występują trzy izoformy izoamylaz. Dwie z nich, ISA1 i ISA2, biorą udział w syntezie skrobi, natomiast trzecia, ISA3, w jej rozkładzie. Wykazano także, iż β -amylazy wraz z izoamylazą ISA3 mogą działać na powierzchni granul, zastępując aktywność α -amylaz.

Głównym produktem powstającym podczas rozkładu skrobi w chloroplastach jest β -maltoza. Jest ona przenoszona do cytozolu przez przenośnik MEX1 i tam ulega dalszym przemianom. Maltoza ulega reakcji transglukozydacji katalizowanej przez enzym dysproporcjonujący (D-enzym). Jedna cząsteczka glukozy uwolniona z maltozy jest przyłączana do cytozolowego rozpuszczalnego heterogluukanu (zbudowanego m. in. z glukozy, arabinozy, galaktozy, ramnozy, ksylozy i mannozy), a druga uwalniana do cytozolu. Tam jest fosforylowana przez heksokinazę, a następnie wykorzystywana w różnych przemianach metabolicznych, m. in. w syntezie sacharozy. Cytozolowy heterogluukan może być z kolei rozkładany przez cytozolową fosforylase skrobiową. Powstające w chloroplastach podczas degradacji skrobi maltotriozy są metabolizowane przez α -1,4-glukanotransferazę (enzym dysproporcjonujący). W katalizowanej przez ten enzym reakcji, z dwóch cząsteczek maltotriozy powstaje po jednej cząsteczce maltopentozy i glukozy. Maltopentoza może ulec rozkładowi przez β -amylazę, a glukoza jest

transportowana do cytozolu przez przenośnik znajdujący się w błonie chloroplastu.

Jak już wspomniano, jedynie w *Arabidopsis* metabolizm skrobi został całościowo poznany. Wyniki licznych badań wskazują na to, iż w liściach innych gatunków roślin rozkład skrobi przejściowej przebiega bardzo podobnie, jednakże wykazano również pewne różnice (SMITH i współaut. 2005). Mogą one występować nie tylko pomiędzy różnymi gatunkami, lecz także w obrębie jednego gatunku, w zależności od stadium rozwojowego i warunków środowiska. Rośliny mogą się przede wszystkim różnić ilością gromadzonej skrobi. Niektóre gatunki wytwarzają jej bowiem bardzo niewiele, a rezerwę energetyczną na okres ciemności stanowi sacharoza rozpuszczona w soku wakuolarnym lub fruktany (w trawach). W liściach innych roślin zawartość skrobi może zmieniać się z wiekiem. Tak jest np. w tytoniu (*Nicotiana tabacum*). W młodych liściach obserwuje się duże wahania dobowe zawartości skrobi (co oznacza, że jest rozkładana w nocy), natomiast w starszych liściach coraz mniej skrobi jest degradowanej w okresie ciemności, a jej całkowita zawartość wzrasta. Dopiero w okresie starzenia zgromadzona w liściach skrobia jest rozkładana, a uwolnione cukry są transportowane do innych części rośliny. U wielu roślin zidentyfikowano bardzo podobny zestaw enzymów biorących udział w rozkładzie skrobi. Są to endoamylazy, lecz podobnie jak w *Arabidopsis*, nie wykazano, by były one niezbędne do zapoczątkowania hydrolitycznego ataku na ziarna skrobi. Natomiast powszechne występowanie dikinazy glukan, woda wskazuje na to, iż proces ten przebiega podobnie u większości gatunków. Rośliny różnią się aktywnością enzymów usuwających rozgałęzienia w łańcuchach glukanów uwolnionych z ziaren skrobi. W kukurydzy (*Zea mays*) kluczowym enzymem w tym procesie jest pullulanaza, a nie jedna z izoamylaz, jak w *Arabidopsis*. Poszczególne gatunki różnią się ponadto względnym udziałem β -amylaz i fosforylasy skrobiowej w degradacji skrobi. Istnieją też pewne odstępstwa od reguły jeżeli chodzi o metabolizm maltozy. W ziemniaku (*Solanum tuberosum*) transglukozydaza rozkładająca maltozę działa w chloroplastach, natomiast w chloroplastach liści grochu zidentyfikowano fosforylase maltozy rozkładającą ten dwucukier na glukozo-1-fosforan i glukozę.

Rozkład skrobi, jako proces cykliczny, podlega złożonej regulacji (TETLOW i współaut. 2004, LU i współaut. 2005, SMITH i współaut.

aut. 2005, McMANUS i PLAXTON 2006, SAMOJEDNY i ORZECZOWSKI 2007). Zachodzi on w cyklu dobowym, a zatem jest ściśle związany z długością dnia i nocy. Doświadczenia przeprowadzone na *Arabidopsis* wykazały, iż zmiana długości fotoperiodu natychmiast powoduje takie dostosowanie tempa rozkładu skrobi, by było ono równomierne w ciągu całej nocy. Tempo degradacji jest zatem zależne od ilości skrobi zgromadzonej w liściu w ciągu dnia. Sposób kontroli tego zjawiska nie jest znany, proponuje się jednak dwie możliwe drogi: regulacja tempa rozkładu skrobi na podstawie poziomu glukozy i sacharozy pod koniec dnia lub też bezpośrednio na podstawie długości dnia (ustalanej przy pomocy fotoreceptorów: fitochromów i kryptochromów). Liczba transkryptów genów zaangażowanych w rozkład skrobi zmienia się regularnie w cyklu dobowym, natomiast ilości samych białek pozostaje na stałym poziomie. Zmiana długości fotoperiodu powoduje szybkie dostosowanie poziomów poszczególnych transkryptów, natomiast ilości enzymów ulegają zmianie po znacznie dłuższym czasie. W roślinach *Arabidopsis* poddanych ciągłemu naświetlaniu poziomy transkryptów nadal podlegały regularnym oscylacjom w cyklu dobowym. Podobnym zmianom ulegał poziom maltozy. Pozwala to sądzić, iż obserwowane rytmy są endogenne, a wymienione procesy są pod kontrolą światła i zegara biologiczne-

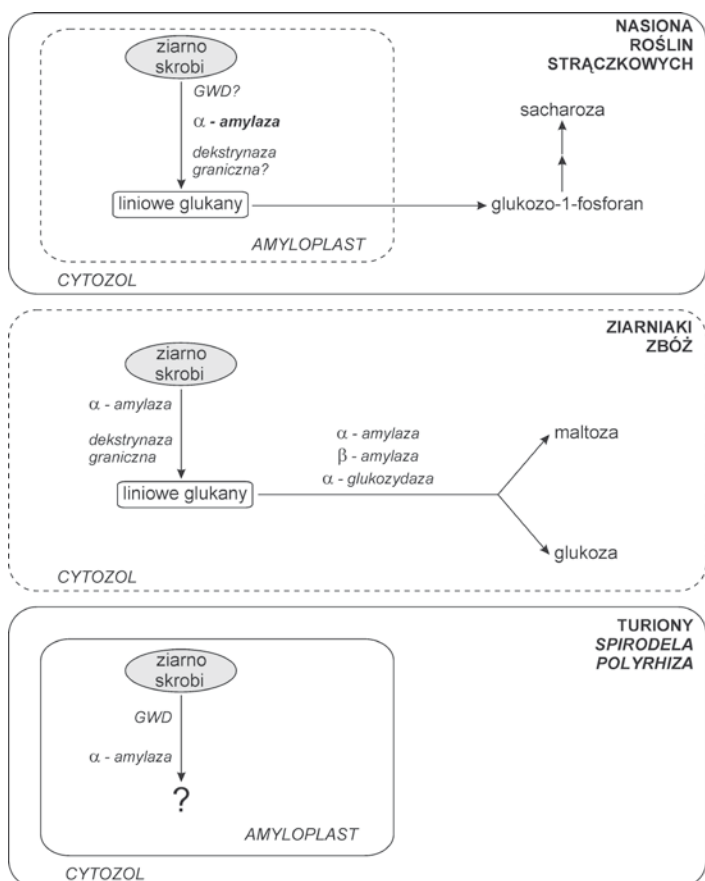
go. W ciągłym świetle ilości enzymów nie ulegały zmianie, a zatem ich aktywność musi być regulowana poprzez modyfikacje posttranslacyjne. Zawartość glukozy i sacharozy podlegała nieregularnym zmianom podczas ciągłego naświetlania. Natomiast w roślinach umieszczonych w ciągłej ciemności poziom skrobi, maltozy, glukozy i sacharozy szybko spadał, a następnie utrzymywał się na stałym poziomie. Uważa się, iż poziom glukozy i sacharozy jest regulowany wyłącznie światłem. Aktywność enzymów rozkładających skrobię może być regulowana na kilka sposobów. Jednym z nich jest odwracalna fosforylacja, której ulega m. in. białko SEX4 wiążące się z ziarnem skrobi i niezbędne do jej degradacji (dokładne działanie tego enzymu nie jest znane). Zmiana aktywności enzymów może też zachodzić pod wpływem zmiany potencjału redoks, poprzez utlenianie lub redukcję mostków disiarczkowych. Redukcja grup sulfhydrylowych często zachodzi przy udziale tioredoksyny. Do enzymów ulegających takim modyfikacjom należą β -amylaza i pullulanaza (współdziałają z tioredoksyną) oraz dikanaza glukan, woda. Zmiana pH stromy chloroplastów przy przejściu ze światła do ciemności (z odczynu zasadowego do obojętnego) również może oddziaływać na aktywność enzymów (poprzez zmianę konformacji), lecz prawdopodobnie nie wpływa bezpośrednio na regulację procesu rozkładu skrobi.

ROZKŁAD SKROBI ZAPASOWEJ

Skrobia wytwarzana jest nie tylko w liściach, lecz także w innych organach roślinnych, gdzie stanowi materiał zapasowy. Do takich organów należą wyspecjalizowane organy spichrzowe (bulwy, kłącza), ziarniaki zbóż i nasiona roślin strączkowych oraz inne części roślin, w których nie zachodzi fotosynteza. Zachodzące w powyższych organach procesy rozkładu skrobi w większości znacznie różnią się od przebiegu degradacji skrobi przejściowej (SMITH i współaut. 2005, TAIZ i ZEIGER 2006). Przykłady dróg rozkładu skrobi w organach zapasowych przedstawiono na Ryc. 3. Dotychczas żaden z tych szlaków nie został w pełni scharakteryzowany. Badanie tych przemian jest utrudnione, gdyż zachodzą one w dłuższych przedziałach czasowych i często towarzyszą im zmiany rozwojowe w danym organie roślinnym.

Najlepiej poznany został przebieg rozkładu skrobi w ziarniakach zbóż. Należą one do

tzew. nasion mączystych, w których skrobia stanowi główny materiał zapasowy. Zgromadzona jest ona w bielmie. Bielmo zawiera komórki wypełnione ziarnami skrobi i w dojrzałym nasieniu jest martwą tkanką. Otoczone jest ono komórkami warstwy aleuronowej, które zawierają liczne wakuole magazynujące białka. Warstwa aleuronowa jest odpowiedzialna za syntezę i wydzielanie do bielma enzymów hydrolitycznych potrzebnych do rozkładu skrobi. W początkowym okresie kiełkowania (faza imbibicji) zarodek zaczyna wytwarzać giberelinę GA_3 , uwalniając ją na drodze hydrolizy z koniugatów. Hormon ten dyfunduje do warstwy aleuronowej, gdzie indukuje syntezę α -amylaz, a następnie innych enzymów biorących udział w rozkładzie skrobi. α -Amylazy zapoczątkowują hydrolityczny atak na ziarna skrobi. W ziarniakach zbóż w procesie tym biorą udział także α -glukozydazy. Enzymy te hydrolizują



Ryc. 3. Drogi rozkładu skrobi zapasowej w różnych organach.

wiązania α -1,2-, α -1,3-, α -1,4- i α -1,6-glikozydowe. α -Amylasy i α -glukozydazy działają synergistycznie: działając jednocześnie wykazują kilkakrotnie wyższą aktywność niż każda z nich pojedynczo. α -Amylasy zapoczątkowują również rozkład skrobi w nasionach roślin strączkowych. Endoamylasy biorą też udział w jednym z najbardziej nietypowych procesów rozkładu skrobi. Katalizują one degradację skrobi w kolbach obrazków plamistych (*Arum maculata*). Zachodzi ona w bardzo szybkim tempie przez okres kilku godzin i towarzyszy jej bardzo intensywne oddychanie. Wskutek tych procesów temperatura kolby podnosi się o ok. 10°C, co wzmaga wydzielanie lotnych substancji zapachowych przywabiających owady. Nie wiadomo natomiast jak jest inicjowany rozkład skrobi w innych organach zapasowych, takich jak bulwy ziemniaka. W kiełkujących bulwach nie obserwuje się znaczącego wzrostu ilości enzymów amylolytycznych lub fosforolitycznych, a zapoczątkowanie degradacji nie odbywa się jednocześnie w całym organie. Skrobia w bulwach ziemniaka rozkładana jest także podczas przechowywania w niskich temperaturach. Wzrasta wówczas aktywność jednej z izoform β -amylazy. Oba te procesy rozkładu

zachodzą wewnątrz amyloplastów. Na znaczne różnice w przebiegu degradacji skrobi w ziarniakach zbóż i bulwach ziemniaka wskazuje stopień fosforylacji tego polisacharydu i wygląd granul po zapoczątkowaniu rozkładu. Skrobia w organach spichrzowych jest bogato ufosforylowana (skrobia w bulwach ziemniaków zawiera 10 razy więcej reszt fosforanowych niż w liściach *Arabidopsis*), co jest wynikiem działania dikinazy glukan, woda lub jej homologów. Natomiast skrobia w bielmie ziarniaków zbóż zawiera śladowe ilości reszt fosforanowych i dikinaza glukan, woda prawdopodobnie nie bierze udziału w kontroli procesu jej rozkładu. Po zapoczątkowaniu degradacji skrobi granule pochodzące z ziarniaków zbóż zawierają liczne pory na powierzchni i prowadzące od nich w głąb ziarna kanały. Rozkład zachodzi głównie wewnątrz granuli. Ziarna skrobi z bulw ziemniaka wykazują natomiast liczne ubytki na powierzchni. Tak wyraźne różnice wskazują na to, iż w rozkładzie skrobi uczestniczą różne typy enzymów.

Różne są także drogi rozkładu rozpuszczalnych glukanów uwolnionych z ziaren skrobi. W bielmie ziarniaków zbóż, będącym martwą tkanką, w degradacji tych glukanów

bierze udział szereg enzymów syntetyzowanych w otaczających bielmo żywych komórkach: dekstrynaza graniczna, α - i β -amylazy, α -glukozydaza. Produktami rozkładu są maltoza i glukoza. Cukry te transportowane są do zarodka. W nasionach roślin strączkowych degradacja skrobi zachodzi w cytozolu komórek liścieni. Błony plastydów, które zawierały ziarna skrobi, zanikają. Enzymy rozkładające rozpuszczalne glukany, to w tym przypadku dekstrynaza graniczna i cytozolowa fosforylaza skrobiowa. W bulwach ziemniaków hydrolyza glukanów zachodzi w plastydach, nieznane są jednak szczegóły tych przemian.

ROZKŁAD SKROBI W TURIONACH *SPIRODELA POLYRHIZA*

Spirodela polyrhiza (spirodela wielokorzeniowa) należy do rodziny Araceae (obrazkowate) i jest pospolitą rośliną wodną, pływającą, o niewielkich rozmiarach. Zbudowana jest z pędu wytwarzającego liściopodobne segmenty (o średnicy 2-3 mm) oraz pędu korzeni. Pędy wegetatywne spirodeli są wrażliwe na niskie temperatury i obumierają pod koniec sezonu wegetacyjnego. Począwszy od późnego lata aż do końca jesieni, spirodela wytwarza turiony (pąki zimujące), które po odłączeniu od rośliny macierzystej opadają na dno zbiorników wodnych (APPENROTH i BERGFELD 1993, APPENROTH i współaut. 1996, DÖLGER i współaut. 1997, APPENROTH i GABRYŚ 2001, SZWEYKOWSKA i SZWEYKOWSKI 2007). Stanowią one formy przetrwalnikowe i służą rozmnażaniu wegetywnemu. Turiony zawierają duże ilości materiału zapasowego w postaci skrobi (ok. 70% suchej masy) oraz dwa zawiązki pędów, przypominające budową tkanki zarodka. Zgromadzona skrobia pełni dwie funkcje. Po pierwsze umożliwia turionom przetrwanie w niekorzystnych warunkach przez długi okres czasu. Zachodzi wtedy bardzo powolny rozkład skrobi, który może trwać przez wiele miesięcy lub lat. Natomiast po wykiełkowaniu następuje intensywna degradacja skrobi, mająca na celu zaspokojenie potrzeb energetycznych szybko rosnącego młodego pędu. W warunkach laboratoryjnych szereg czynników może indukować powstawanie turionów. Należą do nich m. in. niedobór azotanów, siarczanów lub fosforanów oraz obecność kwasu abscysynowego. Bezpośrednio po wytworzeniu turiony znajdują się w stanie uśpienia i nie kiełkują, nawet gdy warunki są sprzyjające. Stan uśpienia przerywany jest przez stratyfikację niską

Skrobia może być wytwarzana nie tylko w liściach i wyspecjalizowanych organach spichrzowych, lecz także w wielu innych, niefotosyntetyzujących częściach rośliny (SMITH i współaut. 2005). Jest ona wówczas często gromadzona i rozkładana na przestrzeni kilku dni. Takie przejściowe zapasy skrobi pojawiają się m. in. w nasionach *Arabidopsis* podczas rozwoju zarodka i łupiny nasiennej oraz w czapeczce korzeniowej. Prawdopodobnie drogi rozkładu skrobi w tych organach są podobne jak w liściach.

temperaturą w okresie zimy. Wówczas, po odpowiednio długim pobycie w niskiej temperaturze, turiony są zdolne do kiełkowania.

Proces kiełkowania turionów *Spirodela* jest regulowany przez światło za pośrednictwem fitochromu B (phyB) na drodze reakcji niskoenergetycznej (ang. low fluence response, LFR), typowej reakcji fitochromowej, w której działanie światła czerwonego odwracane jest działaniem dalekiej czerwieni (APPENROTH i BERGFELD 1993, APPENROTH i współaut. 1996). Kiełkowanie rozpoczyna się po 48 godzinach ciągłego naświetlania światłem czerwonym, może być również wywołane przez naświetlanie daleką czerwiecią lub pojedynczym błyskiem światła czerwonego. Rozwój jednego z zawiązków jest opóźniony. 24 godziny po rozpoczęciu naświetlania następują pierwsze zmiany w komórkach zawiązka. Pojawiają się wówczas diktiosomy i pierwsze tylakoidy. Po 48 godzinach znikają całkowicie ciała prolamelarne, a po 72 godzinach obserwuje się całkowicie wykształcone plastidy. Początkowo zachodzi tylko elongacja komórek, a dopiero później podziały. W nie-naświetlanych turionach komórki zawiązków pędów zawierają bardzo niewiele skrobi. Jednak w ciągu pierwszych dwóch dni naświetlania jej ilość znacznie wzrasta, podczas gdy aparat fotosyntetyczny jest jeszcze nieaktywny. Oznacza to, że musi zachodzić rozkład skrobi zapasowej w turionach i translokacja produktów degradacji do komórek zawiązków.

Degradacja skrobi po wykiełkowaniu turionów również następuje pod wpływem światła (DÖLGER i współaut. 1997, APPENROTH i GABRYŚ 2001). Poprzednio świetlną regulację rozkładu skrobi zapasowej wyka-

ziano jedynie w niezróżnicowanej tkance mchu. Proces ten w turionach spirodeli jest kontrolowany przez fitochrom, jednak na innej drodze niż indukcja kiełkowania. O innym rodzaju reakcji fitochromowej w tym przypadku świadczy fakt, iż rozkład skrobi nie może być wywołany pojedynczym błyskiem światła, w przeciwieństwie do kiełkowania. Najbardziej efektywne w indukowaniu rozkładu skrobi jest ciągłe światło czerwone. Może być ono zastąpione światłem niebieskim, lecz zmniejsza się wtedy tempo degradacji skrobi. W obu przypadkach zawartość skrobi w turionach mierzona po dwóch dniach naświetlania znacząco się obniżała (DÖLGER i współaut. 1997). Przeprowadzono szereg doświadczeń mających na celu określenie rodzaju odpowiedzi fitochromowej w tym procesie (APPENROTH i GABRYŚ 2001). Zastosowanie podczas naświetlania turionów DCMU (N,N-dimetylo-3,4-dichlorofenylmocznik), inhibitora fotosyntetycznego transportu elektronów, nie wpływało na przebieg rozkładu skrobi. Proces ten nie jest zatem zależny od fotosyntezy. Wykazano również, iż ciągłe naświetlanie turionów można zastąpić błyskami czerwonego światła, powtarzanymi co 24, 12 lub 1 godzinę. We wszystkich przypadkach zachodziła degradacja skrobi. Efekt działania błysków światła powtarzanych co 24 lub 12 godzin może być zniewelony przez zastosowanie bezpośrednio po błysku światła czerwonego, błysku dalekiej czerwieni. Natomiast w przypadku błysków światła czerwonego powtarzanych co godzinę, daleka czerwień nie wykazuje takiego działania i zapoczątkowany rozkład skrobi dalej postępuje. Okazało się także, że degradacja skrobi może być indukowana przez daleką czerwień, zarówno stosowaną w postaci ciągłego naświetlania, jak i błysków powtarzanych co godzinę. Tempo rozkładu jest jednak znacząco niższe niż w przypadku światła czerwonego. Wyniki te wskazują, iż działanie fitochromu w regulacji rozkładu skrobi w turionach nie spełnia kryteriów reakcji bardzo niskoenergetycznej (ang. very low fluence response, VLFR) ani wysokoenergetycznej (ang. high irradiance response, HIR). Możliwość odwrócenia efektów błysków czerwonego światła powtarzanych co 24 lub 12 godzin przez daleką czerwień wskazuje natomiast na występowanie niskoenergetycznej reakcji fitochromowej (ang. low fluence response, LFR). Brak tej odwracalności w przypadku

błysków powtarzanych co godzinę można wyjaśnić tym, że występujące w godzinnych odstępach błyski dalekiej czerwieni same indukują rozkład skrobi (w przeciwieństwie do błysków dalekiej czerwieni powtarzanych co 12 lub 24 godziny). Uznaje się zatem, że degradacja skrobi zapasowej w turionach *Spirodela polyrhiza* pod wpływem światła czerwonego kontrolowana jest przez fitochrom B na drodze reakcji niskoenergetycznej (R-LFR). Odpowiedź na daleką czerwień jest natomiast prawdopodobnie regulowana poprzez reakcję wysokoenergetyczną (FR-HIR). Kiełkowanie i rozkład skrobi są więc osobno regulowane przez światło. Te dwa procesy nie są jednak zupełnie niezależne. Przeprowadzono doświadczenie, w którym turiony poddano błyskowi światła czerwonego, a następnie ciągłemu naświetlaniu (24 godziny), oddzielnym okresem ciemności o różnym czasie trwania. Niezależnie od czasu trwania ciemności ilość skrobi zdegradowanej w ciągu sześciu dni była niemal jednakowa. Gdy jednak okres ciemności był bardzo krótki, bezpośrednio po ciągłym naświetlaniu nie obserwowano rozkładu skrobi. Wydaje się zatem, iż rozpoczęcie degradacji skrobi zapasowej musi być poprzedzone wcześniejszym wykiełkowaniem pędu (następuje po ok. dwóch dniach od wyzwalającego je sygnału), do którego mają być dostarczane produkty tej degradacji. Jeżeli jednak sygnał do rozkładu skrobi pojawi się jeszcze przed kiełkowaniem może on być „przechowany” do momentu, gdy powstanie organ, do którego będą kierowane produkty degradacji.

Do niedawna niewiele było wiadomo na temat reakcji enzymatycznych zachodzących podczas rozkładu skrobi w turionach spirodeli. Obecnie poznano już początkowe etapy tego procesu (REINMANN i współaut. 2002, REINMANN i współaut. 2004). Sygnał świetlny inicjujący degradację skrobi powoduje jednocześnie autofosforylację dikinazy glukan, woda (GWD), związanej z powierzchnią ziarna skrobi. Enzym ten może się jednak wiązać tylko z poprzednio ufosforylowanymi łańcuchami polisacharydu. Aktywowana przez autofosforylację dikinaza glukan, woda prowadzi dalszą fosforylację skrobi, co wpływa na wiązanie kolejnych enzymów. Jednym z nich jest α -amylaza, która zapoczątkowuje rozkład ziaren skrobi. Nie wiadomo jednak jakie enzymy biorą udział w dalszych etapach tego procesu.

PODSUMOWANIE

Synteza i rozkład skrobi należą do podstawowych procesów metabolicznych roślin. Ich niezakłócony przebieg i odpowiednia regulacja są konieczne do prawidłowego funkcjonowania rośliny. Powstająca z produktów fotosyntezy i zgromadzona w komórkach skrobia jest magazynem substratów energetycznych. Rezerwy te są następnie wykorzystywane w czasie, gdy niemożliwa jest aktywność fotosyntetyczna oraz w okresach wzmożonego zapotrzebowania na energię. Degradacja skrobi zachodzi na różnych drogach enzymatycznych, w zależności od organu, etapu życia rośliny i rodzaju procesu fizjologicznego. W połączeniu z precyzyjną regulacją każdej z tych dróg rozkładu, umożliwia to skoordynowanie degradacji skrobi z innymi procesami przebiegającymi w roślinie (np. kiełkowaniem) oraz dostosowanie jej do zmian warunków zewnętrznych (np. długości dnia i nocy). Przedstawiony tu przebieg rozkładu skrobi w turionach *Spirodela polyrhiza*

jest ciekawym przykładem takiej złożonej regulacji. Przede wszystkim jest to jedyny dotąd dobrze poznany przypadek regulacji degradacji skrobi zapasowej przez światło za pośrednictwem fitochromu. Ponadto wykazano, iż proces ten jest skoordynowany z kiełkowaniem, które jest także indukowane światłem, jednak na drodze nieco innej reakcji fitochromowej. Rozkład skrobi nie zostaje zapoczątkowany, dopóki nie pojawi się pęd, do którego mogą być transportowane produkty tego rozkładu. Zapobiega to przypadkowej indukcji rozkładu skrobi, co spowodowałoby zaburzenie rozwoju rośliny. Ten oraz inne przedstawione przykłady pokazują jak różne są poszczególne drogi degradacji skrobi i ich regulacja. Wiele szczegółów dotyczących zarówno samego przebiegu rozkładu skrobi, jak i jego kontroli pozostaje dotychczas nieznanymi. Nie ulega wątpliwości, że dokładniejsze zbadanie tych zagadnień dostarczy jeszcze wielu ciekawych informacji.

STARCH DEGRADATION PATHWAYS IN PLANTS

Summary

Starch is the main storage material in higher plants. It is accumulated both in chloroplasts (transitory starch) and in non-photosynthetic tissues (storage starch), in the form of starch granules composed of amylose and amylopectin. Transitory starch accumulated during the day is almost completely degraded at night, when it serves as the main source of energy for the cell metabolism. The biochemical pathway of starch degradation in chloroplasts has been fully characterized only in *Arabidopsis thaliana*. This process can be divided into two steps: the release of soluble glucans from the granule by α -amylase and further degradation of these glucans by β -amylase and de-branching enzymes. The main product of this degradation pathway is β -maltose, which is afterwards metabolized in the cytosol. The degradation of transitory starch is a periodic process, regulated by the circadian clock, starch phosphorylation and enzyme activity. Storage starch is accumulated for longer periods of time in non-photosynthetic parts of the plant such as cereal and legume seeds, roots, tubers or rhizomes. In these organs the enzymatic reactions, which lead to storage starch degradation and their regulation are different than in the case of transitory starch, and they vary significantly be-

tween species. An interesting pathway of starch degradation control, unknown in other species, has been discovered in the duckweed *Spirodela polyrhiza*. At the end of the vegetative season this water plant forms turions - resting fronds which sink to the bottom of ponds and lakes, and germinate when conditions become favorable. Turions contain starch as a storage material which helps them survive the period of dormancy and, during germination, provide energy for growth of new fronds. Both germination of turions and starch degradation are induced by light and controlled by phytochrome B. The germination response to light is mediated by a low fluence response (LFR), whereas starch degradation can be controlled by a red light-dependent low fluence response or a far red-dependent high irradiance response (HIR). The processes of germination and starch degradation, although independently controlled, are closely connected. Response to a starch degradation-inducing signal is possible only under condition that germination is sufficiently advanced and the new sprout is ready to receive the degradation products. If this is not the case the light-induced signal can be stored until the sprout is formed.

LITERATURA

- APPENROTH K.-J., BERGFELD R., 1993. *Photophysiology of turion germination in Spirodela polyrhiza (L.) Schleiden. XI. Structural changes during red light induced responses*. Plant Physiol. 141, 583–588.
- APPENROTH K.-J., GABRYŚ H., 2001. *Light-induced starch degradation in non-dormant turions of Spirodela polyrhiza*. Photochem. Photobiol. 73, 77–82.
- APPENROTH K.-J., TELLER S., HORN M., 1996. *Photophysiology of turion formation and germination in Spirodela polyrhiza*. Biologia Plantarum 38, 95–106.
- DÖLGER K., TIRLAPUR U. K., APPENROTH K.-J., 1997. *Phytochrome-regulated starch degradation in germinating turions of Spirodela polyrhiza*. Photochem. Photobiol. 66, 124–127.
- LU Y., GEHAN J. P., SHARKEY T. D., 2005. *Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism*. Plant Physiol. 138, 2280–2291.
- KOPCEWICZ J., LEWAK S., 2005. *Fizjologia roślin*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- MCMANUS M., PLAXTON W., 2006. *Control of primary metabolism in plants*. Ann. Plant Rev. 22, 266–269.
- REINMANN R., HIPPLER M., MACHELETT B., APPENROTH K.-J., 2004. *Light induces phosphorylation of glucan water dikinase, which precedes starch degradation in turions of the duckweed Spirodela polyrhiza*. Plant Physiol. 135, 121–128.
- REINMANN R., RITTE G., STEUP M., APPENROTH K.-J., 2002. *Association of α -amylase and the R1 protein with starch granules precedes the initiation of net starch degradation in turions of Spirodela polyrhiza*. Physiologia Plantarum 114, 2–12.
- SAMOJEDNY D., ORZECZOWSKI S., 2007. *Nowe spojrzenie na proces degradacji ziaren skrobi w chloroplastach Arabidopsis thaliana L.* Postępy Biochemii 53, 74–83.
- SMITH A. M., ZEEMAN S. C., SMITH S. M., 2005. *Starch degradation*. Ann. Rev. Plant Biol. 56, 73–98.
- SZWEYKOWSKA A., SZWEYKOWSKI J., 2007. *Botanika*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- TAIZ L., ZEIGER E., 2006. *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Inc.
- TETLOW I. J., MORELL M. K., EMES M. J., 2004. *Recent developments in understanding the regulation of starch metabolism in higher plants*. J. Exp. Botan. 55, 2131–2145.