

## **Perunatärkkelyksen kerääntyminen ja sijoittuminen, ennen ja jälkeen tuleentumisen, perunamukuloiden eri kudoksissa. Esitutkimus.**

Noora Tuikkanen<sup>1</sup>, Anu Jaakola<sup>1</sup>, Elina Virtanen<sup>1</sup>, Anja Hohtola<sup>2</sup> ja Robin Manelius<sup>1</sup>

*1 MTT, Pohjois Pohjanmaan tutkimusasema, Tutkimusasemantie 15, 92400 Ruukki  
etunimi.sukunimi@mtt.fi*

*2 Oulun yliopisto, Biologian laitos, PL 3000, 90014 Oulu  
anja.hohtola@oulu.fi*

### **Tiivistelmä**

Tärkkelys on, selluloosan jälkeen, maapallon yleisin biopolymeeri. Perunatärkkelystä käytetään runsaasti elintarvike-, vaatetus-, ja, erityisesti, paperiteollisuudessa. Uusia käyttötarkoituksia tärkkelykselle etsitään koko ajan ja lupaavimmat mahdollisuudet uudet lienevät uusilla biomuoveilla ja polttoainekäyttöön tarkoitetulla bioetanolilla.

Kasvukauden aikana peruna varastoi tärkkelyksen varastoelimiinä toimiviin mukuloihin ja varastointikauden aikana mukulalla tapahtuu luontaisia fysiologisia muutoksia jotka vaikuttavat tärkkelyksen saantoon. Yhtenä tekijänä, lajikeominaisuuksien lisäksi, tärkkelyksen määrään ja ominaisuuksiin vaikuttavat kasvukauden olosuhteet ja mukuloiden maturaatio niin että mukuloissa on maksimaalinen määrä tärkkelystä silloin kun varret alkavat kuolla ja yli puolet kasvuston lehdistä ovat jo kuolleet. Mukulan irrotessa noston yhteydessä tai perunan yhteyttäminen estyy varsiston hävityksen aikaansaamana, siitä tulee fysiologisesti itsenäinen jollin sen ominaisuudet vaihtelevat varastoajan kuluessa.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on ollut selvittää tärkkelysjyvästen kerääntymistä, sijoittumista ja jyvästen kokojakaamaa mukulassa sen kehityksen aikana, eri perunalajikkeilla jotta saadaan viitteitä mahdollisista perunatärkkelyksen molekyyli-tason muutoksista. Lisäksi selvitämme Pohjois-Suomen pitkän päivän olosuhteiden sekä eri viljelytekniikoiden, mm. lannoitusten, vaikutuksia perunatärkkelykseen.

Tehdyssä esitutkimuksessa keräsimme näytteitä perunamukuloiden (lajike, van Gogh) ytimestä, varastosolukosta ja johtojännekehän ja kuoren välisestä solukosta ennen ja jälkeen tuleentumisen. Fiksoidut näytepalat valettiin parafiiniin ja blokeista leikattiin mikrotom:illa leikkeitä, joka värjättiin jod-jodkalium liuoksella. Leikkeet valokuvattiin, mikroskoopin avulla, jonka jälkeen kuvista laskettiin tärkkelysjyvien määrä sekä määritettiin niiden kokojakaama.

Tärkkelysjyvien totaalinen määrä, mukulan kaikissa osissa, oli suurempi ennen maturaatiota ja niiden määrä oli korkeampi kuoriosissa kuin ytimessä sekä ennen että jälkeen maturaation. Ero jyvien määrässä oli suurin (~2 x) verratessa mukuloiden ydintä, niiden kuoriosiin, maturaation jälkeen.

Selvä yleiskehitys, tärkkelysjyvien kokojakauman osalta, oli että jyvät olivat pienemmät ennen maturaatiota mukulan kaikissa osissa. Huomattavin osuudessa kasvu nähtiin keskisuurten ja suurten tärkkelysjyvien osalta perunamukuloiden ytimessä.

Tulokset osoittavat että mukulan maturaation taso vaikuttaa merkittävästi tärkkelysjyvästen paikallistumiseen ja kokojakaamaan. Näillä seikoilla saattaa olla huomattava vaikutus perunatärkkelyksen fysikaaliskemiallisiin ominaisuuksiin vaikkakin tutkimustieto, maturaation vaikutuksesta perunatärkkelykseen molekyyli-tasolla, on vähäinen. Nämä tekijät ovat keskeisessä asemassa esimerkiksi kun tärkkelystä hyödynnetään teollisuudessa.

### **Asiasanat:**

Peruna, tärkkelys, maturaatio, kokojakaama, ydin, varastosolukko, johtojännekehä, van Gogh

## Johdanto

Perunasta (*Solanum tuberosum*) saatava sato kuuluu maailman tärkeimpiin koska siitä saatavalla tärkkelyksellä on tärkeä asema niin ihmisten ravinnonlähteenä kuin teollisuuden raaka-aineena. Perunamukuloita käytetään myös uusien perunoiden tuottamisessa (siemenperuna). Perunatärkkelyksen monen käyttötarkoituksen takia on tärkeää saada tietää miten tärkkelysyyväset kehittyvät ja mikä on perunamukuloiden tärkkelyspitoisuus perunan kasvukautena. Tärkkelysyyvästen kehitys ja muutokset mukuloiden tärkkelyspitoisuudessa, mukulan elinkaaren aikana, ovat tärkeitä parametreja vertailtaessa eri perunalajikkeita.

Kasvukauden aikana peruna varastoi tärkkelyksen varastoelimiin toimiviin mukuloihin. Tärkkelysyyvästen rakenteeseen ja laatuun vaikuttavat erilaiset fysikaaliset ja biologiset säätelytekijät [1]. Varastointikauden aikana peruna läpikäy luontaisia fysiologisia muutoksia jotka vaikuttavat tärkkelyksen saantoon. Lajikeominaisuuksien lisäksi kasvukauden olosuhteita ja mukuloiden maturaatiota (tuleentumisastetta) pidetään tärkeimpinä tärkkelyksen määrään ja ominaisuuksiin vaikuttavina tekijöinä [2]. Mukuloihin on kerääntynyt maksimaalinen määrä tärkkelystä vasta silloin, kun yli puolet kasvuston lehdistä on kuollut ja varret alkavat kuolla [3] ja vain tuleentuneissa mukuloissa tärkkelys on kerääntynyt tiiviisti varastosolukoihin ja on sieltä luontaisesti helposti purkautuvassa muodossa [4]. Kun mukula irtoaa noston yhteydessä maavarresta mekaanisesti tai perunan yhteyttäminen estyy varsiston hävityksen aikaansaamana, siitä tulee fysiologisesti itsenäinen ja sen ominaisuudet vaihtelevat varastoajan kuluessa. Heti noston jälkeen mukuloilla on fysiologisesti lepokausi eli dormanssi ja se vaihtelee eri syvyysasteineen (lepokausi ja unikausi) 5-23 viikkoon [5]. Dormanssin kestoaikaan ja muihin mukulan fysiologisen tilan muutoksiin varastossa vaikuttaa lajikkeen perintötekijät, kasvuhistoria sekä varasto-olosuhteet [6].

Tärkkelys koostuu käytännössä glukoosipolymeereistä (~99%, haaroittunut amylopektiini ja haaroittumaton amyloosi) mutta se sisältää myös pieniä määriä proteiineja (<1%), lipidejä (<1.5%) ja fosforia (20 – 900 ppm). Tärkkelyksen fysikaaliskemialliset ominaisuudet (esim. hyytelöitymislämpötila, kristalliniteetti-tyyppi, entsyymaattinen ja/tai kemiallinen hydrolysoitavuus) määräytyvät suurelta osin glukoosipolymeerien, varsinkin amylopektiinin, rakenteesta ja kokoonpanosta. Tutkimuksissa on myös osoitettu että, fysikaaliskemiallisissa ominaisuuksissa esiintyy vaihtelua riippuen siitä mistä perunamukuloiden osasta tärkkelys on eristetty [7].

Esitutkimuksen tarkoitus oli kartoittaa tärkkelyksen kerääntymistä ja sijoittumista mukuloissa niiden kehityksen loppuvaiheessa ja perunamukulan eri kudoksissa. Tulevaisuudessa seuraamme myös mukuloiden tärkkelyspitoisuutta sekä tärkkelysmolekyyliden (amyloosin ja amylopektiinin) ominaisuuksia kasvukauden eri jaksoina. Tämän lisäksi tullaan tutkimaan viljelytekniikoiden ja lannoituksen vaikutusta tärkkelykseen. Näitä tutkimuksia varten kerätään näytteitä perunamukulan eri (ydintä, varastosolukkoa sekä kuoren ja johtojännekehän välistä solukkoa) osista. Tässä esitutkimuksessa keskityttiin tutkimaan mukulan eri osia, ydintä, varastosolukkoa sekä kuoren ja johtojännekehän välistä solukkoa kahtena eri ajankohtana Suomessa yleisimmin viljelyssä olevalla lajikkeella, van Gogh:lla.

## Aineisto ja menetelmät

Kasvukauden 2004 aikana tutkimusmateriaalina käytettiin Tyrnävällä lyhyen kasvukauden olosuhteissa kasvanutta perunaa, koelajikkeena Van Gogh. Nostoajankohtia oli kaksi: 9/8 2004 kehitysasteiden ollessa 51-68 ja 6/9 2004 luontaisen tuleentumisen jälkeen.

Jokaisesta näytemukulasta otettiin kolme koepalaa (n. 0,5 x 0,5 x 0,5 cm), ytimeistä, keskiväliltä ja yksi kuoren vierestä. Näytteet fiksoitiin solujen toimintojen pysäyttämiseksi ja koepaloista valmistettiin eri vaiheiden kautta paraffiiniin valettuja blokkeja mikroskopointia varten [8, 9]. Paraffiiniblokeista leikattiin mikrotomilla (Microm, HM 325) leikenauhaa (paksuus 20 µm), joka värjättiin jod-jodkalium (20% : 2%) liuoksella. Värjätty leikkeet mikroskopointiin valomikroskoopilla (Leica) ja valokuvattiin (Canon G5) välittömästi.

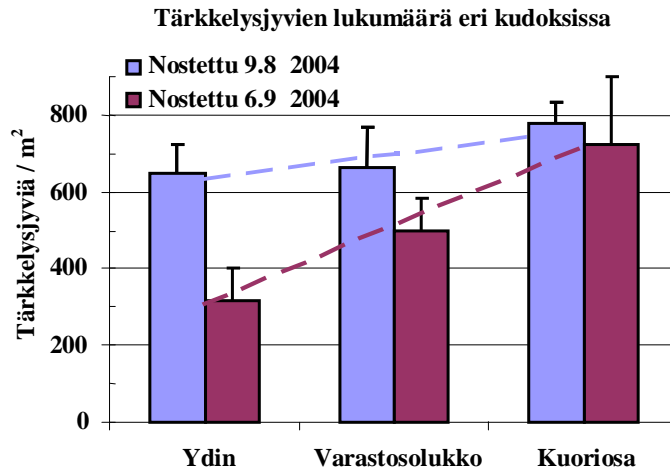
Valokuvista analysoitiin tärkkelysyyvästen lukumäärää pinta-alayksikköä (0.64 mm<sup>2</sup>) kohden. Jyväsien kokojakauma määritettiin mittaamalla jyväsien pisin halkaisija satunnaisesti valituilta kolmelta (0.063 mm<sup>2</sup>) koealalta per näyte, jonka jälkeen laskettiin mitattujen arvojen keskiarvo.

Pieniksi jyviksi laskettiin jyvät joiden koko (pituus) oli  $<30 \mu\text{m}$ , keskisuuriksi  $30 - 40 \mu\text{m}$  ja suuriksi  $>40 \mu\text{m}$ . Tilastollinen testaus suoritettiin ohjelmalla SAS, versio 9.13 (SAS Institute Inc.).

## Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tärkkelysyyvien kehitystä ohjaa kasvien metabolia joten niiden kokoon ja ominaisuuksiin vaikuttavat esim. lannoitus, kasvu-, sää- ja valo-olosuhteet sekä perimä (lajike).

Kuva 1



### Tärkkelysyyvien määrät

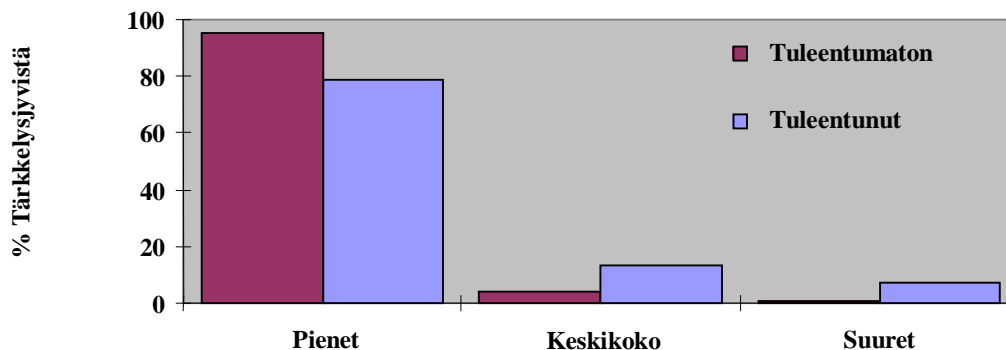
Alustavien tulosten mukaan sekä tärkkelysyyvästen lukumäärä, pinta-alayksikköä kohden, oli eri mukulan ydinosassa verrattuna kuoriosiin niin että tärkkelysyyväsiä esiintyi enenevässä määrin siirryttäessä mukuloiden ydinosasta sen kuoriosiin (Kuva 1). Nämä lukumääräiset erot olivat pienemmät ennen maturaatiota kuin maturaation jälkeen. Lisäksi tärkkelysyyvästen lukumäärä oli suurempi, kaikissa osissa mukulaa, ensimmäisenä nostoajankohtana verrattuna tuleentuneisiin mukuloihin.

### Tärkkelysyyvien koot

Tärkkelysyyvästen eri kokoluokkien (pienen, keskisuurten ja suurten) yleinen kehitys, perunan tuleentuessa, oli kohti suurempia jyyviä kaikissa mukulan osissa (Kuvat 2 – 4). Toinen trendi, tärkkelysyyvien kokojakaamaa tarkastellessa, oli että pienten tärkkelysyyvästen määrä oli selvästi suurin kaikissa kudoksissa (vähintään n. 72%, Kuvat 2 – 4), sekä ennen tuleentumista että tuleentumisen jälkeen.

Kuva 2

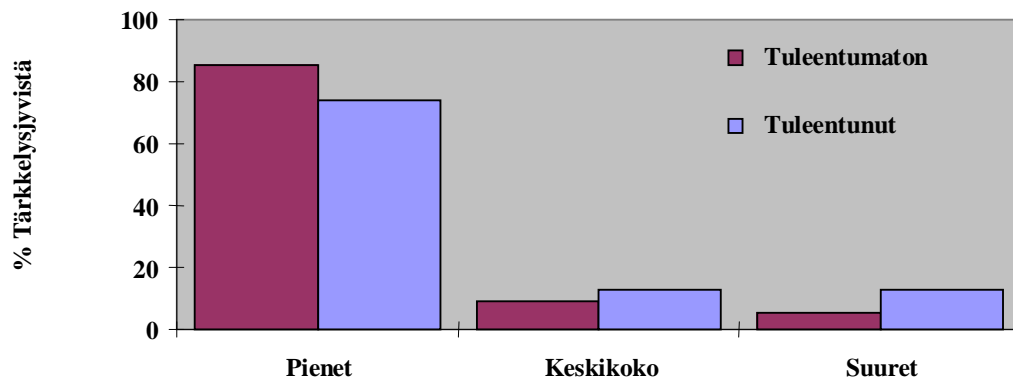
Tärkkelyksen kokoluokkien osuus mukulan ytimessä, ennen ja jälkeen tuleentumisen



Pienten tärkkelysjyvästen osuus (lukumäärä) oli korkein mukuloiden ytimessä ennen tuleentumista (~95% jyvistä, Kuva 2). Pienten jyvien osuus mukulan kudoksissa väheni selkeästi kohti sen ulko-osia sekä myös mukuloiden tuleentuessa niin että esim. tuleentumisen jälkeen niiden osuus kuoriosissa oli ~72% verrattuna 89% ennen tuleentumista (Kuva 4).

**Kuva 3**

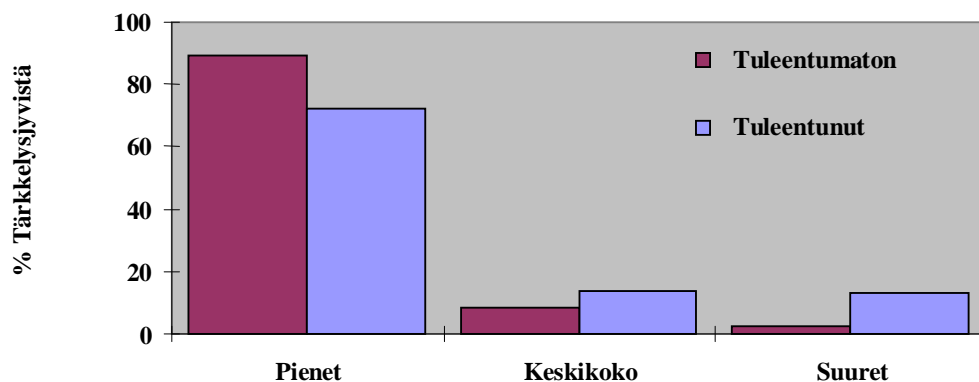
**Tärkkelyksen kokoluokkien osuus mukulan varastosolukossa, ennen ja jälkeen tuleentumisen**



Keskisuurten tärkkelysjyvästen määrä oli kaksinkertainen varasto- ja kuoriosissa (Kuvat 3 ja 4) verrattuna niiden määrään mukuloiden ytimessä (Kuva 2), ennen tuleentumista. Tuleentumisen jälkeen keskisuurten jyvästen määrä oli kohonnut niin että niiden osuus oli suurin piirtein sama (~13,5% jyvistä) mukuloiden ytimessä, varastosolukossa ja kuoriosissa (Kuvat 2 – 4).

**Kuva 4**

**Tärkkelyksen kokoluokkien osuus mukulan kuoriosassa, ennen ja jälkeen tuleentumisen**



Suurten tärkkelysjyvien kohdalla suurin (15x) suhteellinen lisäys, tuleentumattomiin mukuloihin verrattuna, nähtiin mukuloiden ytimessä (Kuva 2). Perunamukuloiden varastosolukossa oli ennen tuleentumista 5,5% suuria tärkkelysjyviä ja tuleentuneissa mukuloissa osuus oli kohonnut 13,0%:iin (Kuva 3). Myös kuoriosien kohdalla muutos oli jyrkkä suurten jyvien osuuden ollessa 2,5% ennen tuleentumista ja 13,5% tuleentumisen jälkeen (Kuva 4).

## Johtopäätökset

Saadut tulokset tärkkelysyyvien määrällisestä esiintymisestä perunamukulan eri kudoksissa, olivat sopusoinnussa aiempien tutkimusten kanssa. Tärkkelysyyvien kokojakauman suhteen, tuleentumattomissa ja tuleentuneissa mukuloissa, havaitut erot kokoluokkien kehityksessä olivat suhteellisen pieniä jo sen takia että pienten tärkkelysyyvien määrä oli niin hallitseva. Tutkimuksen tulosten lähempi tarkastelu osoitti kuitenkin selvästi että mukulan maturaation taso vaikuttaa merkittävästi tärkkelysyyvästen määrään ja kokojakaumaan sen eri kudoksissa. Näillä tekijöillä voi siten olla tärkeä rooli esimerkiksi tärkkelyksen teollisessa hyödynnettävyydessä. Vain muutamissa tutkimuksissa on selvitetty maturaation vaikutusta perunatärkkelykseen molekyylitasolla ja tällöin on huomattu että myös tärkkelyksen fysikaaliskemiallisissa ominaisuuksissa on tapahtunut muutoksia. On siis syytä epäillä että, sekä perunamukulan eri kudosten tärkkelyksellä että ”samalla tärkkelysmateriaalilla” ennen ja jälkeen tuleentumisen, on myös molekyylitason eroavaisuuksia.

## Kirjallisuus

- 
- 1 E. Pilling and A. M. Smith, Growth ring formation in the starch granules of potato tubers. *Plant Physiology* **132** (2003) 365-371.
  - 2 M. Yusuph, R. F. Tester, R. Ansell, and C. E. Snape, Composition and properties of starches extracted from tubers of different potato varieties grown under the same environmental conditions, *Food Chemistry* **82** (2003) 283-289.
  - 3 W. Hunnius, Die Entwicklung des Stärkegehaltes bei der Abreife der Kartoffel. .Ref. Kolbe H. ja Stephan-Beckmann S. 1997. Development, growth and chemical composition of the potato crop (*Solanum tuberosum* L.). II. Tuber and whole plant. *Potato Research* **40**, (1974) 135-153.
  - 4 A. van Es and K. J. Hartman, Carbohydrate metabolism during storage of potatoes. Abstracts of conference papers and posters of the 10<sup>th</sup> triennial conference of the European Association for Potato Research (EAPR), Aalborg, Denmark, 26-31 July 1987 **63**.
  - 5 E. G. Cutter, Structure and development of potato plant. E. G. Cutter, *The Potato Crop*, (1992) P. Harris (Ed.), Chapman & Hall, London. 2<sup>nd</sup> edition.
  - 6 P. C. Struik and S. G. Wiersema, *Seed Potato Technology* (1999). Wageningen: Wageningen Pers.
  - 7 Karlsson, M.E. & Eliasson A.-C. Gelatinization and retrogradation of potato (*Solanum tuberosum*) starch in situ as assessed by differential scanning calorimetry (DSC). *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie* **36**: (2003) 735-741.
  - 8 Jensen, W.A. (1962) *Botanical Histochemistry*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
  - 9 Johansen, D.A. (1940) *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill, New York.