

УДК 579.254.2:581.143.5

АКТИВНОСТЬ САХАРОЗОСИНТАЗЫ И ИНВЕРТАЗЫ МОРФОГЕННОГО И НЕМОРФОГЕННОГО КАЛЛУСОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕЗРЕЛЫХ ЗАРОДЫШЕЙ КУКУРУЗЫ (*ZEА MAYS L.*), ИНФИЦИРОВАННЫХ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

А.Ю. МАТВЕЕВА, В.Д. САКАЛО, В.М. КУРЧИЙ, Е.Н. ТИЩЕНКО

Институт физиологии растений и генетики НАН Украины

Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17

e-mail: oltyko@gmail.com

Проводили сравнительный анализ активностей ферментов синтеза и гидролиза сахарозы морфогенного и неморфогенного каллусов, индуцированных из незрелых зародышей инбредных линий кукурузы 1555, 1568 и А188 после их Agrobacterium-опосредованной трансформации штаммом LBA 4404, содержащим вектор pCB002 с геном неомицинфосфотрансферазы (nptII). В канамицин-устойчивом (KтУК) морфогенном каллусе установлена значительная активация сахарозосинтазы в реакции синтеза сахарозы и инвертазы (вакуолярной и цитоплазматической), включающей её в метаболизм. Дифференциальная активность ферментов метаболизма сахарозы морфогенного и неморфогенного KтУК свидетельствует о важной роли сахарозы и продуктов её гидролиза в процессах роста и дифференцировки клеток при Agrobacterium-опосредованной трансформации.

Ключевые слова: кукуруза (*Zea mays L.*), *Agrobacterium*–опосредованная трансформация, каллус, сахарозосинтаза, инвертаза.

Введение. Тотипотентность клеток, компетентных к агробактериальной инфекции, является ключевым моментом методологии генетической инженерии. Вместе с тем, не только молекулярные механизмы морфогенеза *in vitro*, но и изменения метаболических и биосинтетических процессов при *Agrobacterium*–опосредованной трансформации далеки от полного понимания. Один из аспектов этих вопросов может быть связан с метаболизмом моносахаридов и сахарозы, которые по современным представлениям рассматриваются в качестве сигнальных и регуляторных молекул, принимающих участие в регуляции деления, роста и дифференцировки клеток в онтогенезе растений [1, 2]. На степень, пути передачи сигналов и сайты метаболизма сахарозы оказывают влияние внутренние и внешние факторы, что в свою очередь может изменять развитие и адаптацию растений в ответ на стрессоры [1].

Два фермента – сахарозосинтаза (СС, К.Ф.2.4.1.13) и инвертаза (К.Ф.3.2.1.26) катализируют синтез/расщепление и гидролиз сахарозы соответственно, осуществляя таким образом баланс между сахарами как регуляторными молекулами и компонентами метаболитических путей. Инвертаза необратимо гидролизует сахарозу в реакции: сахароза + H₂O → глюкоза +

фруктоза с последующим включением моносахаридов в гликолиз и дыхательный метаболизм. СС катализирует реакцию между сахарозой и УДФ, в результате чего образуется фруктоза и УДФГ, используемая для синтеза биополимеров в нефотосинтезирующих тканях. В отличие от СС инвертаза приводит к образованию двух гексоз, что увеличивает возможности фермента регулировать специфические сахарочувствительные процессы [1, 2, 3]. В целом считается, что гексозы способствуют делению и растяжению клеток, тогда как сахароза – дифференциации и созреванию в процессах развития *in vivo* [1].

СС и инвертаза отличаются локализацией в клетке, пространственно-временной экспрессией их генов в онтогенезе и уровнями регуляции. У кукурузы известно 3 гена, кодирующих изоформы СС, которые находятся преимущественно в цитоплазме, хотя некоторые белки могут быть мембраносвязанными. Кроме того, обнаружены изоформы СС, локализованные в органеллах [4, 5]. В зависимости от путей поступления в клетку (через клеточную стенку или плазмодесму) сахароза может гидролизироваться инвертазой клеточных стенок (ИКС), цитоплазматической инвертазой (ЦИ), вакуолярной инвертазой (ВИ), а также расщепляться цитоплазматической СС. Считается, что при поступлении сахарозы через клеточную стенку из-за низкой активности ЦИ образуется ограниченное количество гексоз как сигнальных молекул, и эту функцию приписывают ИКС. В свою очередь, глюкоза и фруктоза инициируют гексозо-основанные сигналы как на мембране, так и в цитоплазме в ходе последующего метаболизма. Аналогично, избыток гексоз может генерировать ВИ, где преимущественно происходит гидролиз сахарозы в процессе роста и развития. Кроме того, ИКС могут стимулировать

патогены и другие специфические факторы [1].

Рассматривается несколько механизмов, посредством которых изменяется активность инвертазы [6]. Среди них компартиментализация ВИ в везикулах предшественников протеаз, которые освобождаются в ответ на сигналы развития и окружающей среды; регуляция специфических ВИ клеточно-ассоциированной киназой 2. Изменения в функционировании инвертазы связывают и с разнообразными группами киназ и фосфатаз, соотнося их с системами восприятия сахаров, патогенов, АБК и других фитогормонов. Кроме того, уделяется внимание регуляции экспрессии генов инвертазы множественными элементами DST (Down Stream) 3'-нетранслируемых областей. В культуре клеток кукурузы ИКС, кодируемая геном *Incw 1*, регулируется сахарами на транскрипционном и на посттранскрипционном уровнях [7].

Что касается обсуждаемых вопросов при трансформации растений, то имеющиеся в литературе данные главным образом касаются выяснения роли ферментов метаболизма сахарозы с применением антисмысловых супрессоров генов или анализа их активности природными агробактериальными штаммами [8, 9]. В данной работе исследовали активности ферментов СС в реакции синтеза сахарозы и её гидролиза инвертазой, предполагая, что *Agrobacterium*-опосредованная трансформация может приводить к изменениям в метаболизме сахарозы каллусов кукурузы, обладающих разной способностью к реализации морфогенетического потенциала.

Материалы и методы

В работе использовали незрелые зародыши (НЗ) инбредных линий 1555 и 1568 (селекции Института физиологии расте-

ний и генетики НАН Украины) и А188 (селекции Института клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины) выделенные на 12–14 день после опыления. Початки стерилизовали 20 мин. в 96% спирте, 40 мин. в 10% растворе хлораминна, трижды промывали стерильной водой. *Agrobacterium*-опосредованную трансформацию проводили согласно частично модифицированному нами методу Ишида и соавт. [10]. Для этого НЗ размером 1,0–1,2 мм, полученные с каждого початка, делили на две части, одну из которых подвергали агробактериальной инфекции ночной культурой штамма LBA 4404, содержащего вектор pSV002 с генами неомицин-фосфотрансферазы и β -глюкуронидазы, а другую часть – неинфицированные НЗ – использовали в качестве контроля. В дальнейшем все этапы культивирования осуществляли параллельно.

НЗ высаживали на агаризованную LS-среду для кокультивации; перед трансформацией обрабатывали ультразвуком частотой 22 кГц в течение 15 с в жидкой LS-inf-среде, инокулировали агробактерией и помещали на LS-As-среду для кокультивации, содержащую 200 мкМ ацетосерингона; кокультивировали 7 дней в темноте при 25 °С. После кокультивации те из них, у которых наблюдался каллусогенез, переносили на LSD-среду, содержащую цефотаксим в концентрации 500 мг/л и селективную концентрацию канамицина – 50 мг/л, субкультивировали в течение 3 пассажей. Контроль высаживали на LSD-среду, не содержащую антибиотиков.

Для изучения роли углеводного метаболизма в общей системе регуляции роста и дифференцировки клеток в процессах морфогенеза *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации проводили сравнительное изучение активности ферментов метаболизма сахарозы – сахарозосинтезы в реакции синтеза, а так-

же вакуолярной и цитоплазматической инвертазы в морфогенном (*KmУК* 1555 и *KmУК* А188) и неморфогенном (*KmУК* 1568) каллусах кукурузы, устойчивых к селективной концентрации антибиотика канамицина. В качестве контроля служили морфогенный (К 1555, К А188) и неморфогенный (К 1568) каллусы, полученные от неинфицированных агробактерией НЗ соответствующих линий.

Сахарозосинтазу (СС) и инвертазу каллусов выделяли из одной навески частично модифицированным нами методом [11]. Навеску каллуса (0,5 г) гомогенизировали в буфере А, содержащем 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЕДТА, 10 мМ ДТТ и 10 мМ MgCl₂. После центрифугирования при 20 000 g супернатант фракционировали сульфатом аммония от 0 до 90% насыщения. Осадок растворяли в минимальном объеме буфера А, диализировали 12 часов в том же буфере, разбавленном в 10 раз. В полученном диализате определяли легкорастворимые белки по Лоури [12].

Активность СС в реакции синтеза определяли по количеству образованной сахарозы в инкубационной смеси (в мкмольях), содержащей Трис-НСl (рН 7,5) – 50, УДФГ – 1, фруктозу – 3, ферментный препарат – 100 мкл [11]. Активность инвертазы в реакции гидролиза сахарозы определяли по количеству образованной фруктозы. Для цитоплазматической инвертазы использовали инкубационную смесь следующего состава: 1/15 КФ буфер, рН 7,0 – 50 мкл, сахароза – 20 мкмоль, ферментный препарат – 100 мкл, для вакуолярной – 1М ацетатный буфер, рН 4,7 – 50 мкл, сахароза – 20 мкмоль, ферментный препарат – 50 мкл [13]. Определяли теми же методами активность СС и инвертазы агробактерии ночной культуры. Для каждой инбредной линии при проведении биохимических исследований использовали каллус, полученный из НЗ нескольких початков. Досто-

верность полученных результатов определяли по критериям Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Для реализации морфогенетического потенциала НЗ, которые подвергали агробактериальной инфекции, использовали ряд питательных сред. Наиболее результативной для исследуемых генотипов оказалась частично модифицированная нами среда LS [10]. При этом каллусогенез для всех генотипов происходил на ранних этапах культивирования *in vitro*, однако индукция побегообразования наблюдалась только для каллуса инбредных линий 1555 и А188.

В каллусах К 1555, К А188, К 1568 было показано разное содержание легкорастворимых белков (рис.1). Так, в клетках К 1555, К А188 оно составляло $70 \pm 1,0$ и $64,0 \pm 4,0$ мг на грамм ткани, тогда как у К 1568 этот показатель был приблизительно в 2,5 раза большим. Неодинаковое содержание белка в каллусах разного типа является, скорее всего, отражением генотипических особенностей биосинтетических процессов разных генотипов, а не различной способностью их клеток к реализации морфогенетического потенциала.

При *Agrobacterium*-опосредованной трансформации происходило повышение содержания белков в морфогенных *КмУК* 1555 и *КмУК* А188 на 136 % и 166 %, соответственно, в то время как у неморфогенного *КмУК* 1568, наоборот, наблюдалось достоверное понижение общего количества легкорастворимых белков на 18% (рис.1). Такие данные позволяют предположить, что в компетентных к агробактериальной инфекции клетках, способных к органогенезу, происходят изменения в процессах биосинтеза белков и/или их стабильности.

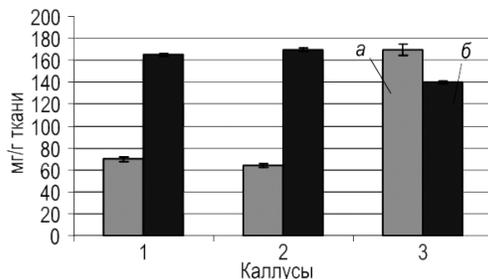


Рис. 1. Содержание легкорастворимых белков в морфогенном (1 – А188, 2 – 1555) и неморфогенном (3 – 1568) каллусах при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации: а – Контроль; б – *КмУК*

Наряду с повышением содержания легкорастворимых белков происходило увеличение удельной активности СС в реакции синтеза сахарозы в морфогенных *КмУК* 1555 и *КмУК* А188 на 138 % и 260 % соответственно, в то время как у неморфогенного *КмУК* 1568 достоверная разница относительно контроля отсутствовала (рис.2).

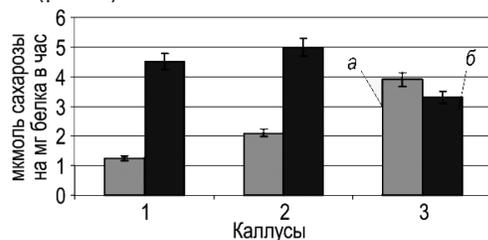


Рис. 2. Удельная активность СС в морфогенном (1 – А188, 2 – 1555) и неморфогенном (3 – 1568) каллусах при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации: а – Контроль; б – *КмУК*

Что касается общей активности СС, то и по этому показателю чётко была видна разница между 2 типами культуры ткани. Если у морфогенных *Км*-устойчивых каллусов она увеличивалась в 8–12 раз, то у неморфогенного *КмУК*1568 наблюдалось хоть и незначительное, но достоверное повышение всего на 38 % (в 1,4 раза) (рис. 3). Значит, несмотря на то, что содержание легкорастворимых белков *Км*-устойчивого неморфогенного каллуса

уменьшалось, в результате агробактериальной инфекции общая активность СС, в отличие от удельной, хоть и незначительно, но достоверно увеличивалась. При этом в суспензии агробактерии активность фермента СС отсутствовала.

Таким образом, при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации штаммом LBA 4404 с векторной конструкцией, содержащей ген неомизинфосфотрансферазы, в морфогенном и неморфогенном *Km*-устойчивых каллусах была установлена значительная разница как общей, так и удельной активности СС в реакции синтеза сахарозы. Следует подчеркнуть, что повышение уровня функционирования этого фермента и содержания белка имеет место в условиях полной элиминации агробактерии антибиотиком цефотаксимом. Тот факт, что наблюдалась чётко выраженная разница в биосинтетических процессах морфогенного и неморфогенного каллусов, позволяет предположить, что инфицирование агробактерией приводит к изменениям экспрессии генов в компетентных к ней клетках, способных к реализации морфогенетического потенциала. Возможно, такие изменения имеют отношение к генам, кодирующим СС. В свою очередь сахароза как регуляторная молекула принимает участие в общей системе генетической регуляции дифференцировки клеток в процессе органогенеза *in vitro*.

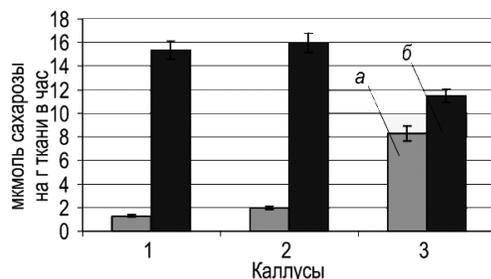


Рис. 3. Общая активность СС в морфогенном (1 – А188, 2 – 1555) и неморфогенном (3 – 1568) каллусах при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации: а – Контроль; б – *KmUK*

Включение сахарозы в метаболизм достаточно интенсивно совершается инвертазой. Как видно из таблицы, в морфогенном и неморфогенном *Km*-устойчивых каллусах происходила стимуляция удельной активности ВИ: у К А188 она повышалась на 177 %, у К 1555 – на 206 %, у К 1568 – на 166 %. Ещё выше была стимуляция общей активности этого фермента. При этом у морфогенного каллуса она составила 750–890 %, в то время как у неморфогенного – 326 %.

То есть, при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации ВИ существенно активируется, что является отражением, с одной стороны, потребности в моносахарах для метаболических превращений, а с другой, не исключено, что они могут быть связаны с сахарозависимыми регуляторными процессами в ходе роста и диф-

Таблица. Активность инвертазы в морфогенном и неморфогенном каллусах при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации кукурузы

Варианты культуры тканей	Кислая инвертаза, мкмоль фруктозы		Щелочная инвертаза, мкмоль фруктозы	
	на г ткани×час	на мг белка×час	на г ткани×час	на мг белка×час
К 188 контроль	5,8±0,2 (100 %)	5,6±0,1 (100 %)	2,6±0,3 (100 %)	2,5±0,1 (100 %)
К188 <i>KmUK</i>	49,7±0,2 (857 %)	15,5±0,1 (277 %)	12,1±2,0 (465 %)	4,3±0,1 (172 %)
К1555 контроль	1,6±0,2 (100 %)	1,6±0,15 (100 %)	1,4±0,0 (100 %)	1,5±0,0 (100 %)
К1555 <i>KmUK</i>	15,9±1,0 (994 %)	4,9±0,3 (306 %)	6,8±0,6 (486 %)	2,1±0,2 (140 %)
К1568 контроль	6,9±0,2 (100 %)	3,2±0,1 (100 %)	5,0±0,5 (100 %)	2,4±0,2 (100 %)
К1568 <i>KmUK</i>	29,4±0,3 (426 %)	8,5±0,1 (266 %)	7,1±0,0 (142 %)	2,1±0,0 (87 %)

ференцировки клеток. Что касается ЦИ (табл.), то в целом её активность ниже вакуолярной в каллусах разного типа, и это соответствует данным, полученным для растительных клеток *in vivo* [1, 2]. Более того, в неморфогенном *KmУК* удельная активность фермента, в отличие от общей, достоверно не отличается. Тем не менее, в морфогенном *KmУК* активность ЦИ также как и ВИ существенно превышает таковые неморфогенного *KmУК*. В суспензии агробактериальных клеток активность ЦИ и ВИ не установлена. В целом, в ферментной системе метаболизма сахарозы в морфогенном *KmУК* наблюдается сопряжение стимуляции активности СС в реакции синтеза сахарозы и её гидролиза инвертазой.

Таким образом, показано, что в морфогенном и неморфогенном каллусах, индуцированных из инфицированных агробактериальным штаммом LBA 4404 незрелых зародышей, имеет место дифференциальная активность ферментов метаболизма сахарозы. Значительная активация сахарозосинтазы в реакции синтеза сахарозы и её включение в метаболизм инвертазой в морфогенном каллусе свидетельствует о важной роли этих ферментов в процессах роста и дифференцировки клеток *in vitro* при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Выводы

Показана генотипическая зависимость функционирования ферментных систем метаболизма сахарозы и содержания белка в морфогенном и неморфогенном каллусах, индуцированных из незрелых зародышей инбредных линий кукурузы. В морфогенном канамицин-устойчивом каллусе в отличие от неморфогенного установлено значительное повышение как активности ферментов синтеза сахарозы – СС и её включения в метаболизм инвертазой, так и содержания легкорастворимых белков, что

свидетельствует о стимуляции метаболических и биосинтетических процессов при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации. Дифференциальная активность сахарозосинтазы в реакции синтеза, а также вакуолярной и цитоплазматической инвертазы канамицин-устойчивых каллусов, обладающих разной способностью к реализации морфогенетического потенциала, позволяет предположить, что сахароза и гексозы являются компонентами общей системы регуляции процессов роста и дифференцировки клеток кукурузы при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации.

Список литературы

1. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2004. – Vol. 7, № 3 – P. 235–248.
2. Сакало В.Д. Регуляция метаболизма сахарозы у свёклы и других культур. – К.: Логос, 2006. – 248 с.
3. Сакало В.Д., Курчий В.М. Гормональная регуляция активности сахарозофосфатсинтазы и сахарозосинтазы сахарной свёклы // *Физиология растений*. – 2004. – Т. 51, № 2. – С. 205–210.
4. Koch K.E., Kurt D.N., Duke E.A., McCarty D.R., Avigne W.A. Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes // *The Plant Cell*. – 1992. – Vol. 4. – P. 59–69.
5. Subbaian C.C., Palaniappan A., Duncan K., Rhoads D.M., Huber S.C., Sachs M.M. Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 281, № 4. – P. 15625–15635.
6. Huang L.-F., Bocoock P.N., Davis J.M., Koch K.E. Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and posttranscriptional mechanisms // *Functional Plant Biology*. – 2007. – № 34. – P. 499–504.
7. Cheng W-H., Tallercioe E.W., Chourey P.S. Sugars modulate in unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw 1*) through its 3' untranslated region in cell suspension culture of maize // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – Vol. 96, № 18. – P. 10512–10517.
8. Zhou R., Cheng L., Dandekar M. Down-regulation of sorbitol dehydrogenase and up-regulation of sucrose synthase in shoot tips of the transgenic apple trees with decreased sorbitol syntpasis //

- J. Exp. Bot. – 2006. – Vol. 57, № 14. – P. 3647–3657.
9. Wachter R., Langhans M., Aloni R., Gotz S., Weilmunster A., Koops A., et al. Vascularization, high-volume solution flow, and localized roles for enzymes of sucrose metabolism during tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens* // Plant Physiology. – 2003. – Vol. 133, № 3. – P. 1024–1037.
 10. Ishida Y., Hiei Y., Komari T. Protocol. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize // Nature protocols. – 2007. – Vol. 2, № 7. – P. 1614–1621.
 11. Sowokinos I.R. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum* // Plant Physiol. – 1976. – Vol. 57. – P. 63–68.
 12. Lowry O.N., Rosebrough N.J., Farr A.J., Randall A.J. Protein measurement with the folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. 192, № 2. – P. 265–275.
 13. Roe J.H. A Colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine // J. Biol. Chem. – 1954. – Vol. 107. – P. 15–22.

Представлена Н.В. Кучуком.
Поступила 8.02.2010.

АКТИВНІСТЬ САХАРОЗОСИНТАЗИ
Й ІНВЕРТАЗИ МОРФОГЕННОГО
ТА НЕМОРФОГЕННОГО КАЛЮСІВ,
ОТРИМАННИХ ІЗ НЕЗРІЛИХ ЗАРОДКІВ
КУКУРУДЗИ (*ZEА MAYS L.*),
ІНФІКОВАНИХ *AGROBACTERIUM*
TUMEFACIENS

О.Ю. Матвеева, В.Д. Сакало, В.М. Курчий,
О.М. Тищенко

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17,
e-mail: oltyko@gmail.com

Порівнювали активності ферментів синтезу та гідролізу сахарози морфогенного і неморфогенного калюсів, індукованих із незрілих зародків інбредних ліній кукурудзи 1555, 1568 та А188 після їхньої *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації штамом LBA 4404, що містить вектор pCB002 із геном неоміцинфосфотрансферази (*nptII*). У *Km*-стійкому (*Km*СК) морфогенному калюсі виявлено значну активацію са-

харозосинтази у реакції синтезу сахарози й інвертази (вакулярної та цитоплазматичної), що включає її у метаболізм. Диференційна активність морфогенного і неморфогенного *Km*СК свідчить про важливу роль сахарози та продуктів її гідролізу у процесах росту й диференціювання клітин за *Agrobacterium*-опосередкованої трансформації.

Ключові слова: кукурудза (*Zea mays L.*), *Agrobacterium*-опосередкована трансформація, калюс, сахарозосинтаза, інвертаза.

THE ACTIVITY OF SUCROSE SYNTHASE AND
INVERTASE OF MORPHOGENIC AND NON-
MORPHOGENIC CALLI OF MAIZE (*ZEА MAYS L.*)
FROM IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS
INFECTED WITH *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

A.Y. Matveyeva, V.D. Sackalo, V.M. Kurchiy,
E.N. Tishchenko

Institute of Plant Physiology and Genetics of NAS
of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17
e-mail: oltyko@gmail.com

Comparative analysis of ferments' activity of both sucrose synthesis and hydrolysis in morphogenic and nonmorphogenic calli, induced from maize inbred lines 1555, 1568 and A188 immature embryos after its' *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA 4404 harboring the vector pCB002 with gene neomycinphosphotransferase II (*nptII*) were investigated. Significant activation for *Km*-tolerant morphogenic callus of the sucrose synthase in the sucrose synthesis reaction and invertase (vacuolar and cytoplasmatic) that include sucrose in the metabolism was observed. Important role of sucrose and its' hydrolysis products at the cell's growth and differentiation processes under *Agrobacterium*-mediated transformation have been shown by differential activity of morphogenic and nonmorphogenic *Km*-tolerant calli.

Keywords: maize (*Zea mays L.*), *Agrobacterium*-mediated transformation, calli, sucrose synthase, invertase.