

УДК 579.254.2:581.143.5

АКТИВНОСТЬ САХАРОЗОСИНТАЗЫ И ИНВЕРТАЗЫ ЭНДОСПЕРМА КУКУРУЗЫ (*ZEА MAYS L.*), ИНФИЦИРОВАННОЙ *IN PLANTA* ОБЕЗОРУЖЕННЫМИ ШТАММАМИ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

А.Ю. МАТВЕЕВА¹, В.Д. САКАЛО¹, В.М. КУРЧИЙ¹, Б.В. МОРГУН²,
 А.В. КОЧЕТОВ³, Е.Н. ТИЩЕНКО¹

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины
 Украина, 03022, г. Киев, ул. Васильковская, 31/17
 e-mail: mgirais@mail.ru

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины
 Украина, 03680, г. Киев, ул. Ак. Заболотного, 148

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук
 Россия, 6300090, г. Новосибирск, пр. Лаврентьева, 10

Получены зерновки инбредной линии кукурузы Л370, инфицированной in planta штаммами Agrobacterium tumefaciens LBA4404 и GV2260, содержащими селективный ген неомицинофосфотрансферазы (nptII), а также соответственно антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы арабидопсиса (pVi2E) и β-глюкуронидазы (pCB002). Проводили сравнительное изучение активности ферментов метаболизма сахарозы и содержания углеводов в эндосперме зерновок, полученных на 21-день после опыления, последующего поколения кукурузы. Под влиянием разных штаммов установлены различия в функционировании сахарозосинтазы (СС), инвертазы клеточных стенок (ИКС), вакуолярной (ВИ) и цитоплазматической (ЦИ) инвертазы. Изменения в активности сахарозосинтазы и инвертазы приводили к значительному повышению содержания сахарозы и уменьшению уровня моносахаров в эндосперме, однако их баланс зависел от используемого штамма и стадии эмбриогенеза. Вместе с тем инфицирование существенно не влияло на содержание крахмала, а на стадии восковой спелости наблюдалось даже незначительное его повышение.

Ключевые слова: кукуруза (*Zea mays L.*), *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta*, сахарозосинтаза, инвертаза.

Введение. При разработке эффективных молекулярных биотехнологий растений с использованием генов, влияющих на метаболизм, важное значение имеет изучение физиолого-биохимических изменений, происходящих в процессе трансгенеза, и их отдалённых последствий на рост, развитие и продуктивность.

Одна из сторон этого вопроса может быть связана с метаболизмом сахарозы, являющейся источником углерода и энергии в растущих и развивающихся нефотосинтетических тканях. Два фермента – сахарозосинтаза (СС, К.Ф.2.4.1.13) и инвертаза (К.Ф.3.2.1.26), катализирующие реакции соответственно синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы, осуществляют баланс между сахарами как сигнальными/регуляторными молекулами и компонента-

© А.Ю. МАТВЕЕВА, В.Д. САКАЛО, В.М. КУРЧИЙ, Б.В. МОРГУН, А.В. КОЧЕТОВ, Е.Н. ТИЩЕНКО, 2011

ми метаболических путей [1, 2]. СС катализирует реакцию между сахарозой и УДФ (или АДФ), в результате чего образуется фруктоза и УДФГ (или АДФГ), используемые для синтеза биополимеров. Эта реакция обратима. Инвертаза необратимо гидролизует сахарозу с образованием глюкозы и фруктозы с последующим их включением в гликолиз и дыхательный метаболизм.

Большинство генов, кодирующих СС, представлено небольшим мультигенным семейством, их экспрессия контролируется сахарозой [3]. СС находится преимущественно в цитоплазме, однако в последнее время обнаружены изоформы, не только связанные с мембраной, но и локализованные в органеллах [4–6]. У кукурузы известны 3 гена (*sus1*, *sus2*, *sh1*), кодирующих изоформы СС (SUS1, SUS2, SUS-SH1, соответственно) [3]. Что касается инвертазы, существует несколько её форм, отличающихся оптимумом pH и локализацией в клетке: щелочная цитоплазматическая инвертаза (ЦИ), кислая вакуолярная (ВИ) и кислая инвертаза, связанная ионными связями с клеточной стенкой (ИКС) [1]. Каждая из этих форм представлена несколькими изоформами и кодируется небольшим семейством генов, регуляция экспрессии которых осуществляется на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях [1, 7–9]. Формы инвертазы характеризуются тканеспецифичностью и направленностью потоков образованных ими гексоз в различные метаболические пути в онтогенезе растений. Другую их функцию связывают с инициацией гексозо-основанных сигналов на мембране и в цитоплазме, где, в зависимости от путей поступления сахарозы в клетку, определяющее значение имеет ВИ и ИКС ввиду обычно низкой активности ЦИ [1].

Вопросы, связанные с углеводным обменом в процессе трансгенеза растений, исследованы крайне слабо. Ранее нами показано, что при *Agrobacterium*-опосредованной трансформации кукурузы происходит значительное повышение активности ферментов синтеза сахарозы (СС) и ее включения в метаболизм (инвертазой) в морфогенном канамицин-устойчивом каллусе по сравнению как с нетрансформированным морфогенным, так и с неморфогенным каллусами [10]. Учитывая важную роль альдоз в повышении активности двухкомпонентной VirA-VirG – регуляторной системы [11], было предположено, что через гексозы (в частности Д-глюкозу) может осуществляться взаимодействие в путях передачи сигналов, стимулирующих, с одной стороны, агробактериальную *vir*-регуляторную систему процессинга и переноса рекомбинантных ДНК, а с другой – процесс роста и дифференцировки клеток растений.

Целью данной работы был сравнительный анализ активности ферментов СС и инвертазы, а также содержания растворимых углеводов и крахмала в эндосперме последующего поколения кукурузы, трансформированной *in planta* с помощью штаммов *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 и GV2260, содержащих векторные конструкции (pBi2E) и (pCB002).

Материалы и методы

Agrobacterium-опосредованную трансформацию инбредной линии кукурузы Л370 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины, г. Киев) проводили *in planta* частично модифицированным нами методом Чумакова и соавт. [12]. Суспензию клеток агробактериальных штаммов LBA4404 (pBi2E) и GV2260 (pCB002) наносили на предварительно изолированные пестичные нити с последующим опылением пылью этой же линии. Агробактериальные штаммы на-

ращивали в жидкой LB-среде при 200 об/мин, 28 °C в течение 12 час. Обе векторные конструкции содержали селективный ген неомицинфосфотрансферазы (*nptII*) *E. coli*. В отличие от pCB002, которая включала также репортёрный ген β-глюкуронидазы *E. coli*, pBi2E содержала дублированный участок гена пролиндегидрогеназы арабидопсиса (*A. thaliana*), расположенный как инвертированный повтор под 35S промотором вируса мозаики цветной капусты. Зрелые зерновки стерилизовали 20 мин в 96 %-ном спирте, 40 мин в 10 %-ном растворе хлорамина, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и проращивали на модифицированной MS-среде с добавлением селективного агента – канамицина (Km) в концентрации 50 мг/л при 25 °C с 16-часовым фотопериодом в течение 2-х пассажей продолжительностью в 2 недели.

ДНК выделяли из зрелых зерновок и листьев *Km*-устойчивых растений (P0) частично модифицированным методом Деллапорта [16]. Наличие гена *nptII* определяли с использованием праймеров: 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA (F) и 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCGCTCAGAAG (R). Условия амплификации ДНК: предденатурация 94 °C, 4 мин; 35 циклов: денатурация – 94 °C, 30 с; реассоциация – 53 °C, 30 с; синтез – 72 °C, 30 с; конечная элонгация – 72 °C, 10 мин (амплификатор Mastercycler 5332 Eppendorf Personal). Реакционная смесь содержала 10 нг ДНК. Отсутствие примесей *A. tumefaciens* в растительных тканях анализировали, используя праймеры к гену *virD1* для штамма GV2260 (pCB002) и *virC* для штамма LBA4404 (pBi2E), ожидаемые размеры ампликонов которых составляли 432 п.н. (б) и 730 п.н. (в). Условия амплификации ДНК: предденатурация 94 °C, 4 мин; 35 циклов: денатурация – 94 °C, 30 с; реассоциация – 57 °C, 30 с; синтез – 72 °C, 15 с; конечная элонгация – 72 °C, 10 мин для *virD1*

и денатурация – 94 °C, 30 с; реассоциация – 60 °C, 30 с; синтез – 72 °C, 45 с; конечная элонгация – 72 °C, 10 мин – для *virC*. Праймеры, которые использовали, для *virD1*: 5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A –3' и 5'-GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A –3' и для *virC*: 5'-ATC ATT TCA AGT AGC GAC T –3' и 5'-AGC TCA AAC CTG CTT C –3'. Электрофорез ДНК проводили в 1,2 %-ном агарозном геле при напряжённости 5 В/см в течение 45 мин в буфере 0,5xTBE в присутствии бромистого этидия.

Углеводный обмен изучали в зерновках тех початков, при произвольной выборке которых ПЦП-анализ ДНК показал наличие гена *nptII*. Активность ферментов метаболизма сахарозы изучали в эндосперме, изолированном из зерновок на 21 день после опыления, первого поколения кукурузы (P1). Навеска растительной ткани составляла по 0,5 г. Легкорастворимые белки и активность ферментов СС в реакции синтеза сахарозы, ВИ и ЦИ P1-растений, а также содержание сахарозы, моносахаров и крахмала на стадиях молочно-восковой (P1-растения) и восковой (P0- и P1-растения) определяли методами, описанными ранее [10, 13]. В реакции расщепления сахарозы состав инкубационной смеси (в мкмольях): цитратный буфер, pH 6,4 – 50, УДФ – 2,5 (или АДФ – 5,0), сахароза – 20, ферментный препарат – 100 мкл. Активность СС определяли по количеству образованной фруктозы арсеномолибдатным методом [14]. Промытый осадок, оставшийся после центрифугирования клеточного гомогената, инкубировали 6 час при 4 °C в буфере, содержащем 1M NaCl, постоянно встряхивая. После солиubilизации белковую фракцию диализировали и использовали для определения активности ИКС [10]. Инкубационная среда для определения ИКС была следующего состава: 1M ацетатный буфер, pH 4,7 – 50 мкл, сахароза – 20 мкмоль, ферментный препа-

рат – 50 мкл. В агробактериальном штамме ночной культуры активность СС и инвертазы, определённая теми же методами, отсутствовала. В таблицах и на рисунках представлены средние значения и стандартные отклонения 6 аналитических и 2 биологических повторностей опыта. Достоверность полученных результатов определяли по критериям Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Для оптимизации условий *Agrobacterium*-опосредованной трансформации кукурузы *in planta* варьировали концентрациями агробактериальной суспензии клеток и компонентами среды инокуляции. Початки со зрелыми зерновками образовывались в результате обработки предварительно обрезанных пестичных нитей суспензией клеток анализируемых штаммов *A. tumefaciens*, концентрация которых составляла $\sim 10^6 - 10^8$ кл/мл в среде инокуляции, не содержащей ацетосирен-

гона. Получены зерновки инбредной линии кукурузы Л370, которые по морфологическим показателям не отличались от контроля. Компетентность к трансформации определяли по наличию гена *nptII* в суммарной ДНК зрелых зерновок и листьев *Km*-устойчивых растений (рис. 1). Отсутствие примесей *A. tumefaciens* в растительных тканях анализировали, используя праймеры к гену *virD1* для штамма GV2260 (pCB002) и *virC* для штамма LBA4404 (pBi2E).

Данные ПЦР-анализа свидетельствуют в пользу того, что в зерновках початков и в листьях растений, устойчивых к канамицину, осуществляется перенос гена *nptII* в клетки и, наиболее вероятно, её интеграция в ядерный геном кукурузы.

Ответная реакция клеток каллуса кукурузы на инфицирование обезоруженными агробактериальными штаммами сопровождалась изменениями в активности ферментов метаболизма сахарозы [10],

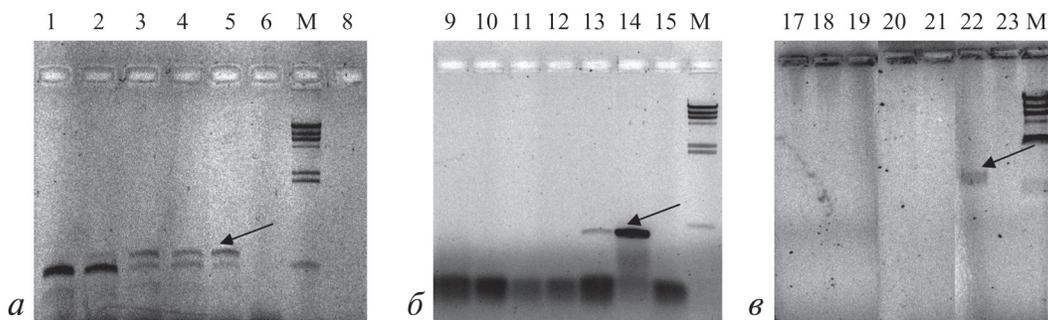


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредной линии кукурузы Л370, инфицированной *in planta*, с использованием праймеров к гену *nptII* (а), а также праймеров к генам *virD1* (б) и *virC* (в): 1, 9, 17 – ДНК зерновок контрольных (неинфицированных) растений; 2 и 3 – ДНК зерновок растений, инфицированных штаммами GV2260 (pCB002) и LBA4404 (pBi2E), соответственно; 4 – ДНК листьев P0-растений, устойчивых к селективной концентрации канамицина (GV2260, pCB002); 5 и 6 – ДНК листьев P0-растений, соответственно устойчивых и неустойчивых к селективной концентрации канамицина (LBA4404, pBi2E); 8, 15, 23 – негативный контроль – те же условия амплификации без ДНК. 10, 11 – ДНК зерновок P0-растений, инфицированных штаммом GV2260 (pCB002); 12 – ДНК листьев P0-растений, устойчивых к селективной концентрации канамицина (GV2260, pCB002); 13 – положительный контроль – ДНК рапса, показавшая наличие *virD1*; 14 – положительный контроль – ДНК штамма GV2260 (pCB002); М – маркер молекулярных масс – ДНК бактериофага λ , гидролизованная *Hind* III; 18 – ДНК зерновок растений, инфицированных штаммом LBA4404 (pBi2E); 19, 20 – ДНК листьев P0-растений, устойчивых и неустойчивых к селективной концентрации канамицина (LBA4404, pBi2E); 21 – ДНК листьев P1-растений (LBA4404, pBi2E); 22 – положительный контроль – ДНК штамма LBA4404 (pBi2E). Стрелками указаны ампликоны, ожидаемый размер которых составляет 649 п.н. (а), 432 п.н. (б) и 730 п.н. (в)

Таблица 1. Активность сахарозосинтазы эндосперма зерновок кукурузы, изолированного на 21 день после опыления

Вариант	Расщепление сахарозы (УДФ), мкмоль фруктозы		Расщепление сахарозы (АДФ), мкмоль фруктозы		Синтез сахарозы, мкмоль	
	на мг белка в час	на г ткани в час	на мг белка в час	на г ткани в час	на мг белка в час	на г ткани в час
Контроль	14,9±0,6*	116,8±0,8*	0,4±0,04*	3,1±0,03*	12,6±0,1*	100.0±1,6*
LBA4404(pBi2E)	7,8±0,1**	79,3±1,6**	0,4±0,01**	3,7±0,03**	11,8±0,3*	118,8±3,0**
GV2260(pCB002)	12,8±0,7**	98,4±5,6**	0,2±0,01**	1,6±0,02**	12,4±0,01	95,2±0,0**

Примечания: * – достоверно между контролем и анализируемыми штаммами; ** – достоверно между анализируемыми штаммами.

определяющих баланс сахарозы и гексоз которые, как предполагается [1], принимают участие в генетической регуляции физиолого-метаболических процессов. Не исключено, что *Agrobacterium*-опосредованная трансформация *in planta* разными штаммами с векторными конструкциями, содержащими различные целевые гены, может оказывать неодинаковый эффект на углеводный обмен в ходе эмбриогенеза.

У крахмалсодержащих растений, к которым относится кукуруза, сахароза, являясь источником нуклеозиддифосфатсахаров – субстратов для биосинтеза крахмала в эндосперме, включается в метаболизм сахарозосинтазой [2]. Другая её предполагаемая функция связана с дифференцировкой клеток и созреванием. В табл. 1 и на рис. 2 представлены результаты исследования активности сахарозосинтазы эндосперма зерновок на

стадии молочно-восковой спелости Р1-растений кукурузы. Реакция расщепления сахарозы, в результате которой образуются нуклеозиддифосфатсахара и фруктоза, проведена с двумя субстратами – АДФ и УДФ в концентрациях, соответствующих максимальной скорости реакции.

В эндосперме зерновок инбредной линии Л370 интенсивность расщепления сахарозы с субстратом УДФ значительно выше, чем с АДФ. Что касается реакции расщепления сахарозы с УДФ, инокуляция генеративных тканей кукурузы обеими штаммами в эндосперме последующего поколения приводила к снижению как удельной, так и общей активности СС, причём больший уровень ингибирования был характерен для штамма LBA4404 (pBi2E). То есть, при агробактериальной инфекции может происходить уменьшение образования УДФГ, являющейся субстратом для синтеза полисахаридов клеточных стенок. Низкая активность СС в реакции образования АДФГ, которая под влиянием GV2260 (pCB002) в отличие от другого штамма 2-кратно снижалась, позволяет предположить, что этот путь биосинтеза крахмала не является определяющим. По-видимому, основным источником для синтеза крахмала крахмалсинтетазой является АДФГ-пирофосфорилаза.

Наряду с расщеплением сахарозы СС происходит её синтез. Под влиянием агробактериальных штаммов различия в удельной активности СС в реакции синтеза не-

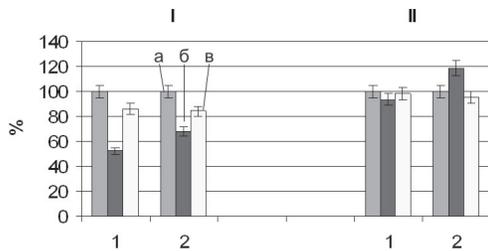


Рис. 2. Удельная (1) и общая (2) активность СС (% от контроля): I – расщепления сахарозы с УДФ, II – синтез сахарозы в эндосперме зерновок первого поколения кукурузы; а – контроль; б – LBA4404; в – GV2260

существенны. Вместе с тем, при использовании LBA4404 (pBi2E) наблюдалось повышение общей активности СС (на 19 %), возможно, как результат увеличения количества белка этого фермента, поскольку в эндосперме превалировало содержание легкорастворимых белков по сравнению с контролем (табл. 2). Что касается GV2260 (pCB002), то незначительное уменьшение только общей активности СС, наоборот, сопряжено с уменьшением количества этих белков.

Следует отметить, что отношения реакций синтез/расщепление сахарозы различались как между контролем и проанализированными штаммами, так и между последними. В контроле активность СС в реакции синтеза сахарозы ниже, чем в реакции расщепления, отношение этих реакций равнялось 0,86. Под влиянием LBA4404 (pBi2E) и GV2260 (pCB002) этот показатель составил 1,51 и 0,97, соот-

ветственно. Таким образом, только при использовании первого штамма синтетическая направленность сахарозосинтазы преобладала над реакцией расщепления. Возможно, это являлось отражением того, что целевым геном является антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы. Повышение содержания пролина через цепь биохимических реакций, связанных с глутаматом, может приводить к дополнительному синтезу глюкозы и, как результат, изменению в системе регуляции, контролируемой гексозой. Кроме того, различное влияние агробактериальных штаммов может быть связано с функциональной активностью разных изоформ фермента.

Другим путём включения сахарозы в метаболизм в эндосперме зерновок является её гидролиз инвертазой с последующим использованием моносахаров в процессах гликолиза и дыхания. В отличие от

Таблица 2. Активность инвертазы и содержание белков в эндосперме зерновок, изолированном на 21 день после опыления, Р1-растений кукурузы

Вариант	Удельная активность, мкмоль фруктозы на мг белка в час	Общая активность, мкмоль фруктозы на г ткани в час
<i>Вакуолярная (кислая) инвертаза (ВИ)</i>		
Контроль	1,95 ± 0,15*	15,20 ± 1,10*
LBA4404 (pBi2E)	2,65 ± 0,05*	26,75 ± 0,65**
GV2260(pCB002)	2,30 ± 0,10*	17,60 ± 0,50**
<i>Цитоплазматическая (щелочная) инвертаза (ЦИ)</i>		
Контроль	1,83 ± 0,06*	14,3 ± 0,3*
LBA4404 (pBi2E)	1,85 ± 0,15	18,65 ± 1,25**
GV2260 (pCB002)	1,10 ± 0,10*	8,5 ± 0,5**
<i>Инвертаза клеточных стенок (кислая, ИКС)</i>		
Контроль	2,65 ± 0,15	4,50 ± 0,40
LBA4404 (pBi2E)	15,90 ± 2,1**	27,10 ± 5,6**
GV2260 (pCB002)	3,05 ± 0,25**	5,2 ± 0,5**
<i>Содержание белков, мг на грамм ткани:</i>		
	<i>легкорастворимых</i>	<i>клеточных стенок</i>
Контроль	7,95 ± 0,55*	1,65 ± 0,35
LBA4404 (pBi2E)	10,10 ± 0,50**	1,75 ± 0,15
GV2260 (pCB002)	7,75 ± 0,05**	1,70 ± 0,01

Примечание: Контроль – активность инвертазы кукурузы, нетрансформированной обезоруженными штаммами.

СС инвертаза катализирует реакцию гидролиза необратимо, в результате образуется две гексозы, которые, как предполагается [1], являясь потенциальными сигнальными и регуляторными молекулами, связаны также с пролиферацией и растяжением клеток. На раннем этапе эмбриогенеза кукурузы, как и у других крахмалсодержащих злаков, в контрольных растениях активность всех 3-х форм инвертазы была невысокой (табл. 2, рис. 3).

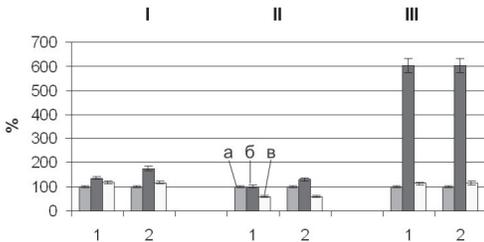


Рис. 3. Удельная (1) и общая (2) активность инвертазы: I – VI, II – CI, III – ИКС в эндосперме зерновок P1-растений кукурузы; а – контроль; б – LBA4404; в – GV2260 (% от контроля)

Обращает на себя внимание тот факт, что под влиянием LBA4404 (pVi2E) происходило 6-кратное повышение удельной и общей активности ИКС (рис. 3). В то же время варьирование в функциональной активности VI и CI было не столь резко выражено. В отличие от кислых форм инвертазы, удельная и общая активность которых, хотя и в разной степени, но повышалась, ответная реакция щелочной инвертазы на агробактериальную инфекцию была неоднозначной. При инфицировании GV2260 (pCB002) удельная и общая активность CI соответственно на 66 и 68 % снижались, тогда как при использовании LBA4404 (pVi2E) изменений в удельной активности не наблюдалось, однако происходила стимуляция общей её активности, вероятно за счёт увеличения количества белка фермента. В целом, полученные данные свидетельствуют в пользу существующего в литературе положения о том, что избыток гексоз, принимающих участие

в путях передачи сигналов и на мембране, и в цитоплазме в ходе метаболизма сахарозы, образуется преимущественно за счёт вакуолярной инвертазы и апопластной инвертазы клеточных стенок. Особенности последней – значительный диапазон варьирования ее активности при инфекции разными агробактериальными штаммами. Это не удивительно, так как биотические стрессоры могут оказывать влияние на функционирование ферментов метаболизма сахарозы [15]. К их числу как патоген, очевидно, относится *Agrobacterium tumefaciens* – грамотрицательная почвенная бактерия, прикрепление которой к клеточным стенкам растений при инфицировании, стимулируется фенолами и моносахарами, в частности D-глюкозой. Многократное повышение активности ИКС под влиянием LBA4404 (pVi2E) в эндосперме последующего поколения кукурузы позволяет предположить об изменении в регуляции экспрессии генов фермента ИКС и его активных центров, которые индуцируются ещё при трансформации генеративных тканей растений *in planta*.

В результате различий активности ферментов синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости P1-растений наблюдались изменения в содержании моносахаров и сахарозы (табл. 3). По сравнению с контролем происходило значительное снижение гексоз при одновременном повышении сахарозы. При этом увеличение отношения сахарозы к моносахарам было выше при инфицировании LBA4404 (pVi2E), чем GV2260 (pCB002), тогда как абсолютное значение сахарозы было ниже. Наблюдаемая специфичность баланса этих углеводов является результатом преобладания синтетической направленности активности сахарозосинтазы под влиянием первого штамма, несмотря на повышенный уро-

Таблица 3. Содержание углеводов в эндосперме зерновок на стадиях молочно-восковой и восковой спелости растений кукурузы, инфицированной GV2260 (pCB002) и LBA4404 (pBi2E)

	Вариант	Моносахара, мкмоль на г ткани	Сахароза, мкмоль на г ткани	Крахмал, мкмоль глюкозы на г ткани
Молочно-восковая спелость	Контроль	77,3±0,6*	187,4±5,9*	0,73±0,02
	P1-LBA4404 (pBi2E)	43,3±1,1**	300,8±5,3**	0,78±0,01
	P1-GV2260 (pCB002)	53,6±0,8**	324,6±2,7**	0,74±0,01
Восковая спелость	Контроль	6,2±0,2*	81,3±0,0*	2,11±0,13*
	P0-LBA4404 (pBi2E)	5,4±0,1**	98,7±0,5**	2,22±0,31
	P1-LBA4404 (pBi2E)	2,1±0,01**	53,8±2,1**	2,33±0,07*
	P0- GV2260 (pCB002)	4,4±0,1**	71,3±0,5**	1,87±0,05*
	P1-GV2260 (pCB002)	3,8±0,2**	53,8±1,1**	2,31±0,05*

вень активности ИКС и ЦИ. В то же время инфицирование обезоруженными штаммами агробактерий не оказывало влияния на интенсивность крахмалообразования.

В эндосперме зрелых зерновок существенно снижалось содержание гексоз, особенно ощутимо под влиянием агробактериальной инфекции в P1-растениях. Что касается сахарозы, то её содержание в эндосперме на стадии восковой спелости значительно ниже, чем молочно-восковой. При этом только в P0-растениях, инфицированных штаммом LBA4404 (pBi2E), наблюдалось её повышение (на 21 %), а в остальных вариантах – понижение. Кроме того, независимо от используемого штамма содержание сахарозы было выше в зрелых зерновках P0-растений, чем P1-растений. Важно, что на стадии восковой спелости так же, как и молочно-восковой не происходило значительных изменений в содержании крахмала. Если в зрелых зерновках P0-растений под влиянием GV2260 (pCB002) в отличие от LBA4404 (pBi2E) содержание крахмала снижалось (на 13 %), то в P1-растениях, независимо от штаммов, отмечено даже его повышение (на 10 %).

Выводы

Установлено различное влияние штаммов *Agrobacterium tumefaciens* GV2260

(pCB002) и LBA4404 (pBi2E) на функционирование ферментов метаболизма сахарозы – СС и инвертазы – в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости последующего поколения кукурузы, инфицированной *in planta*:

Показано значительное снижение удельной и общей активности СС в реакции расщепления с субстратом УДФ в эндосперме зерновок, причём больший уровень ингибирования наблюдался под влиянием LBA4404 (pBi2E). Вместе с тем, в реакции синтеза сахарозы существенно изменялась только общая активность СС. В результате, в отличие от GV2260 (pCB002), преобладала биосинтетическая направленность реакции.

Ответная реакция на агробактериальную инфекцию проявлялась в различиях в уровне активации кислых форм инвертазы (ВИ и ИКС) в эндосперме, среди которых наиболее существенное увеличение удельной и общей активности (6-кратное) наблюдалось для ИКС под влиянием LBA4404 (pBi2E). Этот же штамм стимулировал общую активность щелочной (ЦИ) инвертазы, тогда как GV2260 (pCB002), наоборот, ингибировал активность ЦИ.

Изменения в активности сахарозосинтазы и инвертазы приводили к значительному повышению содержания сахарозы и уменьшению уровня моносахаров в эн-

досперме, однак їх баланс залежав від використовуваного штамма та стадії ембріогенезу. Разом з тим інфікування суттєво не впливало на вміст крохмалю, а на стадії воскової спелості першого покоління спостерігалося навіть незначне його підвищення.

Список літератури

1. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2004. – Vol. 7. – P. 235–248.
2. Сакало В.Д. Регуляція метаболізму сахарози у свёкли та інших культур. – К.: Логос, 2006. – 248 с.
3. 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.
4. Duncan K. A., Heber S.C. Sucrose synthase oligomerization and F-actin association are regulated by sucrose concentration and phosphorylation // *Plant Cell Physiology*. – 2007. – Vol. 48, № 11. – P. 1612–1623.
5. Hardin S.C., Duncan K. A., Heber S.C. Determination of structural requirement and probable regulation effectors for membrane association of maize sucrose synthase1 // *Plant Physiology*. – 2006. – Vol. 141, № 3. – P. 1106–1119.
6. 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 // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281, № 4. – P. 15625–15635.
7. Cheng W-H., Tallercio E.W., Chourey P.S. Sugar 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 // *PNAS*. – 1999. – Vol. 96. – P. 10512–10517.
8. Ye Jin, Di-An Ni, Yong-Ling Ruan Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level // *The Plant Cell*. – 2009. – Vol. 21. – P. 2072–2089.
9. Huang L.-F., Voscock P.N., Davis J.M., Koch K.E. Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms // *Functional Plant Biology*. – 2007. – № 34. – P. 499–504.
10. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Активність сахарозосинтази та інвертази морфогенного та неморфогенного каллусів, отриманих із незрих зародків кукурузи (*Zea mays* L.) інфікованих *Agrobacterium tumefaciens* // Вісник Українського товариства генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, № 1. – С. 18–24.
11. Gelvin S. B. *Agrobacterium*-Mediated plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2003. – Vol. 67. – P. 16–37.
12. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Трансформація кукурузи шляхом інюкаляції агробактеріями пестических нитей in planta // *Генетика*. – 2006. – Т. 42, № 8. – С. 1083–1088.
13. Сакало В.Д., Курчий В.М. Активність сахарозосинтази та інвертази в етіолованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників // *Фізіологія та біохімія култь. рослин*. – 2009. – Т. 41, № 5. – С. 400–407.
14. Somogyi M. Notes on sugar determination // *J. Biol. Chem.* – 1952. – Vol. 195, № 1. – P. 18–23.
15. Sturm A. Tang G-Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // *Trends Plant Sci.* – 1999. – Vol. 11. – P. 707–726.
16. Дрейпер Дж., Скотт Р. Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. – М.: Мир, 1991. – 408 с.

Представлена М.В. Кучуком
Надійшла 11.03.2011

АКТИВНІСТЬ САХАРОЗОСИНТАЗИ ТА ІНВЕРТАЗИ ЕНДОСПЕРМУ КУКУРУДЗИ (*ZEa MAYS* L.), ІНФІКОВАНОЇ *IN PLANTA* ОБЕЗЗБРОЄНИМИ ШТАМАМИ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

О.Ю. Матвеева, В.Д. Сакало, В.М. Курчий¹,
Б.В. Моргун², О.В. Кочетов³, О.М. Тищенко¹

¹Інститут фізіології рослин і генетики НАН України
Україна, 03022, Київ, вул. Васильківська, 31/17
e-mail: oltyko@gmail.com

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії
НАН України. Україна, 03680, Київ, вул. Академіка
Заболотного, 148

³Інститут цитології і генетики Сибірського відділення Російської академії наук. Росія, 6300090,
м. Новосибірськ, пр. Лаврентьева, 10

Отримано зернівки інбредної лінії кукурудзи
ЛЗ70, інфікованої in planta штамами *Agrobac-*

terium tumefaciens LBA4404 й GV2260, що містять селективний ген неоміцинофосфотрансферази (*nptII*), а також відповідно антисмисловий супресор гена проліндегідрогенази арабідопсіса (pBi2E) та β-глюкуронідази (pCB002). Проводили порівняльний аналіз активності ферментів метаболізму сахарози й вмісту вуглеводів в ендоспермі зернівок наступного покоління кукурудзи, отриманому на 21 день після запилення. Під впливом різних штамів встановлено відмінності у функціонуванні сахарозосинтази (СС), інвертази клітинних стінок (ІКС), вакулярної (ВІ) й цитоплазматичної (ЦІ) інвертази. Зміни в активності сахарозосинтази й інвертази призводили до значного підвищення вмісту сахарози й зменшенню рівня моноцукрів в ендоспермі, однак їхній баланс залежав від штам, що використовувався й стадії ембріогенезу. Разом із тим інфікування названими штамми суттєво не впливало на вміст крохмалю, а на стадії воскової стиглості спостерігали навіть незначне його підвищення.

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

SUCROSE SYNTHASE AND INVERTASE ACTIVITY IN ENDOSPERM OF MAIZE (*Zea mays* L.) INFECTED IN PLANTA BY DISARMED STRAINS OF *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

A. Y. Matveyeva, V. D. Sackalo, V. M. Kurchiy¹, B. V. Morgun², A. V. Kochetov³, E. N. Tishchenko¹

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Science of Ukraine

Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska str., 31/17
e-mail: oltyko@gmail.com

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Science of Ukraine
Ukraine, 03680, Kyiv, Ac. Zabolotnogo str., 148

³Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Science
Russia, 6300090, Novosibirsk, Lavrentev's pr., 10

Corn seeds of inbred line L370 infected *in planta* by strains *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and GV2260 harboring selective gene of neomycinophosphotransferase (*nptII*), as well as antisense suppressor of arabidopsis prolindehydrogenase gene (pBi2E) and β-glucuronidase (pCB002) were obtained. Comparative studying of sucrose metabolism ferments activity and carbohydrate content in the endosperm of next generation maize, received on the 21 day after pollination, was studied. Under influence of the different strains differences at the functioning of sucrose synthase (SS), cell-wall invertase (CWI), vacuolar (VI) and cytoplasmic (CI) invertase are determined. Changes in the sucrose synthase and invertase activity lead to substantial increase of sucrose content and decrease of monosugars range in the endosperm, though their balance depended from the used strain and embryogenesis stage. At once contamination by the used strains essentially did not effect on the starch content, while on the waxy ripeness stage of the P1-plants was observed even insignificant his rise.

Key words: maize (*Zea mays* L.), *Agrobacterium*-mediated transformation *in planta*, sucrose synthase, invertase.