

МЕТАБОЛИЗМ САХАРОЗЫ НА РАННИХ ЭТАПАХ ОНТОГЕНЕЗА КУКУРУЗЫ (*Zea mays* L.), ТРАНСФОРМИРОВАННОЙ *in planta* ОБЕЗОРУЖЕННЫМИ ШТАММАМИ *Agrobacterium tumefaciens*

Е. Н. Тищенко¹

В. Д. Сакало¹

А. Ю. Матвеева¹

В. М. Курчий¹

Б. В. Моргун²

А. В. Кочетов³

¹Институт физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, Киев

³Институт цитологии и генетики Сибирского отделения РАН,
Новосибирск

E-mail: oltyko@gmail.com

Проведено сравнительное изучение активности энзимов углеводного метаболизма инбредной линии кукурузы ЛЗ70, трансформированной *in planta* с помощью агробактериальных штаммов LBA4404 и GV2260, содержащих соответственно векторные конструкции pBi2E и pCB002. Показаны специфичность функционирования вакуолярной, цитоплазматической инвертазы, а также инвертазы клеточных стенок и сахарозосинтазы (СС), а также изменения в содержании сахарозы, моносахаров, крахмала и протеинов в побегах 9-суточных этиолированных проростков и в листьях 20-суточных растений. Большой ингибирующий эффект на активность энзимов гидролиза и расщепления сахарозы оказывал штамм LBA4404 (pBi2E). Вместе с тем, в реакции синтеза дисахарида варьирование в функционировании СС между используемыми штаммами являлось тканеспецифичным и было связано как со снижением, так и с повышением ее активности. Полученные данные свидетельствуют о различном влиянии обезоруженных агробактериальных штаммов на функционирование энзимов, включающих в метаболизм сахарозу, а также на баланс гексоз и сахарозы.

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

Agrobacterium-опосредованная генетическая трансформация — перспективное направление молекулярной биотехнологии, основным преимуществом которого является возможность интеграции единичных копий Т-ДНК, содержащих комплекс целевых генов, в транскрипционно-активные области ядерного генома, что повышает вероятность стабильной экспрессии трансгенов в ряду поколений растений, в том числе и кукурузы [1–3]. Успешность технологических решений во многом определяется пониманием генетических и физиологических аспектов процесса взаимодействия в системе агробактерия — растение, а также происходящих в них метаболитических изменений в ответ на инфицирование различными обезоруженными штаммами.

Критическим этапом является интродукция Т-ДНК Ti-плазмиды в клетки растений

и ее сайтспецифическая интеграция в ядерный геном. Этот процесс инициируется активацией двухкомпонентной регуляторной системы VirA-VirG в ответ на появление фенольных соединений и моносахаров (альдоз), синтезированных в пораненных или активно растущих растительных клетках. Другими сигналами являются пониженные значения pH (4,8–5,5) и PO_4^{3-} [4–8]. Присутствие фенолов обязательно для *vir*-индукции, в то время как альдозы повышают чувствительность агробактерии к фенолам, значительно увеличивая активность VirA. Эта мембраносвязанная киназа подвергается аутофосфорилированию, переносит фосфорильную группу на остаток аспартата VirG, инициирующего транскрипцию *vir*-генов. Физическая связь фенолов и pH-сигналов с VirA не установлена, тогда как индуци-

руемое сахарами повышение экспрессии *vir*-генов осуществляется через ChvE — хромосомно-кодируемый протеин, который специфично связывает, в частности, D-глюкозу [5, 6].

Способность VirA-VirG- системы воспринимать разнообразие фенолов и моносахаров определяет широкий круг растений-хозяев агробактерии. С другой стороны, обращают на себя внимание гексозы, которые, согласно современным представлениям, рассматриваются в качестве сигнальных и регуляторных молекул, принимающих участие в процессах развития растений. При этом важная роль в установлении баланса между сахарами как сигнальными/регуляторными молекулами и компонентами метаболических путей принадлежит энзимам метаболизма сахарозы [9, 10]. Ранее нами установлено, что на начальных этапах органогенеза *in vitro*, индуцированного из клеток незрелых зародышей кукурузы после их трансформации с помощью *Agrobacterium tumefaciens*, происходит повышение активности энзима синтеза сахарозы — сахарозосинтазы и ее включение в метаболизм инвертазой [11]. В этой связи мы предполагаем, что через гексозы может осуществляться взаимодействие в путях передачи сигналов, активирующих, с одной стороны, агробактериальную *vir*-регуляторную систему процессинга и переноса рекомбинантных ДНК, а с другой — процесс роста и дифференцировки клеток в ходе органогенеза *in vitro*.

Основными энзимами, включающими сахарозу в метаболизм, являются инвертаза (К.Ф.3.2.1.26) и сахарозосинтаза (К.Ф.2.4.1.13) [9–11], гены которых различаются пространственно-временной экспрессией в процессе онтогенеза и уровнями регуляции [12–15]. Существует несколько форм инвертазы, отличающихся оптимумом pH и локализацией в клетке: щелочная цитоплазматическая инвертаза (ЦИ), кислая вакуолярная (ВИ) и кислая инвертаза, имеющая ионные связи с клеточной стенкой (ИКС). Каждая из форм инвертазы кодируется небольшим семейством генов и представлена несколькими изоформами [16, 17]. Формы инвертазы характеризуются тканеспецифичностью и направленностью потоков образованных ими гексоз в различные метаболические пути в онтогенезе растений. Другую их функцию связывают с инициацией гексозооснованных сигналов на мембране и в цитоплазме, где в зависимости от путей поступления сахарозы в клетку определяющее значение имеют ВИ и ИКС из-за обычно низкой активности ЦИ [9, 11]. Большинство генов, ко-

дирующих СС, представлено небольшим мультигенным семейством, их экспрессия контролируется сахарозой. У кукурузы известны 3 гена (*sus1*, *sus2*, *sh1*), кодирующих изоформы СС (SUS1, SUS2, SUS-SH1, соответственно), которые находятся преимущественно в цитоплазме, хотя некоторые протеины могут быть мембраносвязанными [18, 19].

В последнее время повышенное внимание уделяется разработке методов *Agrobacterium*-опосредованной трансформации не только *in vitro*, но и *in planta* [20]. Однако вопросы, связанные с углеводным обменом в процессе трансгенеза растений, исследованы крайне недостаточно. Целью данной работы было сравнительное изучение активности энзимов метаболизма сахарозы и содержания углеводов на ранних стадиях онтогенеза кукурузы, инфицированной *in planta* обезоруженными штаммами LBA4404 и GV2260, содержащими соответственно векторные конструкции pBi2E и pCB002, которые включают разные целевые гены.

Материалы и методы

Agrobacterium-опосредованную трансформацию инбредной линии кукурузы Л370 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины, Киев) проводили *in planta* частично модифицированным нами методом Чумакова и соавт. [20], где после изоляции пестичных нитей осуществляли инокуляцию штаммами LBA4404 (pBi2E) и GV2260 (pCB002) с последующим опылением пылью этого же растения. Агробактериальные штаммы выращивали в жидкой LB-среде (200 об/мин) при 28 °С. Обе векторные конструкции содержали селективный ген неомицинофосфотрансферазы (*nptII*) *E. coli* под контролем промотора гена нопалинсинтазы. В отличие от pCB002, которая включала также репортерный ген β-глюкуронидазы *E. coli*, pBi2E содержит дуплицированный участок гена пролиндегидрогеназы арабидопсиса (*A. thaliana*), расположенный как инвертированный повтор под 35S промотором вируса мозаики цветной капусты.

Условия выращивания и селекции. Для получения зрелых зерновок при инфицировании растений варьировали компонентами среды инокуляции и концентрацией агробактериальной суспензии клеток. Зрелые зерновки растений стерилизовали 20 мин в 96%-м спирте, 40 мин в 10%-м растворе хлорамина, трижды промывали стерильной дистиллированной водой и проращивали на модифицированной MS-среде с добавлением

селективного агента — канамицина сульфата (*Km*) в концентрации 50 мг/л при 25 °С с 16-часовым фотопериодом. Селекцию *Km*-устойчивых растений проводили в течение двух пассажей продолжительностью в 2 недели. Для биохимического анализа использовали *nptII*-содержащие побеги 9-суточных этиолированных проростков, выращенных в термостате при 25 °С в песке, а также листья 20-суточных растений, выращенных на MS-среде при 25 °С с 16-часовым фотопериодом.

ПЦР-анализ. ДНК выделяли из зрелых зерновок и зеленых листьев *Km*-устойчивых растений частично модифицированным методом Деллапорта [21]. Наличие гена *nptII* в геноме кукурузы определяли с использованием праймеров: 5'-ССТГААТ-ГААСТССАГГАГГАГГА (F) и 5'-ГСТСТА-ГАТССАГАГТСССГСТСАГААГ (R). Условия амплификации ДНК: преденатурация 94 °С, 4 мин; 35 циклов — денатурация 94 °С, 30 с; реассоциация — 53 °С, 30 с; синтез — 72 °С, 30 с; конечная элонгация — 72 °С, 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. и 730 п. н. Условия амплификации ДНК: преденатурация 94 °С, 4 мин; 35 циклов: денатурация — 94 °С, 30 с; реассоциация — 57 °С, 30 с; синтез — 72 °С, 15 с; конечная элонгация — 72 °С, 10 мин для *virD1* и денатурация — 94 °С, 30 с; реассоциация — 60 °С, 30 с; синтез — 72 °С, 45 с; конечная элонгация — 72 °С, 10 мин — для *virC*. Праймеры, используемые для *virD1*: 5'-ATG TCG CAA GGC AGT AAG CCC A-3' и 5'-GGA GTC TTT CAG CAT GGA GCA A-3'; для *virC*: 5'-ATC ATT TCA AGT AGC GAC T-3' и 5'-AGC TCA AAC CTG CTT C-3'. Электрофорез проводили в 1,2%-м агарозном геле при напряженности 5 В/см в течение 45 мин в буфере 0,5xTBE в присутствии бромистого этидия.

Активность энзимов метаболизма сахарозы. Энзимную фракцию, содержащую СС и инвертазу, выделяли методом, описанным ранее [22]. Растительную ткань (0,5 г) гомогенизировали в буфере А, содержащем 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, 1мМ ЭДТА, 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, диализовали 12 ч в том

же буфере, разбавленном в 10 раз. В полученном диализате, содержащем сахарозосинтазу и растворимую инвертазу, определяли протеины по Лоури. Осадок, оставшийся после центрифугирования клеточного гомогената, трижды промывали буфером А, инкубировали 6 ч при 4 °С в буфере, содержащем 1М NaCl, постоянно встряхивая. После солюбилизации протеиновую фракцию диализовали и использовали для определения протеинов и активности инвертазы клеточных стенок.

Активность СС в реакции синтеза сахарозы оценивали по количеству образованной сахарозы в инкубационной смеси, содержащей (мкмоль): Трис-НСl (рН 7,5) — 50, УДФГ — 1, фруктозу — 3, энзимный препарат — 100 мкл. Активность определяли резорциновым методом Рое [23]. Состав инкубационной смеси (мкмоль) в реакции расщепления сахарозы: цитратный буфер, рН 6,4 — 50, УДФ — 2,5 или АДФ — 5,0, сахароза — 20, энзимный препарат — 100 мкл. Активность энзима СС устанавливали по количеству образованной фруктозы арсеномолибдатным методом [24].

Активность инвертазы определяли по количеству образующихся моносахаров. Для ЦИ использовали инкубационную смесь следующего состава: 1/15 КФ-буфер, рН 7,0 — 50 мкл, сахароза — 20 мкмоль, энзимный препарат — 50 мкл. Для ВИ и ИКС инкубационная среда — 1М ацетатный буфер, рН 4,7 — 50 мкл, сахароза — 20 мкмоль, энзимный препарат — 50 мкл. Содержание сахарозы, моносахаров и крахмала определяли методами, описанными нами ранее [22]. В агробактериальном штамме ночной культуры активность СС и инвертазы, оцениваемая теми же методами, отсутствовала.

При статистической обработке полученных результатов использовали критерий Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Зрелые зерновки инбредной линии кукурузы Л370 получили инокуляцией изолированных пестичных нитей *in planta* при опылении штаммами LBA4404 (pBi2E) и GV2260 (pCB002), векторные конструкции которых содержали селективный ген *nptII* — детерминанту устойчивости к антибиотику канамицину, однако различные целевые гены. Для анализируемого нами генотипа необходимая и достаточная концентрация этого антибиотика составляла 50 мг/л. На рис. 1 представлены результаты определения ампликона гена *nptII*, синтезированного с сум-

марной ДНК кукурузы, выделенной из зрелых зерновок и листьев растений, где его ожидаемый размер составлял 649 п. н.

Результаты ПЦР-анализа свидетельствуют о том, что при произвольной выборке в зерновках и в листьях растений, устойчивых к канамицину, осуществляется перенос Т-ДНК в клетки и, наиболее вероятно, ее интеграция в ядерный геном кукурузы. Однако в некоторых случаях, несмотря на наличие гена *nptII* (рис.1, дорожка 5, инфицирование GV2260, pCB002), *Km*-устойчивых растений получено не было. Отсутствие экспрессии гена *nptII*, по видимому, обусловлено его эпигенетическим сайленсингом. Согласно результатам ПЦР-анализа, где в качестве маркера использовали гены *virD1* и *virC* штаммов GV2260 и LBA4404 соответственно, в клетках зерновок и в листьях растений отсутствовали агробактериальные примеси (данные не приведены). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения оптимизированного нами способа *Agrobacterium*-опосредованной трансформации генеративных тканей кукурузы *in planta* для интродукции рекомбинантных молекул ДНК.

Другая сторона процесса трансгеноза

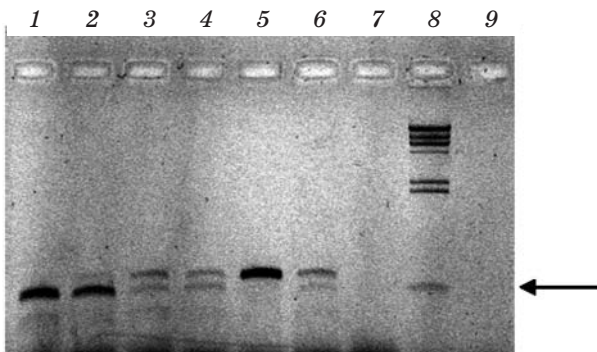


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредной линии кукурузы ЛЗ70, инфицированной *in planta*, с использованием праймеров к гену *nptII*:

1 — ДНК зерновок контрольных (нетрансформированных) растений;
2 и 3 — ДНК зерновок растений, инфицированных штаммами GV2260 (pCB002) и LBA4404 (pVi2E) соответственно;
4 и 5 — ДНК листьев растений, соответственно устойчивых и неустойчивых к селективной концентрации канамицина (GV2260, pCB002);
6 и 7 — ДНК листьев растений, соответственно устойчивых и неустойчивых к селективной концентрации канамицина (LBA4404, pVi2E);
8 — маркер молекулярных масс — ДНК бактериофага λ , гидролизованная *Hind* III;
9 — негативный контроль — те же условия амплификации без ДНК.

Стрелкой указан ампликон, ожидаемый размер которого составляет 649 п. н.

связана с изучением влияния агробактериальных штаммов, содержащих различные целевые гены, на углеводный обмен. У кукурузы крахмал и сахароза, образованные в процессе эмбриогенеза, не только используются как источник углерода и энергии в биосинтетических процессах на ранних этапах онтогенеза, но и являются важными запасными веществами зрелых зерновок. Согласно данным литературы [25], на функционирование энзимов метаболизма сахарозы могут оказывать влияние биотические стрессоры. Следует отметить, что *Agrobacterium tumefaciens* — патоген, который может приводить к изменениям в метаболизме инфицированных клеток, вплоть до их программированной гибели. Последнее, в частности, установлено для клеток каллуса кукурузы, трансформированных штаммом LBA4404 (pAL4404) [26]. Ответная реакция клеток кукурузы на агробактериальную инфекцию *in planta* может быть отражением изменений в метаболизме сахарозы непосредственно в инокулированных генеративных тканях, в процессе эмбриогенеза, при прорастании зерновок, а также в ходе дальнейшего роста и развития. Поскольку сахароза и гексозы принимают участие в контроле многих физиологических процессов, в том числе прорастания, ското- и фотоморфогенеза, изучали их метаболизм на ранних этапах онтогенеза кукурузы. В табл. 1 и на рис. 2 представлены результаты исследования активности сахарозосинтазы, осуществляющей как расщепление сахарозы, так и ее синтез в побегах 9-суточных этиолированных проростков.

Расщепление сахарозы СС, в результате которого образуются нуклеозиддифосфатсахара и фруктоза, проведено нами с двумя субстратами — АДФ и УДФ в концентрациях, соответствующих максимальной скорости реакции. В контроле и в побегах *nptII*-содержащих этиолированных проростков расщепление сахарозы осуществлялось интенсивнее с АДФ. Вместе с тем независимо от используемого штамма наблюдалось снижение как удельной, так и общей активности энзима, причем больший уровень ингибирования отмечен при инокуляции генеративных тканей растений кукурузы штаммом LBA4404 (pVi2E). В частности, снижение общей активности для этого штамма происходило соответственно с УДФ и с АДФ на 51% и 61%, а удельной — на 33% и 46%.

Таблица 1. Удельная активность СС в побегах 9-суточных этиолированных проростков кукурузы, содержащих ген *nptII*

| Вариант | Расщепление сахарозы, мкмоль фруктозы на мг протеина в час | | Синтез сахарозы, мкмоль на мг протеина в час | Синтез / расщепление |
|-----------------|--|------------|--|----------------------|
| | УДФ | АДФ | | |
| Контроль | 4,2±0,4* | 14,6±1,0* | 3,9±0,01* | 0,93 |
| LBA4404 (pVi2E) | 2,8±0,2** | 7,9±0,01** | 4,3±0,1* | 1,54 |
| GV2260 (pCB002) | 3,8±0,5** | 10,6±0,6** | 4,0±0,2 | 1,05 |

Примечание: различия достоверны по сравнению с контролем (*) и между вариантами (**).

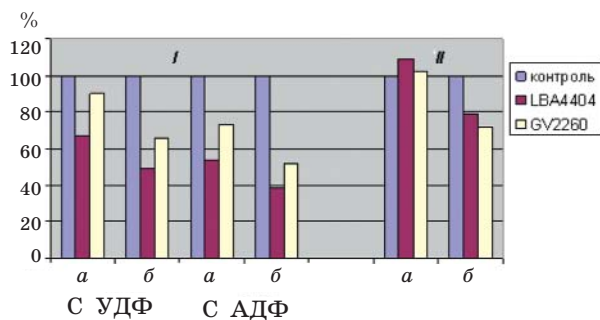


Рис. 2. Относительные значения удельной (а) и общей (б) активности СС:

I — в реакции расщепления с субстратами УДФ и АДФ, II — в реакции синтеза сахарозы в побегах 9-суточных этиолированных проростков, полученных после инфицирования *in planta* генеративных тканей штаммами GV2260 (pCB002) и LBA4404 (pVi2E), % от контроля

Следовательно, при агробактериальной инфекции уменьшается количество образованных УДФГ и АДФГ, что может приводить к снижению синтеза клеточных биополимеров, для которых они являются субстратами.

Что касается активности СС в реакции синтеза сахарозы, то ответная реакция на инфицирование агробактериальными штаммами не столь однозначно выражена. Так, удельная активность энзима при использовании LBA4404 (pVi2E) хотя и незначительно (на 10%), но достоверно повышалась, а GV2260 (pCB002) — оставалась на уровне контроля, в то время как общая — на 21% и 28%, соответственно, снижалась. При этом отношение значений в реакциях синтеза:расщепление сахарозы для первого штамма увеличивалось в 1,54 раза, а для второго — достоверно не отличалось от контроля, т. е. под влиянием LBA4404 (pVi2E) синтетическая направленность сахарозосинтазы преобладала над реакцией расщепления. Поскольку известно, что сахароза может быть регуляторным фактором, определяющим уровень олигомеризации и локализации

протеина СС в клетке [18], различное влияние анализируемых штаммов на направленность реакции СС может быть отражением варибельности функционирующих изоформ энзима.

Другим путем включения сахарозы в метаболизм является ее гидролиз инвертазой с последующим использованием моносахаров в процессах гликолиза и дыхания. В отличие от СС, инвертаза необратимо катализирует реакцию, в результате которой образуются две гексозы; они к тому же могут быть потенциальными сигнальными/регуляторными молекулами. На рис. 3 и в табл. 2 представлены результаты сравнительного изучения активности трех форм инвертазы в побегах 9-суточных этиолированных проростков. В побегах проростков, содержащих *nptII*, наблюдалось снижение удельной и общей активности ВИ, общей активности ЦИ, причем более интенсивное ингибирование так же, как и для СС (в реакции расщепления), отмечено для штамма LBA4404 (pVi2E). Удельная же активность ЦИ поддерживалась практически на неизменном уровне для обоих анализируемых штаммов. В то же время для ИКС наряду со значительным снижением удельной активности достоверное уменьшение (на 25%) общей активности происходило только при использовании LBA4404 (pVi2E). Следует отметить, что на ранних этапах онтогенеза среди разных форм инвертазы в контроле и под влиянием анализируемых агробактериальных штаммов наиболее активна ВИ, активность ИКС и ЦИ в 2–5 раз ниже.

Наблюдаемые вариации в общей активности энзимов СС и инвертазы в побегах *nptII*-содержащих этиолированных проростков могут быть отражением изменений в содержании легкорастворимых протеинов и протеинов клеточных стенок (табл. 3). Так, количество легкорастворимых протеинов уменьшалось, тогда как протеинов клеточных стенок — повышалось. Варибельность общей активности СС, инвертазы

Таблиця 2. Удельная активность инвертазы (мкмоль фруктозы на мг протеина в час) в побегах 9-суточных этиолированных проростков кукурузы, содержащих ген *nptII*

| Вариант | ВИ | ЦИ | ИКС |
|-----------------|-----------|----------|-----------|
| Контроль | 25,5±2,2* | 4,8±0,01 | 11,2±0,1* |
| LBA4404 (pBi2E) | 17,5±2,2* | 4,3±0,1 | 6,7±0,5* |
| GV2260 (pCB002) | 21,8±0,8* | 5,0±0,01 | 5,8±0,1* |

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем.

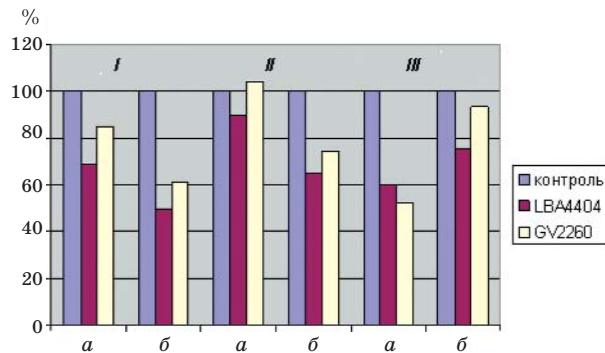


Рис. 3. Относительные значения удельной (а) и общей (б) активности инвертазы:

I — ВИ, II — ЦИ, III — ИКС в побегах 9-суточных этиолированных проростков, полученных после инфицирования генеративных тканей штаммами GV2260 (pCB002) и LBA4404 (pBi2E), % от контроля

и содержания протеинов позволяет предположить, что агробактериальная инфекция оказывает влияние не только на функционирование разных форм энзимов, но и на процесс их биосинтеза. В то же время ингибирование удельной активности может свидетельствовать об опосредованном влиянии агробактериальной инфекции на свойства исследуемых энзимов.

Изменения в функционировании энзимов метаболизма сахарозы в анализированных нефотосинтетических тканях *nptII*-содержащих проростков сопровождалось и различиями в накоплении углеводов (табл. 3).

Под влиянием обоих штаммов происходило уменьшение количества крахмала на 12–20%. В то же время отмечено варьирование в содержании моносахаров и сахарозы. В результате инфицирования штаммом GV2260 (pCB002) количество гексоз незначительно уменьшалось, а сахарозы — увеличивалось, а для LBA4404 (pBi2E) наблюдалась обратная зависимость. По сравнению с контролем отношение моносахаров к саха-

Таблиця 3. Содержание углеводов и протеинов в побегах 9-суточных этиолированных проростков

| Углеводы, мкмоль на 1 г сухой ткани | Контроль | LBA4404 (pBi2E) | GV2260 (pCB002) |
|-------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| Моносахара | 83,5±1,7* 100 | 90,3±0,9** 108 | 73,3±1,1** 88 |
| Сахароза | 22,5±0,4* 100 | 22,0±0,5** 93 | 24,8±0,9** 110 |
| Крахмал | 9,9±0,2* 100 | 8,7±0,3** 88 | 7,9±0,2** 80 |
| Моносахара/Сахароза | 3,7 | 4,2 | 2,9 |
| Протеины, мг на 1 г ткани | | | |
| Легкорастворимые | 6,35±0,15* | 4,65±0,20* | 4,50±0,30* |
| Клеточных стенок | 1,00±0,10* | 1,25±0,05** | 1,65±0,05** |

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с контролем; ** — различия достоверны между вариантами и контролем.

розе для последнего штамма было большим, а для GV2260 (pCB002) — меньшим, следовательно, изменялся баланс гексоз, принимающих участие в метаболических процессах. Поскольку под влиянием LBA4404 (pBi2E) для СС характерна биосинтетическая направленность реакции и большее, чем для другого штамма, снижение общей активности кислой и щелочной форм инвертазы, то превышение количества гексоз, вероятнее всего, связано с меньшей скоростью их включения в дальнейший метаболизм. Отметим, что разница в количестве глюкозы и сахарозы установлена в ответ на инфицирование листьев *Brassica rapa* обезоруженным и онкогенными штаммами разного типа [27].

Инфицирование обезоруженными агробактериальными штаммами *in planta* оказывало различное влияние на метаболизм сахарозы и в ходе фотоморфогенеза, когда синтез этого энергетически обогащенного дисахарида в отличие от этиолированных проростков осуществляется сахарозофосфатсинтазой в листьях. На рис. 4 представлены относительные значения удельной и общей активности СС и инвертазы изучаемых штаммов (GV2260 к LBA4404) в листьях 20-дневных *Km*-устойчивых растений. Что касается СС, то ее удельная активность как в реакции синтеза, так и расщепления сахарозы между обоими штаммами не отличалась, в то время как общая активность *Km*-устойчивых растений, инфицированных

LVA4404 (pVi2E), была на 24–26% выше. Это можно объяснить повышенным содержанием фракции легкорастворимых протеинов (табл. 4). Более того, в фотосинтетических тканях независимо от штаммов наблюдалась почти двукратная стимуляция активности СС в реакции расщепления по сравнению с этиолированными проростками.

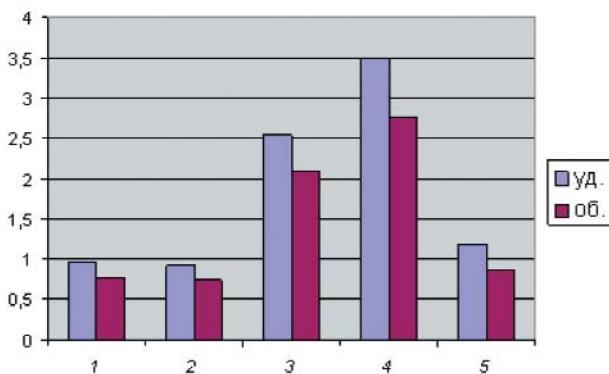


Рис. 4. Соотношение активности энзимов метаболизма сахарозы (GV2260, pCB002 к LVA4404, pVi2E) в листьях 20-дневных *Kt*-устойчивых растений кукурузы, инфицированной *in planta*: 1 — СС (расщепление); 2 — СС (синтез) сахарозы; 3 — ВИ; 4 — ЦИ; 5 — ИКС

Существенные различия отмечены в функционировании ВИ и ЦИ. Их удельная активность соответственно в 2,5 и 3,5 раза, а общая — в 2 и 2,7 раза была выше с использованием GV2260 (pCB002) по сравнению с LVA4404 (pVi2E). В то же время удельная активность ИКС для первого штамма, хотя и незначительно, повышалась, а общая активность — снижалась.

Следует отметить, что в побегах 9-суточных этиолированных проростков также происходила стимуляция общей и удельной активности ВИ, ЦИ при инфицировании GV2260 (pCB002), хотя эти изменения были не столь существенны (не более чем в 1,25 раза). Однако абсолютные значения активности кислых форм инвертазы, особенно вакуолярной, под влиянием обоих штаммов в гетеротрофных тканях были в несколько раз выше, чем в фотосинтетических, а щелочной — уменьшались только при использовании LVA4404 (pVi2E).

В листьях 20-суточных *Kt*-устойчивых растений наблюдались различия и в содержании углеводов (табл. 4). Независимо от используемого штамма происходило снижение в содержании сахарозы, крахмала и моносахаров, причем большая разница отмечена при использовании GV2260 (pCB002).

Тем не менее, соотношение моносахаров к сахарозе в *Kt*-устойчивых растениях в 4 раза превышало контроль, но между анализируемыми вариантами не отличалось, т. е. у них устанавливался одинаковый баланс гексоз и сахарозы. Вместе с тем в этиолированных проростках и в контроле, и в *nptII*-содержащих побегах моносахара существенно превышали количество сахарозы.

Таблица 4. Содержание углеводов и протеинов в листьях 20-суточных *Kt*-устойчивых растений кукурузы

| Углеводы, мкмоль на 1 г сухой ткани | Контроль | LVA4404 (pVi2E) | GV2260 (pCB002) |
|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Моносахара | $121,4 \pm 3,0^*$ 100 | $112,2 \pm 0,4^*$ 92,4 | $91,6 \pm 1,6^*$ 75,4 |
| Сахароза | $335,6 \pm 12,7^*$ 100 | $77,6 \pm 1,0^*$ 23 | $63,0 \pm 0,1^*$ 19 |
| Крахмал | $20,6 \pm 1,6^*$ 100 | $12,8 \pm 0,4^*$ 62 | $8,4 \pm 0,3^*$ 41 |
| Моносахара/Сахароза | 0,36 | 1,45 | 1,45 |
| Протеины, мг на 1 г ткани | | | |
| Легкорастворимые | $5,4 \pm 0,2^*$ | $9,3 \pm 0,3^{**}$ | $7,5 \pm 0,8^{**}$ |
| Клеточных стенок | $1,4 \pm 0,2$ | $1,2 \pm 0,2^{**}$ | $0,8 \pm 0,1^{**}$ |

Примечание: * — различия достоверны между контролем; ** — различия достоверны между вариантами и контролем.

Полученные данные свидетельствуют о различном влиянии обезоруженных агробактериальных штаммов на функционирование энзимов синтеза и включения сахарозы в метаболизм на ранних этапах онтогенеза кукурузы.

Согласно данным литературы, избыток гексоз может генерировать вакуолярная инвертаза, где преимущественно происходит гидролиз сахарозы в процессе роста и развития. Из-за низкой активности ЦИ образуется ограниченное количество гексоз как сигнальных/регуляторных молекул, и эту функцию приписывают ИКС [14]. Вариативность баланса сахарозы и продуктов ее гидролиза/расщепления в гетеротрофных и фотосинтетических тканях, где в ответ на инфицирование кукурузы *in planta* в целом происходило повышение содержания гексоз, была отражением изменений в активности энзимов метаболизма сахарозы, которые зависели от используемого штамма. В побегах 9-суточных этиолированных про-

ростков кукурузи, що містять селективний ген *nptII*, при установленні балансу сахарозного розщеплення сахарози відбувається більш інтенсивно з утворенням АДФГ, а її гідроліз здійснюється переважно кислими формами інвертази — ВІ і ІКС. В листках *Km*-стійких 20-добових рослин розщеплення сахарози відбувалося головним чином за рахунок СС, оскільки активність всіх форм інвертази, особливо ІКС, була низькою. Синтетична спрямованість СС також була низькою, а високий рівень сахарози забезпечується функціонуванням сахарозофосфатсинтази — основного ферменту її синтезу в фотосинтезуючих тканинах. Агробактеріальна інфекція призводила до суттєвому зниженню сахарози, що дозволяє передбачити її вплив і на цей фермент.

Залишається відкритим питання, яким чином інфікування генеративних тканин кукурузи *in planta* після проростання зерновок, що містять селективний ген *nptII*, призводить до змін у метаболізмі вуглеводів в процесі ското- і фотоморфогенезу. Дуже ймовірно, що це може бути пов'язано з генетичним рівнем регуляції і участю в цьому процесі глюкози як сигнальної і/або регуляторної молекули. Вплив агробактеріальної інфекції на метаболізм в онтогенезі рослин може бути викликано різними причинами. По-перше, сам процес трансформації, навіть з використанням беззбройних штамів, розглядається як взаємодія патоген-хазяїн. Хоча вважається, що *A. tumefaciens* слабо активує комплекс захисних реакцій в рослинах, Вір-протеїни можуть супресувати імунну систему хазяїна, і вже на ранніх етапах інфікування відбувається значительне перепрограмування експресії генів в рослинних клітинах, необхідних не тільки для *Agrobacterium*-опосередованої трансформації, але і ділення, росту клітин, метаболізму [8, 28, 29]. По-друге, зміни метаболізму можуть бути пов'язані з експресією цільових генів — як локально в місцях обробки рослин агробактерією, так і в ході їх подальшого розвитку. В частині, штам LBA4404 несе конструкцію pBi2E — супресор гена проліндегідрогенази, функціонування якого ґрунтується на РНК-інтерференції. Інгибування проліндегідрогенази найімовірніше всього є частковим, оскільки активність дцРНК-супресорів залежить від їх комплементарності мРНК гена-мішені. Це може призво-

дити, як було показано для *Nicotiana tabacum*, до збільшення рівня вмісту проліну, до підвищення осмотичного тиску клітинного соку і рівня стійкості до стресових впливів [30, 31].

Отже, при інфікуванні генеративних тканин *in planta* беззбройними штамми *Agrobacterium tumefaciens* — GV2260 (pCB002) і LBA4404 (pBi2E) — на ранніх етапах онтогенезу кукурузи спостерігали зміни активності ферментів вуглеводного метаболізму. Показано тканинспецифічність функціонування сахарозосинтази і інвертази. В побігах 9-добових етіологованих проростків обидва штами призводили до інгибування активності ферментів гідролізу і розщеплення сахарози: кислої і щелочної форм інвертази (за винятком удільної активності ЦІ), а також СС в реакції з УДФ і з АДФ. Однак в реакції синтезу сахарози спостерігається перевищення активності СС для LBA4404 (pBi2E) порівняно з GV2260 (pCB002) і навіть стимуляція її удільної активності відносно контролю. В цілому, аналогічна реакція на інфікування використовуваними агробактеріальними штамми характерна для ферментів метаболізму сахарози і в листках 20-добових рослин. Тем не менше, відмінна риса тканин при фотоморфогенезі — значительне збільшення активності ВІ і ЦІ під впливом GV2260 (pCB002). Найбільш сильний негативний ефект на активність ферментів гідролізу і розщеплення сахарози на ранніх етапах онтогенезу викликає штам LBA4404 (pBi2E). Зміна активності ферментів в онтогенезі кукурузи супроводжувалася варіюванням вмісту моносахаридів, сахарозы, крохмалю, а також протеїнів.

Таким чином, в відповідь на інфікування генеративних тканин *in planta* беззбройними штамми *Agrobacterium tumefaciens* — GV2260 (pCB002) і LBA4404 (pBi2E) — установлені зміни в активності ферментів метаболізму сахарози на ранніх етапах онтогенезу кукурузи.

Показано тканинспецифічність функціонування вакуольної, цитоплазматичної інвертази, інвертази клітинних стінок, сахарозосинтази, а також зміни в балансу сахарози і гексоз в процесі ското- і фотоморфогенезу.

Встановлено різний вплив штамів *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 (pCB002) і LBA4404 (pBi2E) на метаболізм сахарози і продуктів її гідролізу.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gelvin S. B.* Agrobacterium-Mediated plant Transformation: the Biology behind the «Gene-Jockeying» Tool // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* — 2003. — V. 67. — P. 16–37.
2. *Iyer L. M., Kumpatla S. P., Chandrasekhan M. B., Hall T. C.* Transgene silencing in monocots // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — V. 43. — P. 323–346.
3. *Shou H., Frame B. R., Whitham S. A., Wang K.* Assessment of transgenic maize events produced by particle bombardment or Agrobacterium — mediated transformation // *Mol. Breed.* — 2004. — V. 13. — P. 201–208.
4. *Gao R., Lynn D. G.* Environmental pH sensing: resolving the VirA/VirG two-component system inputs for *Agrobacterium* pathogenesis // *J. Bacteriol.* — 2005. — V. 187. — P. 2182–2189.
5. *He F., Nair G. R., Soto C. S. et al.* Molecular basis of ChvE function in sugar binding, sugar utilization, and virulence in *Agrobacterium tumefaciens* // *Ibid.* — 2009. — V. 191, N 18. — P. 5802–5813.
6. *Shimoda N., Toyota-Yamamoto A., Nagamine J. et al.* Control of expression of Agrobacterium vir genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1990. — V. 87. — P. 6684–6688.
7. *Yuan Z.-C., Liu P., Saenkham P. et al.* Transcriptome Profiling and Functional Analysis of *Agrobacterium tumefaciens* Reveals a General Conserved Response to Acidic Conditions (pH 5.5) and a Complex Acid-Mediated Signaling Involved in *Agrobacterium*-Plant Interactions // *J. Bacteriol.* — 2008. — V. 190. — P. 494–507.
8. *Pitzschke A., Hirt H.* New insights into an old story: *Agrobacterium*-induced tumour formation in plants by plant transformation // *EMBO J.* — 2010. — V. 29. — P. 1021–1032.
9. *Koch K.* Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // *Cur. Opin. Plant Biol.* — 2004. — V. 7. — P. 235–248.
10. *Сакало В. Д.* Регуляція метаболізму сахарози у свёкля і других культур. — К.: Логос, 2006. — 248 с.
11. *Матвеева А. Ю., Сакало В. Д., Курчий В. М., Тищенко Е. Н.* Активність сахарозсинтази і інвертази морфогенного і неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // *Вісн. Укр. т-ва генет. селекц.* — 2010. — Т. 8, № 1. — С. 18–24.
12. *Baud S., Vaultier M.-N., Rochat C.* Structure and expression profile of the sucrose syntase multigene family in Arabidopsis // *J. Exp. Bot.* — 2004. — V. 55, N 396. — P. 397–409.
13. *Subbaian C. C., Palaniappan A., Duncan K. et al.* Mitochondrial localization and putative signaling function of sucrose synthase in maize // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281, N 4. — P. 15625–15635.
14. *Cheng W.-H., Tallercioe 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 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1999. — V. 96. — P. 10512–10517.
15. *Jain M., Chourey P. S., Qin-Bao Li, Pring D. R.* Expression of cell wall invertase and several other genes of sugar metabolism in relation to seed development in sorghum (*Sorghum bicolor*) // *J. Plant Physiol.* — 2008. — V. 165, N 3. — P. 331–344.
16. *Ye Jin, Di-An Ni, Yong-Ling Ruan.* Post-translational 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. — V. 21. — P. 2072–2089.
17. *Huang L.-F., Boccock P.N., Davis J. M., Koch K. E.* Regulation of invertase: a 'suite' of transcriptional and post-transcriptional mechanisms // *Func. Plant Biol.* — 2007. — N 34. — P. 499–504.
18. *Duncan K. A., Heber S. C.* Sucrose syntase oligomerization and F-actin association are regulated by sucrose concentration and phosphorylation // *Plant Cell Physiol.* — 2007. — V. 48, N 11. — P. 1612–1623.
19. *Hardin S. C., Duncan K. A., Heber S. C.* Determination of structural requirement and probable regulation effectors for membrane association of maize sucrose synthase 1 // *Plant Physiol.* — 2006. — V. 141, N 3. — P. 1106–1119.
20. *Чумаков М. И., Рожок Н. А., Великов В. А. и др.* Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей in planta // *Генетика.* — 2006. — Т. 42, № 8. — С. 1083–1088.
21. *Дрейпер Дж., Скотт Р.* Генная инженерия растений. Лабораторное руководство. — М.: Мир, 1991. — 408 с.
22. *Сакало В. Д., Курчий В. М.* Активність сахарозсинтази та інвертази в етіологованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників // *Физиол. биохим. культ. раст.* — 2009. — Т. 41, № 5. — С. 400–407.
23. *Roe J. H.* A colorimetric method for the determination of fructose in blood and urine // *J. Biol. Chem.* — 1934. — V. 107, N 1. — P. 15–22.
24. *Somogyi M.* Notes on sugar determination // *Ibid.* — 1952. — V. 195, N 1. — P. 18–23.
25. *Sturm A., Tang G.-Q.* The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning // *Trend. Plant Sci.* — 1999. — V. 11. — P. 707–726.
26. *Hansen G.* Evidence for *Agrobacterium*-induced Apoptosis in maize cells // *MPMI.* — 2000. — V. 13, N 6. — P. 649–657.
27. *Simoh S., Quitana N., Kim H. K. et al.* Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens*-infected Brassica rapa // *J. Plant Physiol.* — 2009. — V. 166, N 10. — P. 1005–1014.

28. Veena, Hongmei Jang, Doerge R. W., Gelvin S. Transfer of T-DNA and Vir proteins to plant cells by *Agrobacterium tumefaciens* induces expression of host genes involved in mediating transformation and suppresses host defense gene expression // *Plant J.* — 2003. — V. 35. — P. 219–236.
29. Lee C.-W., Efetova M., Engelmann J. C. et al. *Agrobacterium tumefaciens* Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana* // *The Plant Cell.* — 2009. — V. 21. — P. 2948–2962.
30. Колодяжная Я. С., Тимов С. Е., Кочетов А. В. и др. Оценка солеустойчивости растений табака *Nicotiana tabacum*, несущих антисмысловой супрессор гена пролиндегидрогеназы // *Генетика.* — 2006. — № 42. — С. 278–281.
31. Колодяжная Я. С., Тимов С. Е., Кочетов А. В. и др. Трансформанты табака, экспрессирующие антисмысловую последовательность гена пролиндегидрогеназы, проявляют устойчивость к тяжелым металлам // *Там же.* — 2007. — № 43. — С. 994–998.

МЕТАБОЛІЗМ САХАРОЗИ НА РАННІХ ЕТАПАХ ОНТОГЕНЕЗУ КУКУРУДЗИ (*Zea mays* L.), ТРАНСФОРМОВАНОЇ *in planta* ОБЕЗЗБРОЄНИМИ ШТАМАМИ *Agrobacterium tumefaciens*

О. М. Тищенко¹, В. Д. Сакало¹,
О. Ю. Матвеева¹, В. М. Курчій¹,
Б. В. Моргун², О. В. Кочетов³

¹Інститут фізіології рослин і генетики
НАН України, Київ

²Інститут клітинної біології та генетичної
інженерії НАН України, Київ

³Інститут цитології та генетики Сибірського
відділення РАН, Новосибірськ

E-mail: oltyko@gmail.com

Проведено порівняльний аналіз активності ензимів вуглеводного метаболізму інбредної лінії кукурудзи Л370, трансформованої *in planta* за допомогою агробактеріальних штамів LBA4404 й GV2260, які містять векторні конструкції відповідно pBi2E та pCB002. Показано специфічність функціонування вакуолярної, цитоплазматичної інвертази, інвертази клітинних стінок і сахарозосинтази (СС), зміни у вмісті сахарози, моноцукрів, крохмалю, протеїнів у пагонах 9-денних етіолованих проростків та в листках 20-денних рослин. Більший інгібуючий ефект на активність ензимів гідролізу і розщеплення сахарози здійснює штам LBA4404 (pBi2E). Поряд із цим у реакції синтезу дисахариду варіювання у функціонуванні СС між використаними штамми є тканиноспецифічним і пов'язано як зі зниженням, так і з підвищенням її активності. Отримані дані свідчать про різний вплив обеззброєних агробактеріальних штамів на функціонування ензимів, які включають у метаболізм сахарозу, та на баланс гексоз і сахарози.

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

METABOLISM OF SUCROSE AT THE EARLY STAGES OF ONTOGENESIS OF *Zea mays* L. TRANSFORMED *in planta* BY DISARMED STRAINS *Agrobacterium tumefaciens*

E. N. Tishchenko¹, V. D. Sacalo¹,
A. Yu. Matveyeva¹, V. M. Kurchiy¹,
B. V. Morgun², A. V. Kochetov³

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

²Institute of Cell Biology and Genetic
Engineering of National Academy of Science
of Ukraine, Kyiv

³Institute of Cytology and Genetics of
Russian Academy of Science, Novosibirsk

E-mail: oltyko@gmail.com

Comparative study of carbohydrate metabolizing enzymes activity of maize inbred line L370 transformed *in planta* with Agrobacterial strains of LBA4404 and GV2260 harboring vector constructions pBi2E and pCB002 respectively was done. The specificity of functioning of vacuolar, cytoplasmic, cell wall invertases and sucrose synthase (SS) and changes in sucrose, monosaccharides, starch and proteins content at the shoots of 9 day etiolated seedlings and in the leaves of 20 day plants were shown as well. Strain LBA4404 (pBi2E) showed some larger inhibitive effect on hydrolysis and cleavage sucrose. At the same time variation in SS functioning in disaccharide synthesis reaction between two applied strains was tissue-specific and was concerned both with declining and rising SS activity. Received data indicate on different influence of disarmed agrobacterial strains on enzyme functioning that include sucrose metabolism and on the hexoses and sucrose balance as well.

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