

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

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

АКТИВНОСТЬ ЭНЗИМОВ МЕТАБОЛИЗМА САХАРОЗЫ В ЭНДОСПЕРМЕ МОЛОЧНО-ВОСКОВОЙ СПЕЛОСТИ Т2-РАСТЕНИЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ КУКУРУЗЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ *IN PLANTA* С ПОМОЩЬЮ LBA4404 (pBi2E)

Одно из актуальных направлений генетической инженерии связано с физиолого-генетическими аспектами трансгенеза растений, среди которых углеводный обмен исследован крайне слабо. Особый интерес вызывает метаболизм сахарозы и гексоз, поскольку эти углеводы, являясь источником углерода и энергии в гетеротрофных тканях растений при культивировании *in vitro* и *in vivo*, рассматриваются как регуляторные и сигнальные молекулы в процессах пролиферации и дифференцировки клеток [1, 2]. Основными ферментами метаболизма сахарозы являются сахарозосинтаза (СС, К.Ф.2.4.1.13) и инвертаза (К.Ф.3.2.1.26), первая из которых осуществляет синтез/ расщепление дисахарида, а вторая – её гидролиз с образованием глюкозы и фруктозы [1–3].

Ранее нами показано, что тотипотентность клеток кукурузы, компетентных к *Agrobacterium*-опосредованной трансформации, сопряжена с повышением активности ферментов синтеза сахарозы – сахарозосинтазы и её гидролиза инвертазой [3]. Учитывая важную роль альдоз в активации двухкомпонентной VirA-VirG - регуляторной системы [4], 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 – процессы роста и дифференцировки клеток растений. В связи с разработкой технологий генетической трансформации *in planta* целесообразно изучение изменений в метаболизме сахарозы в ответ на взаимодействие агробактерий с клетками генеративных тканей растений (Т0) при формировании зерновок и их отдалённых последствий на рост и развитие растений в следующих поколениях. Предыдущие наши исследования показали, что в эндосперме зерновок кукурузы (*Zea mays* L.) на стадии восковой спелости Т0-растений и их Т1-поколения происходили существенные различия в соотношении сахарозы к гексозам по сравнению с нетрансформированными растениями как результат изменений в активности ферментов сахарозосинтазы и инвертазы [5]. Цель данной работы состояла в сравнительном изучении активности ферментов СС и инвертазы (вакуолярной и цитоплазматической), а также содержания сахарозы, моносахаров и крахмала в эндосперме зерновок молочного-восковой спелости Т2-поколения растений кукурузы, полученных методом *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* с применением обезоруженного штамма LBA4404, несущего векторную конструкцию pBi2E.

Материалы и методы

Генетическую трансформацию инбредных линий кукурузы 250, 370, 1555 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины) проводили частично модифицированным нами способом Чумакова и соавт. [6]. Для изучения метаболизма сахарозы использовали эндосперм зерновок трансгенных Т2 Т1-растений, в которых ПЦР-методом идентифицировано наличие селективного гена *nptII* и целевого гена – двухцепочечного РНК-супрессора гена пролиндегидрогеназы (*pdh*).

Активность ферментов СС и инвертазы измеряли в эндосперме зерновок молочного-восковой спелости Т2-растений кукурузы методами, описанными ранее [7]. Растительную ткань (0,5 г) гомогенизировали в буфере А, содержащем 0,05 М Трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЕД-

ТА, 10 мМ ДТТ и 10 мМ MgCl₂. После центрифугирования супернатант фракционировали сульфатом аммония от 0 до 80% насыщения. Осадок растворяли в минимальном объёме буфера А, диализировали 12 час в том же буфере, разбавленном в 10 раз. Полученный диализат, в котором определяли белки по Лоури, использовали как источник ферментов – СС и инвертазы. Активность СС в реакции синтеза определяли по количеству образованной сахарозы [8], в реакции расщепления сахарозы – по количеству образованной фруктозы арсеномолибдатным методом [9]. Активность вакуолярной (ВИ) и цитоплазматической (ЦИ) инвертазы, а также содержание сахарозы, моносахаров и крахмала определяли методами, описанными нами ранее [10]. В агробактериальном штамме ночной куль-

туры активность ферментов, изученная с помощью тех же методов, отсутствовала. Достовер-

ность полученных результатов определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У крахмалсодержащих растений, к которым относится кукуруза, сахароза, являясь источником нуклеозиддифосфатсахаров – субстратов для биосинтеза крахмала в эндосперме, включается в метаболизм сахарозосинтазой [2]. Другая предполагаемая функция этого энзима связана с созреванием и дифференцировкой. На

рис. 1 представлены результаты сравнительного исследования активности сахарозосинтазы эндосперма зерновок на стадии молочно-восковой спелости Т2-растений кукурузы линий 250, 370, 1555, где в качестве контроля использовали их исходные инбредные линии.

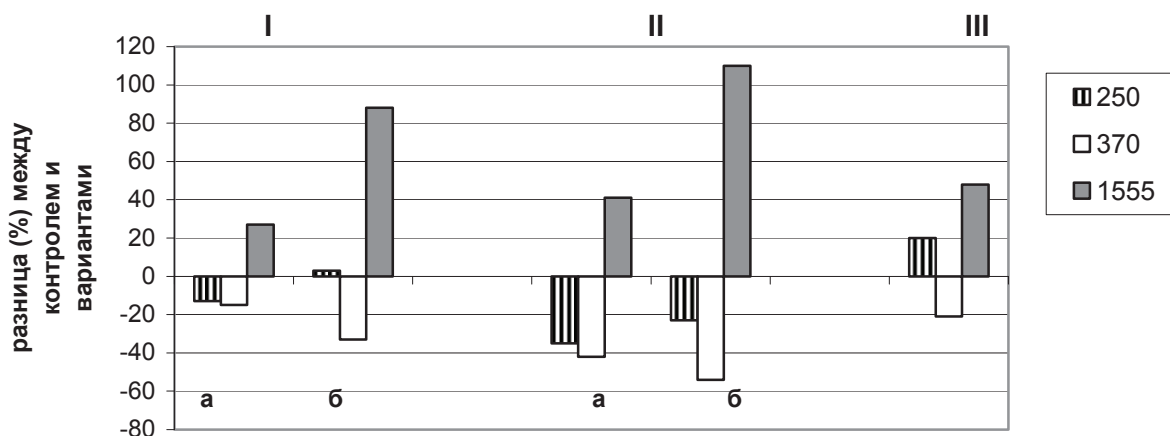


Рис. 1. Относительная удельная (а) и общая (б) активность СС (% от контроля) в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой зрелости Т2-растений, полученных после генетической трансформации *in planta* с использованием штамма LBA4404 (pBi2E):

I – в реакции синтеза сахарозы, II – в реакции расщепления с УДФ; III – содержание легкорастворимых белков

Удельная активность СС в реакции синтеза сахарозы Т2-растений линий 250 и 370, достоверно не отличаясь между собой, снижалась, тогда как линии 1555 – увеличивалась. Что касается общей активности, то различия между изучаемыми генотипами были более четко выражены. А именно, для трансгенных растений линии 1555 наблюдалось существенное повышение, для линии 370, наоборот, снижение, а для линии 250 разница практически отсутствовала.

Реакция расщепления сахарозы энзимом СС проведена нами с уридиндифосфатом (УДФ) в концентрации, соответствующей максимальной скорости реакции. В результате образуются фруктоза и уридиндифосфатглюкоза, используемая непосредственно в реакции трансгликозилирования для биосинтеза крахмала и других биополимеров, У Т2-растений линии 1555 наблюдалась стимуляция удельной и общей активности этого энзима. В то же время реакция трансгенных растений других анализируемых линий была диаметрально противоположной, хотя им и были характерны количественные

различия. Снижение и общей, и удельной активностей СС в эндосперме зерновок Т2-растений линий 250 и 370 сопровождалось повышением уровня сахарозы на 10% и 12%, что может быть отражением преобладания катаболической направленности реакции над синтетической.

Отметим, что наблюдаемые вариации активности СС в ответ на *Agrobacterium* - опосредованную трансформацию могут быть связаны с дифференциальной экспрессией генов сахарозосинтазы кукурузы – *sus1*, *sus2*, *sh1*, кодирующих изоформы СС – SUS1, SUS2, SUS-SH1 [11]. Наряду с этим возможны количественные изменения в биосинтезе полипептидов и стабильности белков этого фермента, поскольку в эндосперме в зависимости от генотипа менялось содержание легкорастворимых белков по сравнению с контролем (рис. 1). В целом, *Agrobacterium*-опосредованная трансформация приводила к изменениям активности СС в реакциях синтеза и расщепления сахарозы в эндосперме зерновок трансгенных растений Т2-поколения проанализированных инбредных линий.

Включение сахарозы в метаболизм осуществляется инвертазой с последующим использованием гексоз в процессах гликолиза и дыхания. В отличие от СС инвертаза необратимо катализирует реакцию, в результате которой образуются две гексозы, которые к тому же рассматриваются как потенциальные сигнальные и регуляторные молекулы в процессах, связанных с про-

лиферацией и растяжением клеток растений. В таблице представлены результаты сравнительного определения активности вакуолярной и цитоплазматической форм инвертазы в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости контрольных и трансгенных Т2-растений линий кукурузы 250, 370, 1555.

Таблица. Активность инвертазы в эндосперме зерновок Т2-растений кукурузы на стадии молочно-восковой спелости, мкМ фруктозы

Вариант	Вакуолярная		Цитоплазматическая	
	на мг белка	на 1 г ткани	на мг белка	на 1 г ткани
250 К.	$18,69 \pm 0,6$ 100	$214,92 \pm 7,4$ 100	$4,08 \pm 0,0$ 100	$46,95 \pm 0,2$ 100
250 Т2-LBA4404	$19,29 \pm 1,0$ 103,21	$264,5 \pm 4,1^*$ 123,07	$4,63 \pm 0,1^*$ 113,48	$63,38 \pm 2,0^*$ 134,99
370 К.	$8,25 \pm 0,8$ 100	$108,0 \pm 1,9$ 100	$2,77 \pm 0,2$ 100	$36,24 \pm 1,0$ 100
370 Т2-LBA4404	$3,90 \pm 0,5^*$ 47,27	$40,33 \pm 0,7^*$ 37,34	$2,15 \pm 0,1^*$ 77,62	$22,25 \pm 0,8^*$ 61,40
1555 К.	$5,80 \pm 0,2$ 100	$54,02 \pm 1,2$ 100	$2,9 \pm 0,1$ 100	$27,04 \pm 0,9$ 100
1555 Т2-LBA4404	$4,89 \pm 0,3^*$ 84,31	$67,60 \pm 0,5^*$ 125,14	$3,25 \pm 0,1^*$ 112,07	$44,86 \pm 0,6^*$ 165,90

Примечание: * – разница достоверна по сравнению с контролем при $p < 0,05$.

Как видно из представленных данных, активность вакуолярной инвертазы существенно превышала таковую цитоплазматической инвертазы и в контроле, и в трансформированных вариантах. Вместе с тем, в Т2-растениях линий 370, 250, 1555 наблюдалась разница в функционировании этого фермента. В отличие от линии 370, где происходило снижение активности ВИ и ЦИ на мг белка и на г растительной ткани, в

Т2-растениях линий 250, 1555 активность инвертазы повышалась (за исключением удельной активности ВИ линии 1555).

В результате различий в активности ферментов синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости Т2-растений наблюдались изменения в содержании сахарозы, крахмала и моносахаров относительно контроля (рис. 2).

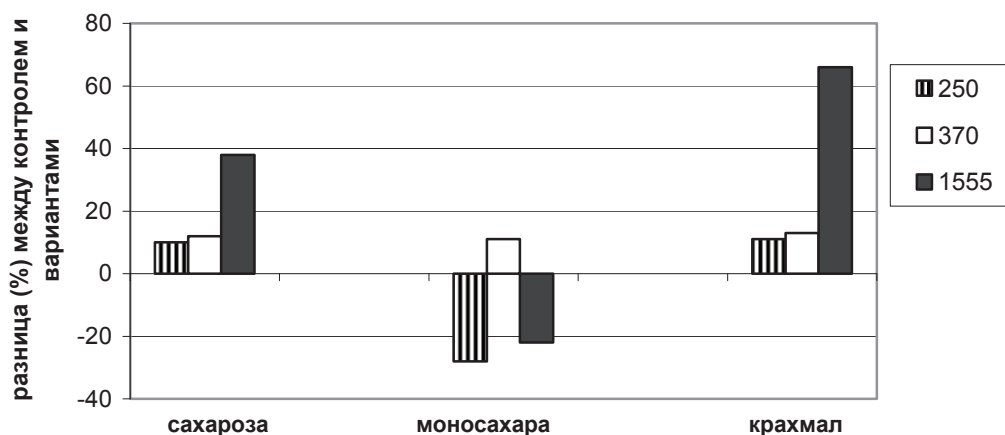


Рис. 2. Содержание углеводов в эндосперме зерновок Т2-растений кукурузы, трансформированных *in planta* с помощью штамма LBA4404 (pBi2E) на стадии молочно-восковой спелости, % от контроля

Что касается сахарозы и крахмала, то их содержание повышалось для всех трансгенных вариантов. Тем не менее их накопление было существенно выше у T2-растений линии 1555, чем линий 370 и 250, для которых разница была недостоверной. Относительно моносахаров следует отметить, что их уровень повышался приблизительно на 10% в эндосперме трансгенных растений линии 370, тогда как у двух других линий, наоборот, снижался почти на 30% и 20%.

Таким образом, в ответ на *Agrobacterium-*

опосредованную трансформацию растений кукурузы линий 250, 370 и 1555 в эндосперме зерновок на стадии молочно-восковой спелости T2-поколения наблюдались изменения в метаболизме сахарозы и гексоз. Анализ особенностей функционирования энзимов синтеза и гидролиза/расщепления сахарозы позволяет высказать предположение о наличии генетических и/или эпигенетических изменений в регуляции биосинтеза сахарозы и гексоз.

Выводы

1. *Agrobacterium*-опосредованная трансформация растений кукурузы *in planta* приводила к изменениям в метаболизме сахарозы и гексоз в эндосперме зерновок молочно-восковой спелости T2-поколения.

2. Показана генотипическая зависимость функционирования энзимов синтеза/расщепления и гидролиза сахарозы, а также баланса сахарозы и гексоз, содержания крахмала в эндосперме зерновок T2-поколения кукурузы.

Литература

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. Регуляция метаболизма сахарозы у свёклы и других культур. – Киев: Логос, 2006. – 248 с.
3. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Активность сахарозосинтазы и инвертазы морфогенного и неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.) инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2010. – Т. 8, №1. – С. 18-24.
4. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-Mediated plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2003. – P. 16-37.
5. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Моргун Б.В., Кочетов А.В., Тищенко Е.Н. Активность сахарозосинтазы и инвертазы эндосперма кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированной *in planta* обезоруженными штаммами *Agrobacterium tumefaciens* // Вісн. Укр. Тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, №1. – С. 55-64.
6. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А., Тырнов В.С., Волохина И.В. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей *in planta* // Генетика. – 2006. – Т. 42, №8. – С.1083-1088.
7. Sowokinos I.R. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum* // Plant Physiol. – 1976. – Vol. 57. – P. 63-68.
8. Roe J.H. A colometric method for the determination of fructose in blood and urine // J. Biol. Chem. – 1934. – Vol. 107, №1. – P. 15-22.
9. Somogii M. Notes on sugar determination // J. Biol. Chem. – 1952. – Vol. 195, №1. – P. 18-23.
10. Сакало В.Д., Курчий В.М. Активність сахарозосинтази та інвертази в етіолозованих проростках кукурудзи за дії стресових чинників // Физиол. и биохим. культ. растений. – 2009. – Т. 41, №5. – С. 400-407.
11. Hardin S.C., Duncan K. A., Heber S.C. Determination of structural requirement and probable regulation effectors for membrane association of maize sucrose syntase1 // Plant Physiol. – 2006. – Vol. 141, № 3. – P. 1106-1119.

MATVEYEVA A.YU., KURCHYI V.M., TISHCHENKO E.N.

*Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
Ukraine, 03022, Kyiv, Vasylykivska St. 31/17, e-mail: mgirais@mail.ru*

ACTIVITY OF SUCROSE METABOLIZING ENZYMES AT THE MILK-WAXY RIPENESS ENDOSPERM OF MAIZE INBRED LINES T2-PLANTS TRANSFORMED IN PLANTA USING LBA4401 (PBI2E)

Aims. Comparative studying the activity of sucrose metabolizing enzymes of T2-plants 250, 370, 1555 transformed *in planta* by disarmed strain LBA4404 harboring vector constructions pBi2E was investigated.

Methods. Sucrose's metabolism enzymes activity and carbohydrates' content under effect of the *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA4404 were measured. **Results.** The alterations of the sucrose's and hexoses' metabolism at the endosperm of the T2 plant generation milk-waxy ripeness corn seeds were occurred under *Agrobacterium*-mediated transformation on the plants' pollination stage. **Conclusions.** The data indicate genotypic changes in the sucrose's metabolism enzymes activity – sucrose synthase and inver-

tase, as well as at the carbohydrates' content under effect of the *Agrobacterium*-mediated transformation by strain LBA4404.

Key words: *Zea mays* L., transformation, sucrose synthase, invertase carbohydrates' content, endosperm, T2-plants.

МАТВЄЄВА Н.А.¹, КУДРЯВЕЦЬ Ю.Й.², ЛІХОВА О. О.², КВАСКО О.Ю.¹, ШАХОВСЬКИЙ А.М.¹

¹Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Україна, 03680, м. Київ, вул. академіка Заболотного 148, e-mail joyna56@gmail.com

²Інститут експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є.Кавецького НАН України

Україна, 03022, г. Київ, ул.Васильківська 45

ПОРІВНЯННЯ ПРОТИВІРУСНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ З ТРАНСГЕННИХ КОРЕНІВ ЦИКОРІЮ, САЛАТУ ТА АЛТЕЯ

Створення рослин, що синтезують сполуки медичного призначення, є одним з актуальних напрямків сучасної біотехнології. Перелік таких сполук нині є досить великим. Серед рослин, у які переносили цільові білки, можна відмітити насамперед тютюн, який є класичним модельним об'єктом біотехнологій, а також арабідопсис, ріпак, сою, кукурудзу, капусту, картоплю та інші види.

Салат *Lactuca sativa* L. також використовувався для створення трансгенних рослин, що синтезують цільові білки медичного призначення [1-2]. Використання цих рослин має певні переваги, оскільки розроблено ефективні методи *in vitro* культивування, калюсоутворення та регенерації цих рослин [3-4].

До останнього часу рослини цикорію та алтею не використовували для отримання трансгенних рослин з геном інтерферону. Разом з тим, рослини цих видів становлять великий інтерес, оскільки відносяться до лікарських та мають цілу низку природних корисних властивостей. Зокрема, екстракти з рослин цикорію мають гепатопротекторні властивості, нормалізують рівень цукру у крові (застосовують при лікуванні діабету), сприяють кращому засвоєнню кальцію (використовують для профілактики остеопорозу), мають кардіотонічні властивості, активізу-

ють ріст біфідобактерій (є пребіотиками та застосовують у комплексній терапії дисбактеріозів) [5-8]. Рослини алтею відомі перш за все як засіб, що використовується при бронхолегеневих захворюваннях завдяки наявності сполук із лікувальними властивостями [9,10]. Саме тому для нас становило інтерес до природних властивостей цих рослин додати ще і штучні, невластиві. Крім того, завдання порівняння активності екстрактів з рослин, які мають ген інтерферону, дає можливість вибору оптимального об'єкту для трансформування, який надасть можливість отримання цільового продукту з високою ефективністю. Тому наші дослідження були спрямовані на перенесення до рослин салату, алтею та цикорію гена інтерферона- $\alpha 2b$ людини, дослідження ефективності трансформації та порівняння біологічної активності екстрактів з отриманих трансгенних рослин. Ми вважали, що, виходячи з перспективи отримання цільового продукту, перевага може бути надана культурі трансгенних коренів [11], оскільки для їх вирощування не потрібне освітлення, підвищена температура, компоненти середовища високої вартості. Саме тому для генетичної трансформації використовували бактерії *Agrobacterium rhizogenes*.

Матеріали і методи

Трансгенні корені цикорію та салату було отримано шляхом *Agrobacterium rhizogenes*-опосередкованої трансформації за методикою [12] при використанні у якості вихідного матеріалу сім'ядоль 10-14 денних рослин. Для отримання „бородатих” коренів алтею використовували листки 30-40-денних рослин, культивованих у стерильних умовах на середовищі Мурасіге та Скуга [13] зі зменшеним вмістом макросо-

лей при 16-годинному освітленні та температурі +24°C. *A. rhizogenes* A4 з векторною конструкцією pCB161 [14], яка мала цільовий ген *ifn-a2b* та селективний ген *nptII*. Наявність останнього дозволила здійснювати селекцію трансгенних коренів на живильному середовищі, що містило 25 мг/л канаміцину. Наявність та транскрибування генів *ifn-a2b*, *nptII*, *rollB* визначали відповідно методами ПЛР та ЗТ-ПЛР на ампліфікаторі