

УДК 579.254.2:581.143.5

АКТИВНОСТЬ ИНВЕРТАЗЫ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ, ИНФИЦИРОВАННЫХ IN PLANTA ШТАММОМ *AGROBACTERIUM* *TUMEFACIENS* GV2260, СОДЕРЖАЩИМ ПЛАЗМИДУ pCB002

Е.Н. ТИЩЕНКО,¹ В.Д. САКАЛО,¹ А.Ю. МАТВЕЕВА,¹ В.М. КУРЧИЙ,¹ Б.В. МОРГУН²

¹Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины
03022 Киев, ул. Васильковская, 31/17

²Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной
академии наук Украины
03680 Киев, ул. Академика Заболотного, 148

Исследовали активность инвертазы и содержание углеводов в побегах 9-суточных этиолированных проростков и в эндосперме зерновок в фазе молочно-восковой спелости канамициностойчивых растений кукурузы, полученных после инфицирования in planta одновременно с опылением штаммом *Agrobacterium tumefaciens* GV2260, содержащим плазмиду pCB002. Установлена тканеспецифичность функционирования кислой и щелочной форм инвертазы, а также содержания сахарозы, моносахаров и крахмала. Полученные данные свидетельствуют об изменении метаболизма сахарозы в ответ на агробактериальную инфекцию.

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

По современным представлениям, сахароза и продукты ее гидролиза — моносахара рассматриваются в качестве сигнальных и регуляторных молекул, принимающих участие в процессах развития растений. На пути передачи сигналов и регуляцию экспрессии генов могут оказывать влияние внутренние и внешние факторы, в том числе и стрессоры [4, 14]. Одним из последних является патоген — агробактерия *Agrobacterium tumefaciens*, способная переносить T-ДНК Ti-плазмиды в геном растений, на чем базируется разработка молекулярных биотехнологий [9]. Вместе с тем реакция растений на агробактериальную инфекцию может быть связана с изменениями в основных метаболических процессах, в частности — в углеводном обмене. Этим обусловлен интерес к инвертазе (КФ 3.2.1.26), которая необратимо гидролизует сахарозу с последующим включением моносахаров в гликолиз и дыхательный метаболизм [4, 14]. Существует несколько форм инвертазы, отличающихся оптимумом рН и локализацией в клетке. Среди кислых форм (оптимум рН ~ 4,5) различают вакуолярную и апопластную инвертазу, не связанную с клеточной стенкой (ВИ), а также инвертазу, образующую ионную связь с клеточной стенкой (ИКС). Щелочная (цитоплазматическая) инвертаза (ЦИ) имеет оптимум рН 7,0—7,8. Каждая из форм инвертазы кодируется небольшим семейством генов и представлена несколькими изоформами [6—8, 11, 13]. Регуляция их активности может осуществляться на транскрипционном, посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях [7, 10—12]. Различные формы инвертазы характеризуются тканеспеци-

фичностью и направленностью потоков образованных ими гексоз в различные метаболические пути в онтогенезе растений [6, 18, 19].

Вместе с тем вопросы, связанные с углеводно-ферментными комплексами в процессе трансгенеза растений, изучены крайне слабо [15, 16]. Ранее нами установлено повышение активности ферментов синтеза сахарозы и ее включения в метаболизм в морфогенном канамициноустойчивом каллусе [2]. Предположено, что через гексозы может осуществляться взаимодействие в путях передачи сигналов, активирующих, с одной стороны, агробактериальную *vir*-регуляторную систему процессинга и переноса рекомбинантных ДНК, с другой — процесс роста и дифференцировки клеток растений.

Целью данной работы было изучение влияния инфицирования генеративных органов кукурузы *in planta* обезоруженным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* на активность инвертазы, содержание углеводов в побегах этиолированных проростков (растения T0) и в эндосперме зерновок в фазу молочно-восковой спелости (растения T1).

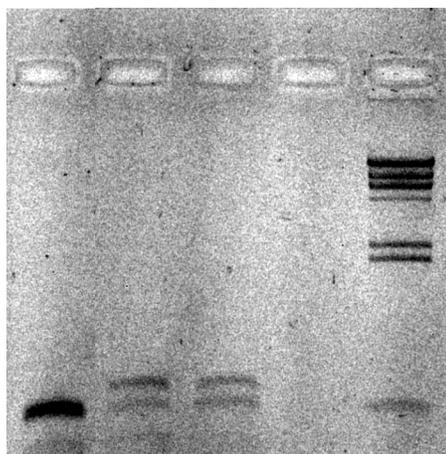
Методика

Генетическую трансформацию инбредной линии кукурузы Л370 (селекции Института физиологии растений и генетики НАН Украины) проводили частично модифицированным нами методом Чумакова и соавт. [5], согласно которому после изоляции пестичных нитей осуществляли инокуляцию агробактерий одновременно с опылением (растения T0). Использовали ночную культуру штамма *Agrobacterium tumefaciens* GV2260, выращенную в жидкой LB-среде при 200 об/мин, 28 °С. Векторная конструкция содержала гены *E. coli*: селективный — неомицинфосфотрансферазы (*nptII*) и репортерный — β-глюкуронидазы. Зрелые зерновки T0-растений стерилизовали 20 мин в 96 %-м спирте, 40 мин — в 10 %-м растворе хлорамина, трижды промывали стерильной водой и проращивали на модифицированной MS-среде с добавлением селективного агента — канамицина (Km) концентрацией 50 мг/л при 25 °С и 16-часовом фотопериоде. Селекцию проводили в течение двух пассажей продолжительностью по 2 недели. В листьях Km-устойчивых побегов сохранялась зеленая окраска. ДНК выделяли из зрелых зерновок (T0) и побегов (T0-растений) частично модифицированным методом Деллапорта [1]. Наличие гена *nptII* в геноме кукурузы определяли ПЦР-методом с использованием праймеров 5'-CCTGAATGAACTCCAGGAGGAGGCA (F) и 5'-GCTCTAGATCCAGAGTCCCCGCTCAGAAG (R). Условия амплификации ДНК: предденатурация — 94 °С, 4 мин; 35 циклов — денатурация 94 °С, 30 с; реассоциация — 53 °С, 30 с; синтез — 53 °С, 30 с; конечная элонгация — 72 °С, 35 с (амплификатор — Mastercycler 5332 Eppendorf). Реакционная смесь содержала 10 нг ДНК. Электрофорез проводили в 1,2 %-м агарозном геле при напряженности поля 5 В/см в течение 45 мин в буфере 1xTBE.

Инвертазу побегов 9-суточных этиолированных проростков, выращенных при 25 °С, а также эндосперма зерновок в фазу молочно-восковой спелости T1-растений кукурузы выделяли частично модифицированным нами методом [3]. Растительную ткань (0,5 г) гомогенизировали в буфере А, содержащем 0,05 М *tris*-HCl (pH 7,5), 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ и 10 мМ MgCl₂. После центрифугирования при 20 000 g надосадочную жидкость фракционировали сульфатом аммония от 0 до 90 % насы-

шения. Осадок растворяли в минимальном объеме буфера А, диализировали в течение 12 ч в том же буфере, разбавленном в 10 раз. В полученном диализате, содержащем растворимую инвертазу, определяли белки по Лоури. Осадок, оставшийся после центрифугирования клеточного гомогената, промывали буфером А, инкубировали в течение 6 ч при 4 °С в буфере, содержащем 1 М NaCl, постоянно встряхивая. После солюбилизации белковую фракцию диализировали и использовали для определения активности инвертазы и количества белков, представленных преимущественно белками клеточных стенок [6]. Активность инвертазы определяли по количеству образующихся моносахаров [17]. Для цитоплазматической инвертазы использовали инкубационную смесь следующего состава: 1/15 калийфосфатный буфер (рН 7,0) — 50 мкл, сахараза — 20 мкмоль, ферментный препарат — 50 мкл, для вакуолярной и не связанной с клеточной стенкой форм инвертазы — 1 М ацетатный буфер (рН 4,7) — 50 мкл, сахараза — 20 мкмоль, ферментный препарат — 50 мкл. Содержание сахаразы, моносахаров и крахмала определяли методами, описанными нами ранее [3, 17]. В агробактериальном штамме ночной культуры активность инвертазы, определяемая теми же методами, не обнаружена. В таблицах представлены средние значения и стандартные отклонения шести аналитических и двух биологических повторностей опыта. Достоверность полученных результатов определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение



Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК инбредной линии Л370, трансформированной *in planta* штаммом *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 (pCB002) с использованием праймеров к селективному гену *nprII*:

1 — ДНК зерновок нетрансформированных растений; 2 — ДНК зерновок, трансформированных *in planta* (T0); 3 — ДНК листьев T0-проростков, устойчивых к Km (50 мг/л); 4 — негативный контроль; М — маркер молекулярных масс — ДНК бактериофага λ, гидролизованная HindIII; стрелкой указан фрагмент, размер которого соответствует ожидаемой длине 649 пн

После *Agrobacterium*-опосредованной трансформации *in planta* с использованием штамма GV2260, содержащего плазмиду pCB002, получены початки растений инбредной линии кукурузы Л370 (T0). Для исследования компетентности к агробактериальной инфекции инокулированных генеративных тканей проведен молекулярно-генетический анализ зрелых зерновок (T0-растений), произвольно выбранных из полученных початков, а также листьев побегов (T0), устойчивых к селективному агенту — канамицинсульфату, необходимая и достаточная концентрация которого составляла 50 мкг/г ткани (рисунок).

Полученные результаты ПЦР-анализа гена *nprII*, ожидаемый размер которого составляет 649 пн, позволяют предположить, что произошел перенос T-ДНК в клетки и ее интродукция в геном кукурузы.

АКТИВНОСТЬ ИНВЕРТАЗЫ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ

Ферменты гидролиза сахарозы изучали в гетеротрофных тканях кукурузы, молекулярно-генетический анализ зерновок и побегов которой подтвердил наличие гена *nr11*. Поскольку с метаболизмом сахарозы связаны значительные физиолого-биохимические и структурные изменения, происходящие при прорастании и скотоморфогенезе, для понимания роли, которую может оказывать инокуляция генеративных тканей обезоруженными агробактериальными штаммами, важное значение имеет изучение ферментно-углеводного комплекса. В табл. 1 представлены результаты исследования активности инвертазы и содержания белка на ранней стадии онтогенеза инбредной линии кукурузы Л370.

В побегах 9-суточных этиолированных проростков кукурузы (Т0) удельная активность кислых форм инвертазы снижалась: ИКС — на 48 %, ВИ — всего на 15 %. Что касается общей активности кислых форм фермента, то она снижалась только у ВИ (на 39 %). При уменьшении общей активности щелочной инвертазы (на 26 %) ее удельная активность практически не изменялась. При этом общее количество легкорастворимых белков относительно контроля уменьшалось приблизительно в 1,4 раза, а белков клеточных стенок — в ~1,7 раза увеличивалось, что, по-видимому, является отражением изменений в процессе биосинтеза и (или) стабильности аминокислотных последовательностей. Вариабельность общей и удельной активности инвертазы, содержания белка дает основание предположить, что агробактериальная инфекция влияет как на функционирование разных форм фермента, так и на процесс регуляции биосинтеза их белков.

ТАБЛИЦА 1. Активность инвертазы и содержание белков в 9-суточных этиолированных проростках контрольных и Т0-растений кукурузы

Вариант	Удельная активность, мкмоль фруктозы/(мг белка · ч)	Общая активность, мкмоль фруктозы/(г ткани · ч)
Кислая вакуолярная инвертаза		
Контроль	$\frac{25,5 \pm 2,2^*}{100}$	$\frac{163,3 \pm 14,4^*}{100}$
Т0	$\frac{21,8 \pm 0,8^*}{85}$	$\frac{99,8 \pm 3,8^*}{61}$
Щелочная (цитоплазматическая) инвертаза		
Контроль	$\frac{4,8 \pm 0,0}{100}$	$\frac{30,8 \pm 0,0^*}{100}$
Т0	$\frac{5,0 \pm 0,0}{104}$	$\frac{22,7 \pm 0,0^*}{74}$
Инвертаза клеточных стенок		
Контроль	$\frac{11,2 \pm 0,1^*}{100}$	$\frac{10,5 \pm 0,1}{100}$
Т0	$\frac{5,8 \pm 0,1^*}{52}$	$\frac{9,8 \pm 0,2}{93}$
Содержание белка, мг/г ткани		
	легкорастворимого	клеточных стенок
Контроль	$6,35 \pm 0,15^*$	$1,00 \pm 0,10^*$
Т0	$4,50 \pm 0,30^*$	$1,65 \pm 0,05^*$

Здесь и в табл. 2, 3: * контроль — активность инвертазы кукурузы, нетрансформированной обезоруженным штаммом *Agrobacterium tumefaciens*.

ТАБЛИЦА 2. Активность инвертазы и содержание белков в эндосперме зерновок в фазу молочно-восковой спелости контрольных и Т1-растений кукурузы

Вариант	Удельная активность, мкмоль фруктозы/(мг белка · ч)	Общая активность, мкмоль фруктозы / (г ткани · ч)
Кислая вакуолярная инвертаза		
Контроль	$\frac{1,9 \pm 0,1^*}{100}$	$\frac{15,2 \pm 1,1^*}{100}$
Т1	$\frac{2,3 \pm 0,1^*}{121}$	$\frac{17,6 \pm 0,5^*}{116}$
Щелочная (цитоплазматическая) инвертаза		
Контроль	$\frac{1,8 \pm 0,06^*}{100}$	$\frac{14,3 \pm 0,3^*}{100}$
Т1	$\frac{1,1 \pm 0,1^*}{61}$	$\frac{8,5 \pm 0,5^*}{59}$
Инвертаза клеточных стенок		
Контроль	$\frac{2,7 \pm 0,1}{100}$	$\frac{4,5 \pm 0,4^*}{100}$
Т1	$\frac{3,0 \pm 0,2}{111}$	$\frac{5,2 \pm 0,5^*}{116}$
Содержание белка, мг/г ткани		
	легкорастворимого	клеточных стенок
Контроль	7,95 ± 0,55	1,65 ± 0,30
Т1	7,75 ± 0,05	1,70 ± 0,00

В эндосперме в фазу молочно-восковой спелости контрольных и Т1-растений кукурузы активность инвертазы значительно ниже, чем в побегах этиолированных проростков (табл. 2), что объясняется синтетической направленностью углеводного метаболизма при формировании и наливе зерновки. В эндосперме зерновок Т1-растений происходит значительное (на 40 %) ингибирование удельной и общей активности щелочной инвертазы, тогда как для кислых форм фермента наблюдается тенденция к ее повышению. При этом содержание легкорастворимых белков и белков клеточных стенок в норме и в эндосперме зерновок Т1-растений достоверно не отличается.

В побегах 9-суточных этиолированных проростков кукурузы (Т0) снижается накопление крахмала (на 20 %), моносахаров (на 12 %) при незначительном повышении содержания сахарозы (на 10 %), тогда как в эндосперме зерновок при неизменном уровне крахмала снижается содержание моносахаров и значительно повышается уровень сахарозы (на 73 %) (табл. 3). В нефотосинтетических тканях Т1-растений кукурузы увеличение соотношения сахарозы к моносахарам и, следовательно, изменение баланса гексоз, принимающих участие в метаболических процессах в онтогенезе кукурузы было неодинаковым, что, по-видимому, является результатом снижения активности разных форм инвертазы: в проростках — кислых, в эндосперме — щелочной. Отметим также, что в эндосперме зерновок инфицирование обезоруженным штаммом агробактерии не оказывает существенного влияния на интенсивность крахмалообразования. Таким образом, в гетеротрофных тканях канамидинустойчивых растений кукурузы на разных этапах онтогенеза наблюдались тканеспецифичность функционирования разных форм фермента гидролиза сахарозы и разные соотношения сахарозы к моносахарам.

АКТИВНОСТЬ ИНВЕРТАЗЫ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ

ТАБЛИЦА 3. Содержание углеводов (мкмоль/г ткани) в побегах 9-суточных этиолированных проростков, эндосперме зерновок в фазу молочно-восковой спелости контрольных и T1-растений кукурузы

Вариант	Моносахара	Сахароза	Крахмал	$\frac{\text{Сахароза}}{\text{Моносахара}}$
Побеги 9-суточных этиолированных проростков				
Контроль	$\frac{83,5 \pm 1,7^*}{100}$	$\frac{22,5 \pm 0,4^*}{100}$	$\frac{9,9 \pm 0,2^*}{100}$	0,27
T0	$\frac{73,3 \pm 1,1^*}{88}$	$\frac{24,8 \pm 0,9^*}{110}$	$\frac{7,9 \pm 0,2^*}{80}$	0,34
Эндосперм в фазу молочно-восковой спелости				
Контроль	$\frac{77,2 \pm 0,6^*}{100}$	$\frac{187,3 \pm 5,8^*}{100}$	$\frac{685,9 \pm 14,7}{100}$	2,4
T1	$\frac{53,3 \pm 0,5^*}{69}$	$\frac{324,6 \pm 2,7^*}{173}$	$\frac{698,8 \pm 3,4}{102}$	6,1

Предполагают, что гексозы принимают участие в путях передачи сигналов и на мембране, и в цитоплазме в ходе метаболизма сахарозы. Их избыток может генерировать инвертаза вакуолей, где преимущественно происходит гидролиз сахарозы в процессе роста и развития растений [14]. Существенное снижение общей активности ВИ побегов этиолированных проростков кукурузы (T0) возможно произошло в результате изменений в регуляции экспрессии генов. В отличие от этого в эндосперме в фазу молочно-восковой спелости отдаленные последствия агробактериальной инфекции проявляются в ингибировании удельной и общей активности щелочной инвертазы (ЦИ), в то время как у кислых форм инвертазы наблюдается их незначительная стимуляция.

Считается, что из-за низкой активности ЦИ образуется ограниченное количество гексоз как сигнальных молекул, и эту функцию приписывают ИКС [14]. В нашем случае действительно в разных гетеротрофных тканях абсолютные значения активности ЦИ были ниже, чем ИКС. Инфицирование штаммом GV2260 (pCB002) хотя и приводит к двукратному снижению удельной активности ИКС в побегах этиолированных проростков, ее общая активность практически не меняется в отличие от ЦИ, которая существенно уменьшается. Иная ситуация характерна для эндосперма зерновок. Несмотря на то что активность ИКС даже повышается, а ЦИ — резко падает по сравнению с контролем, соотношение сахарозы к моносахарам увеличивается в ~2,5 раза (при этом в побегах — примерно в 1,5 раза). Очевидно, это является результатом снижения активности ЦИ. В конечном итоге синтезируется меньшее чем в норме количество моносахаров как предполагаемых сигнальных молекул. Таким образом, в зависимости от типа гетеротрофной ткани T1-растений в установлении баланса сахарозы и продуктов ее гидролиза определяющее значение могут иметь не только инвертаза клеточных стенок, но и другие формы инвертазы.

В целом показана тканевая специфичность изменений активности щелочной и кислых форм инвертазы в ответ на инфицирование обезоруженным штаммом *Agrobacterium tumefaciens* при опылении растений. В побегах этиолированных проростков уровни моносахаров и крахмала снижаются, содержание сахарозы незначительно повышается. Отмечено значительное ингибирование удельной активности ИКС, однако общая

ее активность остается на уровне контроля, поскольку интенсифицируется синтез белков клеточных стенок. При этом удельная активность ВИ существенно не изменяется, однако в результате снижения синтеза легкорастворимых белков ингибируется общая ее активность. В фазу молочно-восковой спелости кукурузы в эндосперме, где активно синтезируется крахмал, наблюдается высокое содержание сахарозы при неизменном уровне накопления крахмала и белков. Уменьшение содержания моносахаров связано в основном с ингибированием активности ЦИ. В то же время наблюдается тенденция к повышению активности кислых форм инвертазы. Полученные данные свидетельствуют об изменении функционирования инвертазы и содержания углеводов в процессе трансгенеза растений.

1. Драйпер Дж., Скотт Р., Армидж Ф., Уолден Р. Генная инженерия растений. — М.: Мир, 1991. — 408 с.
2. Матвеева А.Ю., Сакало В.Д., Курчий В.М., Тищенко Е.Н. Активность сахарозсинтазы и инвертазы морфогенного и неморфогенного каллусов, полученных из незрелых зародышей кукурузы (*Zea mays* L.), инфицированных *Agrobacterium tumefaciens* // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. — 2010. — 8. — С. 18–24.
3. Сакало В.Д., Ларченко К.А., Курчий В.М. Синтез і метаболізм сахарози в листках проростків кукурудзи за умов водного дефіциту // Физиология и биохимия культ. растений. — 2009. — 41, № 4. — С. 305–313.
4. Сакало В.Д. Регуляція метаболізму сахарози у свеклы и других культур. — Киев: Логос, 2006. — 248 с.
5. Чумаков М.И., Рожок Н.А., Великов В.А. и др. Трансформация кукурузы путем инокуляции агробактериями пестичных нитей in planta // Генетика. — 2006. — 42, № 8. — С. 1083–1088.
6. Carlson S.J., Courey P. Reevaluation of the relative roles of two invertases, GNCW2 and GVR1, in developing maize kernels and other tissues // Plant Physiol. — 1999. — 121. — P. 1025–1035.
7. Cheng W.-H., Talliecio E.W., Chourey P.S. Sugars modulate an unusual mode of control of cell wall invertase gene Incw 1 through its 3 untranslated region in a cell suspension culture of maize // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1999. — 96. — P. 10512–10517.
8. Cheng W.-H., Talliecio E.W., Chourey P.S. The Miniature seed locus of maize encodes a cell wall invertase required for normal development of endosperm and maternal cells in the pedicel // Plant Cell. — 1996. — 8, N 6. — P. 971–983.
9. Gelvin S.B. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the «gene-jockeying» tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. — 2003. — 67. — P. 16–37.
10. Huang L.-F., Boccock P.N., Davis J.M., Koch K.E. Regulation of invertase: a «suite» of transcriptional and post-transcriptional mechanisms // Functional Plant Biol. — 2007. — N 34. — P. 499–504.
11. 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. — 165, N 3. — P. 331–344.
12. Jin Ye., Ni D.-A., Ruan Y.L. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level // Plant Cell. — 2009. — 21. — P. 2072–2089.
13. Kim J.Y., Mahe A., Guy S. et al. Characterization of two members of the maize gene family, Insw3 and Insw4, encoding cell-wall invertase // Gene. — 2000. — 245. — P. 89–102.
14. Koch K. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development // Curr. Opin. Plant Biol. — 2004. — 7. — P. 235–248.
15. Krausgrill S., Greiner S., Roster U. et al. In transformed tobacco cells the apoplasmic invertase inhibitor operated as a regulatory of switch of cell wall invertase // Plant J. — 1998. — 13, N 2. — P. 275–280.
16. Simoh S., Quitana N., Kim H.K. et al. Metabolic changes in *Agrobacterium tumefaciens* — infected *Brassica rapa* // J. Plant Physiol. — 2009. — 166, N 10. — P. 1005–1014.
17. Sowokinos I.R. Pyrophosphorylases in *Solanum tuberosum* // Plant Physiol. — 1976. — 57. — P. 63–68.
18. Тутowska-Lalanne Z., Kreiss M. The plant invertases: physiology, biochemistry and molecular biology // Adv. Bot. Res. — 1988. — 28. — P. 71–117.

АКТИВНОСТЬ ИНВЕРТАЗЫ РАСТЕНИЙ КУКУРУЗЫ

19. Yu X., Wang X., Zhang W. et al. Antisense suppression of an acid invertase gene (MA11) in muskmelon alters plant growth and fruit development // J. Exp. Bot. — 2008. — 18. — P. 1—9.

Получено 21.01.2011

АКТИВНІСТЬ ІНВЕРТАЗИ РОСЛИН КУКУРУДЗИ, ІНФІКОВАНИХ ІН ПЛАНТА ШТАМОМ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* GV2260, ЩО МІСТИТЬ ПЛАЗМІДУ pCB002

О.М. Тищенко,¹ В.Д. Сакало,¹ О.Ю. Матвеева,¹ В.М. Курчій,¹ Б.В. Моргун²

¹Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України, Київ

²Інститут клітинної біології і генетичної інженерії Національної академії наук України, Київ

Досліджували активність інвертази і вміст вуглеводів у пагонах 9-добових етіюльованих проростків та в ендоспермі зернівок у фазі молочно-воскової стиглості канаміцинстійких рослин кукурудзи, отриманих після інфікування in planta одночасно із запиленням штамом *Agrobacterium tumefaciens* GV2260, який містить плазмиду pCB002. Встановлено тканиноспецифічність функціонування кислої і лужної форм інвертази, а також вмісту сахарози, моноцукрів і крохмалю. Отримані дані свідчать про зміни метаболізму сахарози у відповідь на агробактеріальну інфекцію.

INVERTASE ACTIVITY OF MAIZE PLANTS INFECTED IN PLANTA WITH *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* STRAIN GV2260 HARBORING VECTOR pCB002

E.N. Tishchenko,¹ V.D. Sacalo,¹ A.Yu. Matveyeva,¹ V.M. Kurchiy,¹ B.V. Morgun²

¹Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine
31/17 Vasykivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

²Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine
148 Akademik Zabolotny St., Kyiv, 03680, Ukraine

Activity of invertase and carbohydrates content in the 9-days maize (*Zea mays* L.) etiolated seedlings as well as in endosperm of the developing kernels at milk-waxy maturity in kanamicine-resistant plants obtained after infection in planta simultaneously with pollination by strain GV2260 harboring vector pCB002 were investigated. Tissue specificity of acidic and alkaline forms of invertase as well as sucrose, monosugar and starch content were determined. Obtained data argue about changes of sucrose metabolism in answer to agrobacterial infection.

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