

ФИЗИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ РАСТЕНИЙ

УДК 581.143.6:635.21

doi: 10.17223/19988591/28/10

А.Н. Дерябин, Т.И. Трунова

Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, г. Москва, Россия

Морфофизиологические и биохимические характеристики растений картофеля, экспрессирующих ген *SUC2* инвертазы *Saccharomyces cerevisiae*, при выращивании *in vitro*

Исследовано влияние экспрессии целевого гена *suc2*, кодирующего внеклеточную инвертазу дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (апопластный вариант локализации фермента), на морфофизиологические и биохимические показатели трансформированных растений картофеля в процессе их роста и развития в условиях *in vitro*. По сравнению с контрольными (нетрансформированными) растениями картофеля (*Solanum tuberosum* L., cv. Désirée) трансформанты в период выращивания на среде Мурасиге и Скуга, содержащей 2% сахарозы, более активно поглощали из питательной среды осмотически активные соединения (главным образом, сахарозу). Хроматографический анализ показал преобладание в листьях исследуемых растений метаболически активных форм сахаров: глюкозы и фруктозы, а также сахарозы. Повышенная активность кислой инвертазы у трансформантов, по сравнению с контролем, способствовала большему накоплению сахаров в апопласте (фруктозы), листьях (глюкозы, сахарозы) и особенно в корнях (глюкозы). Установлен ростингибирующий эффект сахаров – трансформанты обладали пониженными ростовыми и весовыми параметрами (длина побега, число междоузлий, свежая масса корней и листьев) и большей обводненностью тканей. Морфометрические и физиолого-биохимические различия между линиями обсуждаются с позиции физиологической роли сахаров и апопластной инвертазы в процессах роста и развития растений.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*; *Solanum tuberosum* L.; апопласт; ген *suc2*; инвертаза; культура *in vitro*; осмотический потенциал; сахара.

Введение

Картофель (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) является важнейшей пищевой и технической культурой не только в нашей стране, но и во всем мире. В настоящее время его выращивают более чем в 100 странах мира, однако примерно 40% мирового производства сосредоточено в Индии, Китае и Российской Федерации. В процессе вегетации картофель способен накапливать вирусную инфекцию, резко снижающую урожайность клубней.

Однако в мире существует система безвирусного семеноводства, основанная на получении в условиях *in vitro* безвирусных растений и клубневого потомства [1–3]. Увеличение количества оздоровленного материала осуществляется через оптимизацию условий микроразмножения растений [4], в том числе углеводного состава среды выращивания [5]. При приготовлении питательных сред для микроклонального размножения растений в качестве углеводного компонента чаще всего применяют дисахарид сахарозу в концентрации 2–4%. Это связано с тем, что *in vivo* именно сахароза является преобладающей транспортной формой сахаров во флоэме. Однако в клетках растений сахароза не может быть использована непосредственно для обменных процессов. Предварительно молекула сахарозы должна вступить в необратимую реакцию гидролиза, которую катализирует, в частности, ключевой фермент углеводного метаболизма β -Фруктофуранозидаза (инвертаза, К.Ф. 3.2.1.26) с образованием двух нефосфорилированных молекул гексоз – глюкозы и фруктозы.

В растениях идентифицированы следующие формы фермента: 1) кислая растворимая инвертаза, локализованная в вакуоли (вакуолярная инвертаза); 2) кислая нерастворимая инвертаза, находящаяся в апопласте (апопластная инвертаза); 3) щелочная или нейтральная инвертаза, представленная растворимыми белками, локализованными в цитоплазме (в основном), а также в митохондриях и ядре (цитоплазматическая инвертаза) [6, 7]. Инвертаза задействована в модификации внутриклеточного состава и соотношения растворимых сахаров в различных компартментах клетки, обеспечении гексозами энергетических процессов роста и развития растений [6]. Принимая во внимание непосредственный контакт корневой системы пробирочных растений с питательной средой, можно сказать, что важное значение имеет апопластная инвертаза, катализирующая гидролиз сахарозы, находящейся в свободном пространстве клеток (апопласте) [3]. Полагают, что основными функциями апопластной инвертазы являются контроль уровня сахарозы в апопласте, транспорта сахарозы через плазмалемму, а также регуляция флоэмной разгрузки [6]. Установлено, что в условиях *in vivo* изменение активности апопластной инвертазы и, как следствие, внутриклеточной концентрации растворимых сахаров у растений оказывает влияние на экспрессию генов, задействованных в усилении/ослаблении пути биосинтеза белков, липидов, органических кислот и других метаболитов [8].

В связи с этим научный интерес представляет линия растений картофеля с модифицированным углеводным метаболизмом, вызванным интеграцией в геном целевого гена *suc2*, кодирующего инвертазу *Saccharomyces cerevisiae* и находящегося под контролем промотора пататина B33 класса 1 (апопластный вариант локализации фермента). Использование гена *suc2* в качестве целевого обусловлено тем, что инвертаза дрожжей чужеродна для картофеля, в связи с чем ее активность не подавляется растительными ингибиторами [9]. Кроме того, по сравнению с растительными инвертазами

оптимум активности инвертазы *S. cerevisiae* находится в более широком диапазоне pH. Интересы ученых, работавших с этой линией картофеля, были направлены на изучение функциональной активности кодируемого геном *suc2* белка инвертазы в условиях гетерологичной экспрессии и вызываемых им изменений в углеводном метаболизме и процессе клубнеобразования. Установлено, что растения, трансформированные геном инвертазы дрожжей, по сравнению с контрольными (нетрансформированными) растениями, имели сниженный порог концентрации (1–2%) сахарозы, необходимой для инициации клубнеобразования *in vitro* [10], повышенную активность кислых инвертаз и более высокое содержание сахаров (преимущественно глюкозы) в клубнях [11, 12]. Листья трансформантов характеризовались низкой скоростью фотосинтеза [13], высокой активностью кислых инвертаз, повышенным содержанием сахаров и пониженной чувствительностью к гипотермии [14–16] и окислительному стрессу, вызванному паракватом [17]. Мы предположили, что вызванные деятельностью дополнительной апопластной инвертазы дрожжей изменения состава внутриклеточных сахаров должны отразиться на росте и развитии трансформантов картофеля в условиях *in vitro*. В связи с этим цель данного исследования состояла в изучении влияния конститутивной экспрессии целевого гена *suc2* инвертазы дрожжей *S. cerevisiae* (апопластный вариант локализации фермента) на некоторые морфофизиологические и биохимические показатели трансформированных растений картофеля, выращиваемых в условиях *in vitro*.

Материалы и методики исследования

Объектом исследования служили растения картофеля среднеспелого сорта Дезире (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) (далее обозначены как WT-растения) и созданная на их основе линия, трансформированная вектором, содержащим ген *suc2*, находящийся под контролем *B33*-промотора пататина класса 1 (далее обозначены как *B33-inv*-растения). При конструировании трансгена использовался фрагмент *Asp718/SalI* из PI-3-INV плазмиды, содержащий ген *suc2* дрожжей *S. cerevisiae*, кодирующий зрелый белок инвертазы, соединенный с последовательностью сигнального пептида ингибитора протеиназы II картофеля, обеспечивающей апопластную локализацию фермента [9]. Поскольку пататин класса 1 – главный запасной белок в клубнях картофеля, то *B33* промотор осуществлял преимущественно клубнеспецифичную экспрессию контролируемого им гена [18]. Определение активности *B33*-промотора в различных вегетативных органах трансформированных растений картофеля подтвердило его высокую тканеспецифичность, но также выявило ограниченную активность пататинового промотора в корнях и листьях [14, 19].

Растения-регенеранты были селектированы на среде Мурасиге и Скуга [20], содержащей канамицин, и проверены на экспрессию трансгена мето-

дом Northern блот-гибридизации в Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology (Potsdam-Golm, Германия) [12, 21]. Наши последующие эксперименты подтвердили активную экспрессию целевого гена *suc2* в геноме *B33-inv*-растений и показали, что синтезируемый им белок инвертазы дрожжей *S. cerevisiae*, благодаря наличию лидерного пептида ингибитора протеиназы II картофеля, транспортируется в апопласт, присутствует в этом компартменте в растворимой форме, слабо адсорбируясь на клеточной стенке, и проявляет высокую ферментативную активность [13–16, 22].

Растения картофеля размножали микрочеренкованием на стеблевые черенки с одной пазушной почкой и листом и выращивали в жидкой питательной среде на фильтровальных мостиках в пробирках (диаметр 13 мм), уплотненных ватно-марлевыми пробками, в камере Фитотрона ИФР РАН при температуре 22°C и 16-часовом световом дне при освещённости 100 $\mu\text{моль квантов/м}^2\cdot\text{с}$ (лампы L80W OSRAM, Россия) в течение 4–5 недель. Каждая пробирка содержала один стеблевой черенок и 9,0 мл питательной среды. Для размножения растений использовали безгормональную питательную среду на минеральной основе по прописи Мурасиге и Скуга (далее МС-среда), дополненную 2% сахарозы и витаминами B_1 , B_6 (по 0,5 мг/л) и инозитом (60 мг/л), pH 5,8. Для скрининга питательных сред, оптимальных для роста и развития *B33-inv*-растений, также использовали МС-среду, дополненную 2% глюкозы или 2% фруктозы. Материалом для биохимических исследований служили жидкая питательная среда, корни растений и листья из среднего участка побега.

Осмоляльность питательной среды измеряли криоскопическим методом, используя осмометр Osmomat 030 «Gonotec» (Германия). Метод основан на понижении точки замерзания растворов по сравнению с точкой замерзания чистого растворителя. Объем одной пробы питательной среды составлял 50 мкл, биологическая повторность 4-кратная. Полученные значения переводили в осмотический потенциал ($\Psi_{\text{осм}}$, МПа) согласно уравнению регрессии: $\Psi_{\text{осм}} = 0,0024 \times x + 0,0105$, где x – осмоляльность, мОсмоль/кг [23].

Выделение различных фракций инвертаз из корней и листьев проводили, как описано ранее [14]. Об активности фермента судили по количеству глюкозы, образовавшейся при гидролизе сахарозы в инкубационной среде, содержащей 0,2 мл фракции фермента и 0,3 мл буфера с сахарозой (конечная концентрация сахарозы составляла 150 мМ). Для определения активности кислой (вакуолярной или апопластной) инвертазы инкубационная среда включала ацетатный буфер (pH 4,7), а для определения активности щелочной/нейтральной (цитоплазматической) инвертазы – фосфатно-цитратную буферную смесь (pH 7,5). Активность фермента выражали в мкмоль глюкозы, образовавшейся при гидролизе сахарозы в инкубационной среде за 1 час в расчете на объем навески, взятой для анализа.

Апопластную жидкость из листьев получали по методу Hon et al. [24]. Для этого навеску листьев без черешков массой 0,8–1,0 г отделяли от 10–16 рас-

тений и помещали в пробирку с 30 мл 20 мМ фосфатного буфера (pH 4,94), дополненного 1 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитола и 0,1 мМ фенилметилсульфонил флуорида. С помощью вакуумного насоса проводили инфильтрацию. Под действием создаваемого насосом вакуума воздух удалялся из внутренних полостей листьев, а после выравнивания атмосферного давления межклетники заполнялись буферным раствором. После инфильтрации листья подсушивали, располагая между листами фильтровальной бумаги, и помещали в пробирку с отверстием на дне, которую, в свою очередь, размещали внутри центрифужной пробирки большего диаметра. Центрифугирование проводили при 1500g в течение 15 мин. Режим центрифугирования был подобран в предварительных опытах и гарантировал отсутствие цитоплазматического загрязнения в апопластной жидкости.

Качественный состав углеводов в листьях определяли методом газожидкостной хроматографии на хроматографе Кристалл 5000.1 фирмы «Хроматек» (Россия), получая из лиофильно высушенного экстракта триметилсилильные производные сахаров [25]. В качестве внутреннего стандарта использовали α -метил-D-маннозид («Merck», Германия). В работе применяли капиллярную колонку ZB-5, 30 м, 0,32 мм, 0,25 мкм фирмы «Phenomenex» (США) и температурную программу от 130 до 270°C со скоростью 5–6 град/мин. В качестве метчиков использовали D-фруктозу, D-глюкозу, D-инозит, D-сахарозу, D-раффинозу фирмы «Sigma» (США).

Содержание фруктозы определяли по методу Рое, основанному на реакции кетоз с резорцином, с последующим пересчётом содержания сахарозы [26]. Содержание глюкозы определяли глюкозооксидазным методом, используя набор реагентов «Агат-глюкоза» (ООО «Агат-Мед», Россия).

Статистическую обработку данных проводили в программе T-tests («ISI», США) и визуализировали при помощи графического математического пакета Microcal Origin («Microcal Software Inc.», США). На рисунках и в таблицах представлены среднеарифметические значения типичного опыта и их стандартные ошибки. В работе обсуждаются различия, статистически значимые при 95%-ном уровне.

Результаты исследования и обсуждение

Культивируемые *in vitro* растения картофеля находятся в строго контролируемых по параметрам внешней среды условиях и представляют удобную модель для научных исследований, в силу возможности направленной модификации факторов выращивания. Установлено, что качественный и количественный состав компонентов, входящих в питательную среду, напрямую влияет на рост и развитие растений *in vitro* [27]. Учитывая у пробирочных растений лимитирование автотрофного типа питания из-за низкого уровня CO₂ вследствие ограничения газообмена, заметим, что одним из главных лимитирующих факторов для их оптимального роста и развития становится

качественный состав углеводов питательной среды. В связи с этим необходимо было выявить углеводный источник, оптимальный для роста и развития *B33-inv*-растений в условиях *in vitro*. Для этого стеблевые черенки были помещены на фильтровальные мостики с МС-средой либо без углеводов (автотрофный тип питания), либо содержащей 2% сахарозы, или глюкозы, или фруктозы (преимущественно гетеротрофный тип питания). Анализ длины побегов, проведенный на 28-е сутки культивирования, показал, что оптимальной для роста и развития обеих линий растений является МС-среда, дополненная 2% сахарозы (табл. 1). Средняя длина побега у WT-растений при выращивании на этой среде составила $10,6 \pm 0,6$ см, а у *B33-inv*-растений $8,1 \pm 0,7$ см. Использование питательных сред с другими углеводами (2% глюкозы или 2% фруктозы) или без сахаров приводило к визуальному снижению ростовых показателей, в большей мере у *B33-inv*-растений. У обеих линий торможение роста и развития наблюдали при использовании МС-среды без углеводов: длина побега у WT-растений составила $4,5 \pm 0,5$ см, а у *B33-inv* растений $3,2 \pm 0,4$ см.

Таблица 1 / Table 1

Длина побега растений, выращенных *in vitro* на МС-среде с различным составом углеводов (на 28-е сутки после черенкования) /
The length of the shoot of the plants grown *in vitro* in MS-medium
of different composition of carbohydrates (on the 28-th day after cuttings)

Состав питательной среды / Composition of culture medium	Длина побега, см / The length of the shoot, cm	
	WT-растения / WT-plants	<i>B33-inv</i> -растения / <i>B33-inv</i> -plants
МС-среда без углеводов / MS-medium without carbohydrates	$4,5 \pm 0,5$	$3,2 \pm 0,4$
МС-среда + 2% сахарозы / MS-medium + 2% sucrose	$10,6 \pm 0,6$	$8,1 \pm 0,7$
МС-среда + 2% глюкозы / MS-medium + 2% glucose	$6,8 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,3$
МС-среда + 2% фруктозы / MS-medium + 2% fructose	$6,3 \pm 0,7$	$4,0 \pm 0,7$

Примечание. Данные представлены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой по 30 растениям. /

Note. The mean values and their standard errors for 30 plants.

Полученные результаты свидетельствовали, что в условиях *in vitro* ростовые процессы у трансформантов и WT-растений осуществляются преимущественно гетеротрофно, при этом сахара в составе МС-среды являлась оптимальным источником углеводов для их роста и развития. Основываясь на этих данных, все последующие эксперименты были проведены с растениями, выросшими на МС-среде с 2% сахарозы.

Учитывая, что объектом нашего исследования являются растения со встроенным геном дрожжевой инвертазы, а субстратом для инвертазы яв-

ляется сахароза, которая гидролизуется до глюкозы и фруктозы, необходимо было в период роста растений *in vitro* проведение анализа изменений в содержании осмотически активных соединений в среде выращивания. Для определения величины осмотического потенциала еженедельно на протяжении 5 недель выращивания растений брали пробы из питательной среды. Расчеты показали, что осмотический потенциал МС-среды, содержащей 2% сахарозы, в процессе роста и развития растений снижался, свидетельствуя об активном потреблении минеральных и органических соединений, в том числе сахаров (рис. 1). Важно отметить, что на протяжении всего периода выращивания WT-растений величина осмотического потенциала питательной среды была ниже, чем у трансформантов. Можно предположить, что трансформанты, в отличие от WT-растений, поглощали из питательной среды больше осмотически активных соединений.

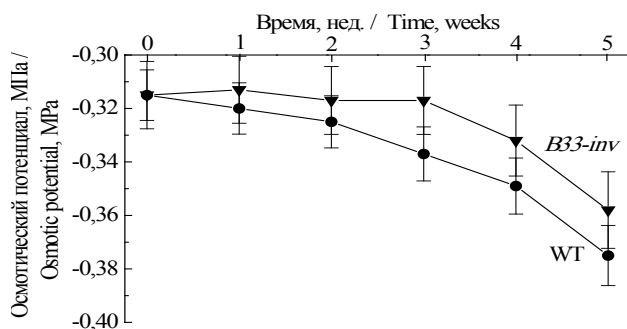


Рис. 1. Динамика изменения значений осмотического потенциала жидкой МС-среды с 2% сахарозы при выращивании WT-растений и трансформантов, экспрессирующих ген *suc2* инвертазы дрожжей (*B33-inv*-растения) /
Fig. 1. Dynamics of changes in osmotic potential of the liquid MS-medium with 2% sucrose while growing WT-plants and transformants expressing the yeast invertase gene *suc2* (*B33-inv*-plants)

Для подтверждения данного предположения проведен сравнительный анализ величин осмотического потенциала МС-среды с 2% сахарозы и МС-среды без углеводов. Из данных табл. 2 можно видеть, что основной вклад в осмотическую составляющую питательной среды вносила сахароза, а не минеральные компоненты. Различия по величине осмотического потенциала МС-среды без сахарозы и МС-среды с 2% сахарозы составляли около 70%: $-0,178$ и $-0,301$ МПа соответственно. Можно заметить, что автоклавирование приводило к частичному распаду сахарозы до глюкозы и фруктозы, однако это несущественно влияло на величину осмотического потенциала.

Принимая во внимание, что основной вклад в изменение осмотического потенциала питательной среды принадлежит сахарам (см. табл. 2), был

проведен их количественный анализ. Согласно полученным данным через 5 недель выращивания растений в питательной среде содержание фруктозы и глюкозы резко возросло, а сахарозы уменьшилось (рис. 2). По сравнению с данными табл. 2 (значения после автоклавирования) концентрация фруктозы в МС-среде возросла в 5–7 раз, глюкозы – в 10 раз по сравнению с исходной (до автоклавирования) величиной. Увеличение содержания моносахаров свидетельствовало об активной работе апопластной инвертазы, находящейся на клеточной стенке клеток корня растений. Важно, что питательная среда, на которой выращивали трансформанты, содержала почти на 30% меньше сахарозы по сравнению со средой выращивания WT-растений. Следовательно, в условиях *in vitro* растения не только поглощали сахарозу из питательной среды, но интенсивно ее гидролизовали с помощью апопластной инвертазы. При этом *B33-inv*-растения, по сравнению с контрольными (нетрансформированными) растениями, более активно потребляли сахарозу из среды выращивания. В литературе имеются сведения [3], что при культивировании растений-регенерантов картофеля в биореакторе концентрация сахарозы в питательной среде к концу второй недели после индукции клубнеобразования снижалась почти до нуля, а концентрация глюкозы и фруктозы повышалась до 4%. Авторы считают, что большая часть сахарозы в питательной среде распадается на глюкозу и фруктозу с помощью апопластной инвертазы растений. Следовательно, при культивировании растительных клеток, тканей и органов *in vitro* в жидкой питательной среде важным фактором (которым нельзя пренебречь!) в изменении углеводного состава питательной среды (наряду с автоклавированием, приводящим к частичному гидролизу сахарозы) является активность апопластной инвертазы.

Полученные результаты, демонстрирующие различие в содержании сахаров в питательной среде при выращивании *in vitro* различных линий растений картофеля, обусловили необходимость определения качественного состава сахаров в их листьях. Хроматографический анализ показал преобладание в листьях обеих линий глюкозы, фруктозы, сахарозы и инозита (рис. 3). Наличие в листьях метаболически неактивного углевода – инозита, видимо, обусловлено его поступлением из питательной среды, обязательным компонентом которой он является. Таким образом, из растворимых форм сахаров в листьях преобладали сахароза, глюкоза и фруктоза, поэтому на изменение содержания именно этих форм растворимых сахаров было ориентировано наше дальнейшее внимание.

Сравнительный анализ содержания глюкозы, фруктозы и сахарозы в вегетативных органах растений выявил большую их концентрацию в корнях, чем в листьях. Спустя 5 недель выращивания корни трансформантов содержали на 33% больше сахаров, чем у WT-растений (13,8 и 10,3 мг/г сырой массы соответственно) (рис. 4, а). Это превышение было связано с более высоким содержанием глюкозы, при этом содержание сахарозы в корнях было в 5 раз ниже, чем у контрольных растений. Листья *B33-inv*-растений,

по сравнению с контролем, содержали сахарозы и глюкозы больше на 20% и 11%, соответственно (рис. 4, *b*). Важно отметить, что содержание фруктозы в органах обеих линий было минорным. Есть основания полагать, что низкому содержанию фруктозы способствует фруктокиназа (КФ. 2.7.1.4), высокая активность которой обеспечивает максимальное использование свободной фруктозы в гликолитическом пути [28].

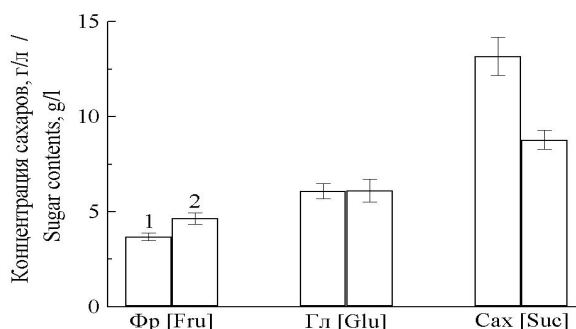


Рис. 2. Изменения концентрации фруктозы (Фр), глюкозы (Гл), и сахарозы (Сах) в МС-среде с 2% сахарозы спустя 5 недель выращивания WT-растений (1) и трансформантов, экспрессирующих ген *suc2* инвертазы дрожжей (2) / Fig. 2. Changes in the fructose (Fru), glucose (Glu) and sucrose (Suc) concentration in the MS-medium containing 2% sucrose after 5 week cultivation of WT-plants (1) and transformants expressing the gene of the yeast invertase *suc2* (2)

Таблица 2 / Table 2

Влияние режима (0,7–0,8 ати, 15 мин) автоклавирования питательной среды на содержание сахаров и осмотический потенциал / Influence of (0,7 to 0,8 excess at, 15 min) autoclaving regime of the culture medium on sugar content and osmotic potential*

Состав питательной среды / Composition of culture medium	Содержание сахаров, г/л / Sugar contents, g/l			Осмотический потенциал, МПа / Osmotic potential, MPa
	сахароза / sucrose	фруктоза / fructose	глюкоза / glucose	
МС-среда + 2% сахарозы / MS-medium + 2% sucrose	$\frac{20,0^{**}}{18,7}$	$\frac{0,0}{0,6}$	$\frac{0,0}{0,6}$	$\frac{-0,301}{-0,315}$
МС-среда без сахаров / MS-medium without carbohydrates	0	0	0	$\frac{-0,178}{-0,188}$

* Осмотический потенциал дистиллированной воды равен нулю / [osmotic potential of distilled water is equal to zero].

** В числителе значения до автоклавирования, в знаменателе после автоклавирования / [in the numerator the values are before autoclaving, in the denominator they are after autoclaving].

Известно, что представители рода *Solanum* относятся к группе растений, использующих апопласт в качестве промежуточного накопителя ассимилятов, в частности сахаров [29].

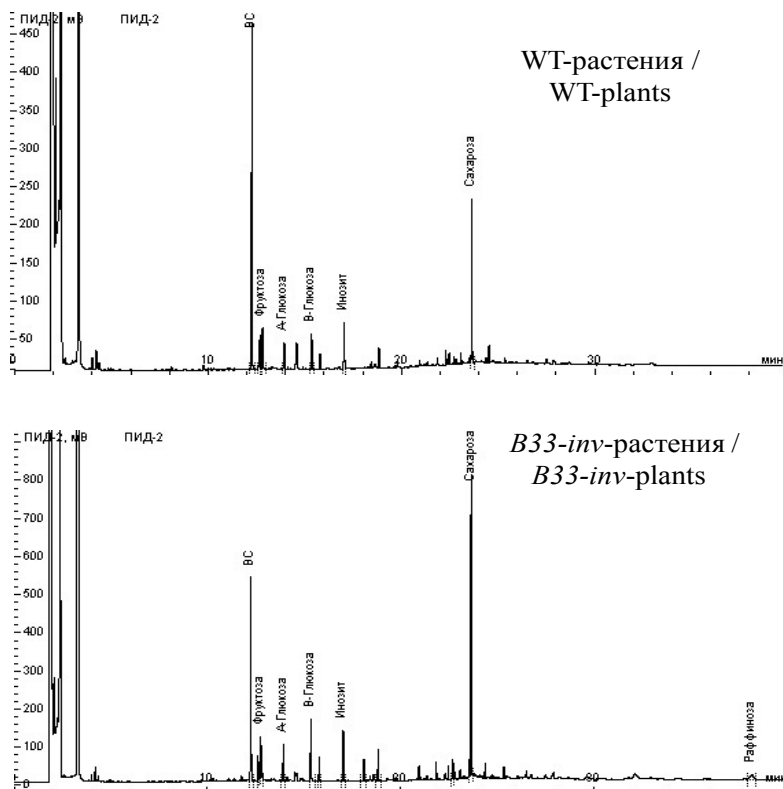


Рис. 3. Хроматограмма состава сахаров листьев WT-растений и трансформантов, экспрессирующих ген *suc2* инвертазы дрожжей (*B33-inv*-растения), выращенных на МС-среде с 2% сахарозы. В качестве метчиков для газожидкостной хроматографии использовали сахарозу, фруктозу, глюкозу, инозит и раффинозу /

Fig. 3. Chromatogram of sugars in leaf tissue of the WT-plants and transformants expressing the gene of the yeast invertase of *suc2* (*B33-inv*-plants) grown in the MS-medium containing 2% sucrose. Sucrose, fructose, glucose, inositol and raffinose were used as markers for gas-liquid chromatography

Учитывая апопластную локализацию инвертазы дрожжей у *B33-inv*-растений, а также тот факт, что условия среды (pH 4,5–4,7) в апопласте соответствуют максимальной активности внеклеточной инвертазы *S. cerevisiae* (оптимум pH 3,5–5,0) [30], у исследуемых линий был проведен анализ содержания сахаров в этом компартменте. Согласно полученным данным, в

апопласте *B33-inv*-растений, в отличие от WT-растений, концентрации глюкозы и фруктозы – продуктов гидролиза сахарозы (субстрат апопластной инвертазы) – были выше на 55 и 40%, соответственно (рис. 4, с). Общее содержание сахаров в апопласте трансформантов также было больше на 40% по сравнению с WT-растениями. Таким образом, данные по содержанию глюкозы, фруктозы и сахарозы в различных органах свидетельствуют, что корни и листья, включая апопласт, у растений, трансформированных геном инвертазы дрожжей, более обогащены сахарами, чем у контроля. Накопление сахарозы в листьях *B33-inv*-растений, видимо, происходит вследствие того, что апопластная инвертаза гидролизует сахарозу, находящуюся во внеклеточном пространстве, а образующиеся свободные фруктоза и глюкоза, поступая в клетки мезофилла, фосфорилируются гексокиназами (К.Ф. 2.7.1.1) и фруктокиназами и включаются в метаболизм, в том числе в путь синтеза сахарозы.

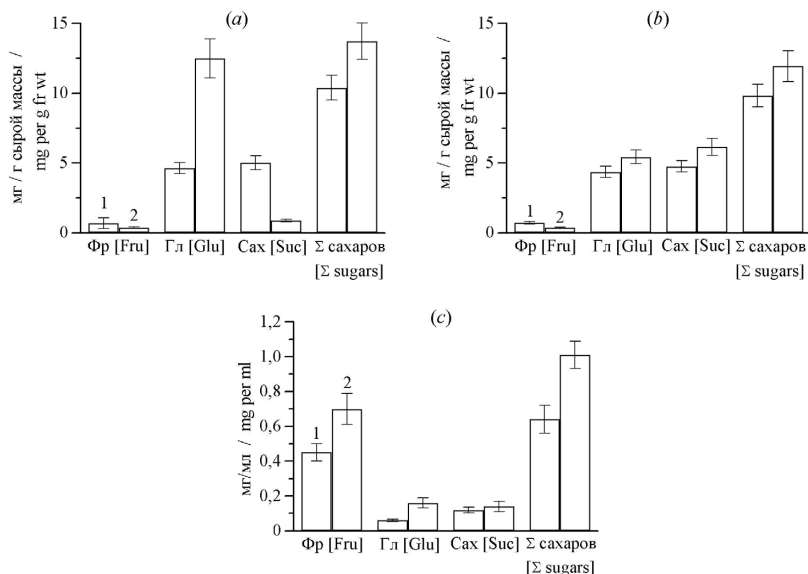


Рис. 4. Содержание фруктозы (Фр), глюкозы (Гл), сахарозы (Сах) и суммы сахаров в корнях (а), листьях (б) и апопласте (с) WT-растений (1) и трансформантов, экспрессирующих ген *suc2* инвертазы дрожжей (2). Растения выращены на МС-среде с 2% сахарозы в течение 5 недель /

Fig. 4. The content of fructose (Fru), glucose (Glu), sucrose (Suc) in the roots (a), leaves (b) and the apoplast (c) in the WT-plants (1) and transformants expressing the gene of the yeast invertase *suc2* (2). Plants were grown in the MS-medium containing 2% sucrose for five weeks

Изменение содержания сахаров в органах *B33-inv*-растений, связанное с экспрессией встроенного целевого гена *suc2* и, как следствие, активностью

дополнительной инвертазы дрожжей апопластной локализации, обусловило необходимость проведения сравнительного анализа активности различных форм инвертаз в корнях и листьях линий растений. Данные показали, что активность инвертазы в корнях и листьях у трансформантов была, чем у WT-растений (рис. 5). В корнях трансформантов активность кислой нерастворимой инвертазы (апопластная инвертаза) была выше более чем в 1,5 раза, а кислой растворимой инвертазы (вакуолярная инвертаза) – более чем в 2 раза, чем у WT-растений. В листьях *B33-inv* растений активность кислой растворимой инвертазы почти в 1,5 раза превышала таковую у WT-растений. Наблюдаемое нами у трансформантов увеличение активности кислой растворимой инвертазы, наряду с увеличением активности кислой нерастворимой инвертазы, указывает на частичную адсорбцию чужеродной инвертазы дрожжей на клеточной стенке растений и свидетельствует об ее нахождении в апопласте *B33-inv* растений в растворимой форме, что было показано нами ранее [22].

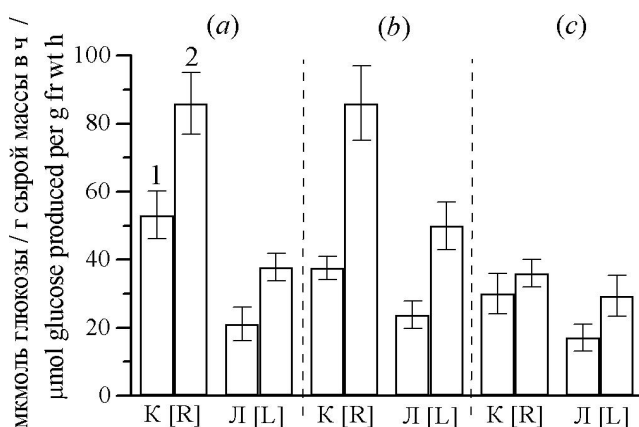


Рис. 5. Активность кислой нерастворимой (a), кислой растворимой (b) и щелочной (c) форм инвертазы в листьях (Л) и корнях (К) WT-растений (1) и трансформантов, экспрессирующих ген *suc2* инвертазы дрожжей (2), выращенных *in vitro* на МС-среде с 2% сахарозы в течение 5 недель /

Fig. 5. Activities of various forms of invertase in leaves (L) and roots (R) in the WT-plants (1), and transformants expressing the gene of the yeast invertase *suc2* (2) grown *in vitro* on MS-medium containing 2% sucrose for five weeks: acid insoluble invertase (a), acid soluble invertase (b), alkaline invertase (c)

Анализ литературных данных свидетельствует о важной роли сахарозы и продуктов её гидролиза (глюкоза, фруктоза) в изменении гормонального баланса растений [31] и регуляции экспрессии генов, ответственных за рост и развитие растений [5, 8], что находит свое подтверждение в их ростингибирующем действии. Выращивание растений на МС-среде, содержащей

2% сахарозы, выявило существенные морфометрические различия между линиями (табл. 3).

Таблица 3 / Table 3

Морфофизиологические показатели растений картофеля
(возраст растений 5 недель) /
Morphometric parameters of the potato plants (5 weeks old)

Показатель / Parameter	WT-растения / WT-plants	<i>B33-inv</i> -растения / <i>B33-inv</i> -plants
Высота побега, см / Shoot length, cm	13,8±0,3	10,6±0,3
Число междоузлий, <i>n</i> / The number of internodes, <i>n</i>	13,0±0,2	11,8±0,3
Свежая масса корней, мг/раст. / Fresh weight of roots, mg/plant	26,2±5,2	10,6±2,1
Свежая масса листьев, мг/раст. / Fresh weight of leaves, mg/plant	80,2±6,4	59,1±8,4
Содержание сухого вещества, % от свежей массы растений / Contents of dry weight, % of the fresh plants	9,61	8,98

Примечание. Данные представлены в виде средней арифметической со стандартной ошибкой по 30 растениям. /

Note. the mean values and their standard errors for 30 plants.

Средняя длина побега у трансформантов была меньше, чем у WT-растений. Определение числа междоузлий показало достоверное снижение этого показателя у трансформантов. Кроме того, *B33-inv* растения характеризовались менее развитой, по сравнению с контролем, корневой системой, имели меньшую массу надземной части и большую обводненность тканей.

Учитывая, что рост является интегральным показателем, отражающим степень адаптации растения к окружающей среде, а также тот факт, что торможение роста сопровождается кардинальной перестройкой метаболизма, связанной с ингибированием энергоёмких анаболических процессов и неспецифическим повышением устойчивости организма к экологическим стрессорам [8], трансформанты, как свидетельствовали наши предыдущие исследования [13, 14], обладали более высоким уровнем конститутивной и индуцируемой пониженной температурой устойчивостью к гипотермии.

Таким образом, управляя синтезом, транспортом и распадом сахарозы, растения регулировали свой рост, развитие и физиолого-биохимические процессы. Следовательно, установленные нами морфометрические и физиолого-биохимические различия между линиями были связаны со встраиванием и экспрессией гена *suc2* инвертазы дрожжей в *B33-inv*-растениях.

Заключение

Принципиально новые возможности для решения фундаментальных задач предоставляют генно-инженерные подходы, в частности, использование в работе трансформированных растений, экспрессирующих гены гетерологичных организмов, кодирующие функциональные гомологи растительных белков с известными функциями. Результаты исследования, проведенного с трансформантами картофеля, экспрессирующими ген *suc2* инвертазы дрожжей (апопластный вариант локализации фермента), расширили наши представления о роли апопластной инвертазы и продуктов ее деятельности в процессах роста и развития растений. Установлено, что изменения в активности только одного фермента углеводного метаболизма – апопластной инвертазы – привели к существенной перестройке всего метаболизма растений. Трансформация картофеля геном *suc2* инвертазы дрожжей модифицировало их углеводный метаболизм, что выразилось в увеличении активности кислой инвертазы и повышении содержания сахаров в корнях, листьях и межклеточном пространстве (апопласте). Исследования показали, что в условиях *in vitro* растения картофеля не только поглощали сахарозу из питательной среды, но также интенсивно её гидролизovali с помощью апопластной инвертазы. При этом трансформанты (*B33-inv*-растения), по сравнению с WT-растениями, более активно расходовали экзогенную сахарозу. На примере *B33-inv*-растений показан ростингибирующий эффект повышенной концентрации внутриклеточных сахаров, проявившийся в снижении у трансформантов величин морфофизиологических показателей, как линейных, так и весовых.

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории сигнальных систем контроля онтогенеза им. акад. М.Х. Чайлахяна ИФР РАН и группе доктора Л. Вилльмитцера (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Германия) за предоставленные для исследований растения картофеля.

Литература

1. Трофимец Л.Н., Остапенко Д.П., Бойко В.В., Зейрук С.В., Донец Н.В. Оздоровление и ускоренное размножение семенного картофеля (Методические рекомендации). М. : ВАСХНИЛ, 1985. 35 с.
2. Tovar P., Estrada R., Schilde-Rentschler L., Dodds J.H. Induction and use of *in vitro* potato tuber // CIP Circular. 1985. Vol. 13, № 4. P. 1–5.
3. Yu W.-C., Joyce P.J., Cameron D.C., McCown B.H. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors // Plant Cell Rep. 2000. Vol. 19. P. 407–413.
4. Головацкая И.Ф., Дорофеев В.Ю., Медведева Ю.В., Никифоров П.Е., Карначук Р.А. Оптимизация условий освещения при культивировании микроклонов *Solanum tuberosum* L. сорта Луговской // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2013. № 4 (24). С. 133–144.
5. Smeekens S., Ma J., Hanson J., Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth // Current Opinion in Plant Biology. 2010. Vol. 3. P. 273–278.

6. Fotopoulos V. Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family // J. Biol. Res. 2005. Vol. 4. P. 127–137.
7. Vargas W.A., Salerno G.L. The Cinderella story of sucrose hydrolysis: alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles // Plant Science. 2010. Vol. 178, № 1. P. 1–8.
8. Gupta A.K., Kaur N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants // J. BioSci. 2005. Vol. 30. P. 761–776.
9. Von Schaewen A., Stitt M., Schmidt R., Sonnewald U., Willmitzer L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants // EMBO J. 1990. Vol. 9. P. 3033–3044.
10. Аксенова Н.П., Константинова Т.Н., Голяновская С.А., Коссмани Й., Вильмитцер Л., Романов Г.А. Генетические трансформанты картофеля как модель для изучения гормональной и углеводной регуляции клубнеобразования // Физиология растений. 2000. Т. 47. С. 420–430.
11. Frommer W., Sonnewald U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species // J. Exp. Bot. 1995. Vol. 46. P. 587–607.
12. Sonnewald U., Hajlrezaei M.-R., Kossmann J., Heyer A., Thethewey R.N., Willmitzer L. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase // Nature Biotech. 1997. Vol. 15. P. 794–797.
13. Дерябин А.Н., Синькевич М.С., Климов С.В., Астахова Н.В., Трунова Т.И. Особенности CO₂-газообмена и структурной организации хлоропластов растений картофеля, трансформированных геном дрожжевой инвертазы, в условиях гипотермии // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 4. С. 511–516.
14. Дерябин А.Н., Трунова Т.И., Дубинина И.М., Буракханова Е.А., Сабельникова Е.П., Крылова Е.М., Романов Г.А. Устойчивость к гипотермии растений картофеля, трансформированных геном дрожжевой инвертазы, находящихся под контролем промотора пататина B33 // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 4. С. 505–510.
15. Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Astakhova N.V., Sabel'nikova E.P., Sinkevich M.S., Trunova T.I. Tolerance to low temperature of potato plants transformed with yeast invertase gene // Acta Agrobotanica. 2004. Vol. 57, № 1–2. P. 31–39.
16. Deryabin A.N., Dubinina I.M., Burakhanova E.A., Astakhova N.V., Sabel'nikova E.P., Trunova T.I. Influence expressing yeast-derived invertase gene in potato plants on membranes lipid peroxidation at low temperature // J. Therm. Biol. 2005. Vol. 30, № 1. P. 73–77.
17. Синькевич М.С., Нарайкина Н.В., Трунова Т.И. Участие сахаров в системе антиоксидантной защиты от индуцированного паракватом окислительного стресса у картофеля, трансформированного геном инвертазы дрожжей // Доклады АН. 2010. Т. 34, № 4. С. 501–506.
18. Mignery G.A., Pikaard C.S., Park W.D. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato // Gene. 1988. Vol. 62. P. 27–41.
19. Наумкина Е.М., Болякина Ю.П., Романов Г.А. Органоспецифичность и индуцибельность функционирования промотора пататина класса I картофеля в трансгенном арабидопсисе // Физиология растений. 2007. Т. 54, № 3. С. 397–408.
20. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures // Physiol. Plant. 1962. Vol. 15, № 3. P. 473–497.
21. Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer W., Stratmann M., Schell J., Willmitzer L. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class 1 patatin gene // EMBO J. 1989. Vol. 8. P. 23–29.
22. Дерябин А.Н., Бердичевец И.Н., Буракханова Е.А., Трунова Т.И. Характеристика внеклеточной инвертазы *Saccharomycetes cerevisiae* в условиях гетерологичной экспрессии гена *suc2* в растениях *Solanum tuberosum* // Известия РАН. Серия биологическая. 2014. № 1. С. 22–29.

23. Wyn Jones R.G., Gorham J. Osmoregulation. In: Encyclopaedia of plant physiology. N.S. Physiological plant ecology. Vol. 12C / eds. O.L. Lange, P.S. Nobel, C.B. Osmond, H. Zeigler. Springer Verlag, Heidelberg. 1983. P. 35–58.
24. Hon W.-Ch., Griffith M., Chong P., Yang D.S.C. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves // Plant Physiol. 1994. Vol. 104. P. 971–980.
25. Бробст К.М. Газожидкостная хроматография триметилсилильных производных сахаров // Методы исследования углеводов. Под. ред. Ф.Я. Хорлина. М. : Мир, 1975. С. 9–13.
26. Туркина Н.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений. М. : Наука, 1971. С. 7–34.
27. Nguyen Q.Th., Kozai T. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation // Environ. Control in Biol. 1998. Vol. 36 (2). P. 59–75.
28. Соколова С.В., Бурмистрова Н.А., Дубинина И.М., Бураханова Е.А., Кузовкина И.Н., Красавина М.С. Внутриклеточная сахароза и активность некоторых ферментов её метаболизации // Доклады АН. 1999. Т. 368, № 1. С. 139–141.
29. Гамалей Ю.В. Транспортная система сосудистых растений. Происхождение, структура, функции, развитие, анализ разнообразия типов по таксономическим и эколого-географическим группам растений, эволюция и экологическая специализация транспортной системы. СПб. : Изд-во СПбГУ, 2004. 424 с.
30. Andjelković U., Pićurić S., Vujčić Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms // Food Chem. 2010. Vol. 120. P. 799–804.
31. Rook F., Bevan M.W. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways // J. Exp. Bot. 2003. Vol. 54. P. 495–501.
32. Ryan C.A., Farmer E.E. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment // Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 1991. Vol. 42. P. 651–674.

Поступила в редакцию 15.09.2014 г.; повторно 17.10.2014 г.;
принята 27.10.2014 г.

Сведения об авторах:

Дерябин Александр Николаевич – канд. биол. наук, с.н.с. лаборатории зимостойкости Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва, Россия).

E-mail: anderyabin@mail.ru

Трунова Тамара Ильинична – д-р биол. наук, профессор, зам. директора Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН (г. Москва, Россия).

E-mail: trunova@ippras.ru

Tomsk State University Journal of Biology. 2014. № 4 (28). P. 150–168

Alexander N. Deryabin, Tamara I. Trunova

Laboratory of Cold Resistance, Timiryazev Institute of Plant Physiology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

E-mail: anderyabin@mail.ru, trunova@ippras.ru

Morphological and biochemical characteristics of potato plants expressing the invertase gene *SUC2* from *Saccharomyces cerevisiae*, under cultivation *in vitro*

According to the main heterotrophy of the plants grown *in vitro*, disaccharide of sucrose as a carbohydrate source is used the most often. However, in the plant cells

sucrose can't be utilized for metabolism. Before using it must be split into hexoses by, for example, the key enzyme of carbohydrate metabolism-invertase. Assuming the direct contact of the root system with the nutrition medium, the apoplast invertase catalyzing hydrolysis of sucrose in the unoccupied cellular space (apoplast) is of a special interest. In this study, we assessed the influence of the constitutive expression of target-oriented gene of *suc2*, encoding extracellular invertase of the *Saccharomyces cerevisiae* yeasts (apoplastic version of enzyme localization) on morphological, physiological and biochemical traits of transformed potato grown *in vitro* in non-hormone nutritive medium of Murashige-Skooge (MS-medium). The comparison of various sugars (glucose, fructose and sucrose) showed that 2% sucrose in the medium is the best carbohydrate source for potato growth.

We found out that during growth and development of the plants in MS-medium containing 2% sucrose the osmotic potential decreased, which indicated active assimilation of mineral and organic compounds. Meanwhile, the transformants compared to the control (non-transformed) plants utilized osmotically active compounds (mainly, sucrose) more intensively. Sugar chromatographic assay in the leaves of both plants revealed dominant content of sucrose and glucose whereas fructose content was minor.

The increased activity of the apoplastic invertase in transformants compared to that in the control plants promoted more active accumulation of metabolically active sugars: fructose in the apoplast, glucose and sucrose in the leaves; and especially, glucose in the roots. The inhibition of the growth by an increased glucose concentration in the transformants tissues was recorded. Morphological and metric analysis showed that the transformants had some decreased growth parameters (shoot length, the number of internodes, fresh biomass of the roots and leaves) and more watered tissues compared to those of the control plants. Morphological and biochemical difference between the plant lines is under discussion from the point of physiological role of the sugars and apoplastic invertase in plant life.

Acknowledgments: The authors express their gratitude to the staff of M.Kh. Chailakhyan Laboratory of signal systems of ontogeny control IPP RAS and the group of Dr. Willmitzer (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, Potsdam-Golm, Germany) for providing potato plants for research.

The article contains 5 Fig., 3 Tables, 32 Ref.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*; *Solanum tuberosum* L.; apoplastic fluid; gene *suc2*; invertase; culture *in vitro*; osmotic potential; sugars.

References

1. Trofimets LN, Ostapenko DP, Boyko VV, Zeyruk SV, Donets NV. Ozdorovlenie i uskorennoe razmnozhenie semennogo kartofelya (Metodicheskie rekomendatsii) [Improvement and rapid multiplication of seed potatoes (Methodical recommendations)]. Moscow: VASKhNIL Publ.; 1985. 35 p. In Russian
2. Tovar P, Estrada R, Schilde-Rentschler L, Dodds JH. Induction and use of *in vitro* potato tuber. *CIP Circular*. 1985;13(4):1-5.
3. Yu W-C, Joyce PJ, Cameron DC, McCown BH. Sucrose utilization during potato microtuber growth in bioreactors. *Plant Cell Reports*. 2000;19:407-413. doi: 10.1007/s002990050748
4. Golovatskaya IF, Dorofeev VYu, Medvedeva YuV, Nikiforov PE, Karnachuk RA. Optimization of illumination conditions in cultivation process of *Solanum tuberosum* L. cv. Lugovskoy microcuttings *in vitro*. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya - Tomsk State University Journal of Biology*. 2013;4(24):133-144. In Russian, English summary

5. Smeeckens S, Ma J, Hanson J, Rolland F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology*. 2010;3:273-278. doi: [10.1016/j.pbi.2009.12.002](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.12.002)
6. Fotopoulos V. Plant invertases: structure, function and regulation of a diverse enzyme family. *J. Biol. Res.* 2005;4:127-137.
7. Vargas WA, Salerno GL. The Cinderella story of sucrose hydrolysis: alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. *Plant Science*. 2010;178(1):1-8. doi: [10.1016/j.plantsci.2009.09.015](https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.09.015)
8. Gupta AK, Kaur N. Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Journal of biosciences*. 2005;30:761-776. doi: [10.1007/BF02703574](https://doi.org/10.1007/BF02703574)
9. Von Schaewen A, Stitt M, Schmidt R, Sonnewald U, Willmitzer L. Expression of a yeast-derived invertase in the cell wall of tobacco and Arabidopsis plants leads to accumulation of carbohydrate and inhibition of photosynthesis and strongly influences growth and phenotype of transgenic tobacco plants. *EMBO J.* 1990;9(10):3033-3044.
10. Aksenova NP, Konstantinova TN, Golyanovskaya SA, Romanov GA, Kossmann J, Willmitzer L. Transformed potato plants as a model for studying the hormonal and carbohydrate regulation of tuberization. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2000;47(3):370-379.
11. Frommer W, Sonnewald U. Molecular analysis of carbon partitioning in solanaceous species. *J. Exp. Bot.* 1995;46:587-607. doi: [10.1093/jxb/46.6.587](https://doi.org/10.1093/jxb/46.6.587)
12. Sonnewald U, Hajlrezaei M-R, Kossmann J, Heyer A, Thethewey RN, Willmitzer L. Increased potato tuber size resulting from apoplastic expression of a yeast invertase. *Nature Biotechnology*. 1997;15(8):794-797. doi: [http://10.1038/nbt0897-794](http://dx.doi.org/10.1038/nbt0897-794)
13. Deryabin AN, Sin'kevich MS, Klimov SV, Astakhova NV, Trunova TI. CO₂ exchange and structural organization of chloroplasts under hypothermia in potato plants transformed with a gene for yeast invertase. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007;54(4):450-455. doi: [10.1134/S1021443707040036](https://doi.org/10.1134/S1021443707040036)
14. Deryabin AN, Trunova TI, Dubinina IM, Burakhanova EA, Sabel'nikova EP, Krylova EM, Romanov GA. Chilling tolerance of potato plants transformed with a yeast-derived invertase gene under the control of the B33 patatin promoter. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2003;50(4):449-454. doi: [10.1023/A:1024756320245](https://doi.org/10.1023/A:1024756320245)
15. Deryabin AN, Dubinina IM, Burakhanova EA, Astakhova NV, Sabel'nikova EP, Sinkevich MS, Trunova TI. Tolerance to low temperature of potato plants transformed with yeast invertase gene. *Acta Agrobotanica*. 2004;57(1-2):31-39. doi: <http://dx.doi.org/10.5586/aa.2004.003>
16. Deryabin AN, Dubinina IM, Burakhanova EA, Astakhova NV, Sabel'nikova EP, Trunova TI. Influence of yeast-derived invertase gene expression in potato plants on membrane lipid peroxidation at low temperature. *Journal of Thermal Biology*. 2005;30(1):73-77. doi: [10.1016/j.jtherbio.2004.07.002](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2004.07.002)
17. Sinkevich MS, Naraykina NV, Trunova TI. Involvement of sugars in the antioxidant defense against paraquat-induced oxidative stress in potato transformed with yeast invertase gene. *Doklady Biological Sciences*. 2010;434(1):338-340. doi: [10.1134/S0012496610050133](https://doi.org/10.1134/S0012496610050133)
18. Mignery GA, Pikaard CS, Park WD. Molecular characterization of the patatin multigene family of potato. *Gene*. 1988;62:27-41. doi: [10.1016/0378-1119\(88\)90577-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90577-X)
19. Naumkina EM, Bolyakina YP, Romanov GA. Organ-specificity and inducibility of patatin class I promoter from potato in transgenic arabidopsis plants. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2007;54(3):350-359. doi: [10.1134/S1021443707030090](https://doi.org/10.1134/S1021443707030090)
20. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*. 1962;15(3):473-497. doi: [10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x)
21. Rocha-Sosa M, Sonnewald U, Frommer W, Stratmann M, Schell J, Willmitzer L. Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* 1989;8(1):23-29.

22. Deryabin AN, Berdichevets IN, Burakhanova EA, Trunova TI. Characteristics of extracellular invertase of *Saccharomyces cerevisiae* in heterologous expression of the *suc2* gene in *Solanum tuberosum* plants. *Biology Bulletin*. 2014;41(1):24-30. doi: [10.1134/S1062359014010038](https://doi.org/10.1134/S1062359014010038)
23. Wyn Jones RG, Gorham J. Osmoregulation. In: *Physiological Plant Ecology III. Encyclopedia of Plant Physiology*. Vol.12 / C. Lange OL, Nobel PS, Osmond CB, Zeigler H, editors. Springer Verlag: Heidelberg; 1983. pp. 35-58. doi: [10.1007/978-3-642-68153-0_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-68153-0_3)
24. Hon W-Ch, Griffith M, Chong P, Yang DSC. Extraction and isolation of antifreeze proteins from winter rye (*Secale cereale* L.) leaves. *Plant Physiology*. 1994;104:971-980. doi: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.104.3.971>
25. Brobst KM. Gazozhidkostnaya khromatografiya trimetilsilil'nykh proizvodnykh sakharov. *Metody issledovaniya uglevodov* [Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl derivatives of sugars. *Methods of study of carbohydrate*]. Khorlina FYa, editor. Moscow: Mir Publ.; 1975. pp. 9-13. In Russian
26. Turkina NV, Sokolova SV. Metody opredeleniya monosakharidov i oligosakharidov. Biokhimicheskie metody v fiziologii rasteniy [Methods for the determination of monosaccharides and oligosaccharides. *Biochemical Methods in Plant Physiology*]. Moscow: Nauka Publ.; 1971. pp. 7-34. In Russian
27. Nguyen QTh, Kozai T. Environmental effects on the growth of plantlets in micropropagation. *Environ. Control Biol*. 1998;36(2):59-75.
28. Sokolova SV, Burmistrova NA, Dubinina IM, Burakhanova EA, Kuzovkina IN, Krasavina MS. Intracellular sucrose and activity of some enzymes of its metabolism. *Doklady Akademii Nauk*. 1999;368(1):139-141.
29. Gamaley YuV. Transportnaya sistema sosudistyykh rasteniy. Proiskhozhdenie, struktura, funktsii, razvitiye, analiz raznoobraziya tipov po taksonomicheskim i ekologo-geograficheskim gruppam rasteniy, evolyutsiya i ekologicheskaya spetsializatsiya transportnoy sistemy [The transport system of vascular plants. Origin, structure, functions, development, analysis of the variety of types of taxonomic and ecological-geographical groups of plants, and the evolution of ecological specialization of the transport system]. St. Petersburg: St. Petersburg State University Publ.; 2004. 424 p. In Russian
30. Andjelković U, Pićurić S, Vujčić Z. Purification and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* external invertase isoforms. *Food Chemistry*. 2010;120(3):799-804. doi: [10.1016/j.foodchem.2009.11.013](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.11.013)
31. Rook F, Bevan MW. Genetic approaches to understanding sugar-response pathways. *J. Exp. Bot*. 2003;54:495-501. doi: [10.1093/jxb/erg054](https://doi.org/10.1093/jxb/erg054)
32. Ryan CA, Farmer EE. Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 1991;42:651-674. doi: [10.1146/annurev.pp.42.060191.003251](https://doi.org/10.1146/annurev.pp.42.060191.003251)

Received 15 September 2014

Revised 17 October 2014

Accepted 27 October 2014

Deryabin AN, Trunova TI. Morphological and biochemical characteristics of potato plants expressing the invertase gene *SUC2* from *Saccharomyces cerevisiae*, under cultivation *in vitro*. *Vestnik Tomskogo gosudarstvennogo universiteta. Biologiya – Tomsk State University Journal of Biology*. 2014;4(28):150-168. doi: [10.17223/19988591/28/10](https://doi.org/10.17223/19988591/28/10) In Russian, English summary