



Inwertazy roślinne – funkcja fizjologiczna, regulacja aktywności oraz wykorzystanie w biotechnologii

Barbara Hawrylak¹, Barbara Wolska-Mitaszko²

¹Wydział Ogrodniczy, Akademia Rolnicza, Lublin

²Instytut Mikrobiologii i Biotechnologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin

Plant invertases – physiological function, regulation of activity and application in biotechnology

Summary

Disaccharide sucrose plays important role in plants in photoassimilate partitioning, and as a carbon and energy source, it regulates cell metabolism, plant growth and development. Utilization of sucrose in most metabolic pathways is preceding by enzymatic cleavage of sucrose to monosaccharides. This cleavage is catalyzed by invertase and sucrose synthase. Hydrolysis of sucrose to glucose and fructose provides substrates to primary metabolism reactions proceed in plant cell. Because sugars in plants are not only nutrients molecules, but also regulate expression of genes, invertase can control cell division and plant development. Several types of invertases can exist in plant cells, which differ in their biochemical properties and cell localization. The rapid accumulation of information about their physiological function and regulation in planta has revealed the biotechnological potential of these proteins. This review focuses on recent advances in the properties and role of the identified plant invertases in the light of application for plant metabolic engineering.

Key words:

invertase, sucrose metabolism, assimilates distribution, sugar sensing, biotechnological applications.

Adres do korespondencji

Barbara Hawrylak,
Katedra Fizjologii Roślin,
Akademia Rolnicza,
ul. Akademicka 15,
20-950 Lublin.

1. Wstęp

U roślin wyższych powstające w procesie fotosyntezy węglowodony transportowane są z organów donorowych (ang. *source*) do organów akceptorowych (ang. *sink*) najczęściej w formie sa-

charozy. Cukier ten nieprzypadkowo wyselekcjonowany został w procesie ewolucji jako główna forma transportu węglowodanów w roślinach. Jest stabilnym związkiem nieredukującym i nie naraża tkanek na różnego rodzaju reakcje oksydoredukcyjne w czasie przemieszczania w roślinie. Produkty hydrolizy sacharozy są głównym substratem oddechowym oraz uczestniczą w procesach osmoregulacji w komórkach roślinnych (1). Na podstawie badań prowadzonych w ostatnich latach dostarczono licznych dowodów na udział cukrów, zwłaszcza sacharozy i produktów jej rozpadu, w regulacji metabolizmu roślin (2,3). Dostarczając informacji o stopniu zaopatrzenia oraz zapotrzebowania komórek na produkty fotosyntezy, cukry pełnią funkcję substancji sygnałowych i wpływają na ekspresję wielu klas genów zaangażowanych w metabolizm węglowodanów oraz procesy rozwojowe roślin (4-6). Sacharoza może być wykorzystywana w metabolizmie komórkowym na drodze dwóch przemian. Nieodwracalna hydroliza sacharozy jest katalizowana przez inwertazę [EC 3.2.1.26] (sacharoza + H₂O → glukoza + fruktoza). Natomiast syntaza sacharozy [EC 2.4.1.13], biorąca także udział w syntezie tego dwucukru, przeprowadza odwracalną reakcję z udziałem UDP (sacharoza + UDP ↔ UDP-glukoza + fruktoza). W roślinach inwertaza jest podstawowym enzymem biorącym udział w mobilizacji i degradacji sacharozy podczas całego cyklu życiowego, jak również w odpowiedzi roślin na czynniki środowiskowe, ponieważ zarówno substraty jak i produkty katalizowanej przez ten enzym reakcji są jednocześnie cząsteczkami sygnałowymi (7,8).

2. Klasyfikacja i charakterystyka inwertaz

Inwertazy stanowią rodzinę enzymów, których występowanie stwierdzono u wielu gatunków roślin wyższych, a liczne oczyszczono i scharakteryzowano na poziomie molekularnym. Na podstawie optimum pH inwertazy można podzielić na kwaśne oraz neutralne lub alkaliczne. Natomiast biorąc pod uwagę lokalizację komórkową, punkt izoelektryczny, optimum pH oraz rozpuszczalność powszechnie wyróżnia się trzy typy inwertaz: 1) inwertazy wakuolarnie (Inv-V) – kwaśne, rozpuszczalne inwertazy występujące w wakuoli; 2) inwertazy związane ze ścianą komórkową (Inv-CW) – kwaśne, nierozpuszczalne inwertazy związane jonowo ze ścianą komórkową; 3) inwertazy neutralne (Inv-N) – neutralne/alkaliczne, rozpuszczalne inwertazy występujące w cytoplazmie (8,9). W tabeli zebrano informacje na temat podstawowych właściwości inwertaz.

Każdy z trzech typów inwertaz reprezentowany jest przez różne izoenzymy. Poszczególne izoformy różnią się niektórymi właściwościami biochemicznymi, np. wrażliwością na inhibitory. W komórkach roślinnych występują przynajmniej 2 izoformy Inv-V oraz 6 izoform Inv-CW (8). Znane są również 2 izoformy Inv-N, która jest do tychczas najslabiej scharakteryzowanym typem inwertazy (10,11). Fizjologiczna korzyść z występowania izoenzymów polega na większej elastyczności i efektywności kontroli transportu, dystrybucji oraz magazynowania sacharozy w odpowiedzi na

czynniki środowiskowe oraz na etapie różnych stadiów rozwojowych tkanek i organów roślinnych (12).

Tabela

Właściwości różnych typów inwertaz roślinnych

Typ inwertazy	Optimum pH	pI	Lokalizacja	Rozpuszczalność	Glikozylacja
inwertaza wakuolarna Inv-V	kwaśne pH 5,0-5,5	obojętny	wakuola	nierozpuszczalna	+
inwertaza ściany komórkowej Inv-CW	kwaśne pH 3,5-5,0	zasadowy/kwaśny	apoplast	rozpuszczalna	+
inwertaza neutralna Inv-N	obojętne lub zasadowe pH 6,8-8,0	obojętny	cytoplazma	rozpuszczalna	—

Poszczególne izoformy są prawdopodobnie kodowane przez różne geny (9,10). Geny kodujące inwertazy kwaśne (Inv-V oraz Inv-CW) wyizolowano już z kilku gatunków roślin: pomidora, rzodkiewnika, kukurydzy, marchwi (10), życicy (13) i ziemniaka (14). Na podstawie mapowania genów inwertaz kwaśnych pochodzących z rzodkiewnika, pomidora i kukurydzy wykazano, że w każdej z tych roślin są one zlokalizowane na różnych chromosomach. Jednak pomiędzy gatunkami roślin jedno- i dwuliściennych stwierdza się znaczny stopień konserwatywności, jeżeli chodzi o ich strukturę. Wyizolowane do tej pory geny inwertaz kwaśnych zawierają od sześciu do ośmiu eksonów. Z reguły we wszystkich tych genach występuje ekstremalnie mały ekson (ekson II), składający się tylko z 9 nukleotydów. Jest to jeden z najmniejszych eksonów występujących u roślin wyższych. Koduje on tripeptyd (DPN), tworzący rdzeniową część konserwatywnego motywu β -fruktofuranozydazy (NDPNG) (8-10).

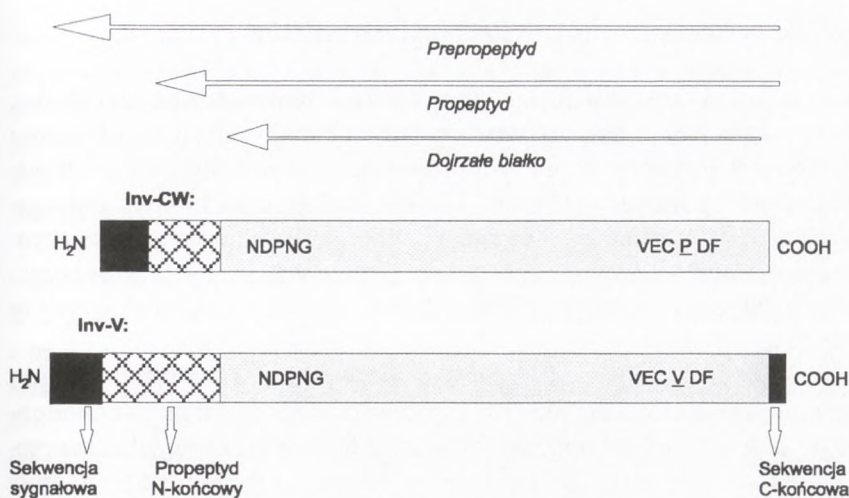
U rzodkiewnika zidentyfikowano dotychczas 6 genów kodujących Inv-CW (geny *AtcwINV*), z których pięć ulega ekspresji w rozwijających się nasionach, przy czym ekspresja czterech z nich jest najbardziej intensywna w fazie różnicowania komórek (15). W roślinach ziemniaka zidentyfikowano 2 geny kodujące Inv-CW (*invCD111* i *invCD141*), które ulegały specyficznej ekspresji w tkankach floemu (14). Ekspresja genów kodujących Inv-V w roślinach życicy (*Inv 1:2* i *Inv 1:4*) jest również specyficzna tkankowo: ekspresja *Inv 1:2* zachodzi głównie w korzeniach, natomiast *Inv 1:4* przeważnie w liściach (13). Dlatego też sugeruje się, że rośliny podczas ewolucji wykształciły niewielką rodzinę genów inwertaz kwaśnych, których ekspresja zachodzi niezależnie, w specyficznym miejscu i czasie podczas rozwoju rośliny (10).

Przypuszcza się, że sekwencje genowe kodujące poszczególne izoformy inwertaz kwaśnych powstały w wyniku odległej w czasie, przypadkowej duplikacji genu. W ostatnich badaniach dotyczących filogenetycznych relacji pomiędzy genami kodującymi Inv-CW oraz Inv-V wykazano, że Inv-V prawdopodobnie ewoluowała z Inv-CW w wyniku mutacji, która wywołała zmianę sekwencji sygnałowej i zadecy-

dowała o skierowaniu białka do wakuoli (16). Uzyskane w nielicznych przypadkach sekwencje cDNA kodującego Inv-N nie wykazują podobieństwa do sekwencji inwertaz kwaśnych, są natomiast w znacznym stopniu homologiczne z genami inwertaz bakterii fotosyntetyzujących (17). W komórkach cyjanobakterii zidentyfikowano dwa geny (*invA* i *invB*), które wykazywały 50-56% homologię z roślinnym genem kodującym białko Inv-N o masie cząsteczkowej 53-55 kDa. Ponieważ Inv-N występuje tylko w komórkach roślin i cyjanobakterii, przypuszcza się, że geny roślinnej Inv-N wywodzą się z ortologicznego genu organizmu prokariotycznego, który wniknął do komórki roślinnej na drodze endosymbiozy (18).

Z uwagi na podobieństwo sekwencji genowych inwertaz kwaśnych kodowane przez nie białka charakteryzują się podobną budową oraz właściwościami biochemicznymi. Inv-CW oraz Inv-V syntetyzowane są jako prepropeptydy. Porównanie sekwencji aminokwasowych tych enzymów wykazało obecność N-końcowej domeny, zawierającej do 100 reszt aminokwasowych, która jest odcinana podczas transportu i dojrzewania białka (10,19). Przypuszczalnie jest ona podzielona na 2 segmenty: peptyd sygnałowy (niezbędny przy wprowadzaniu białka do retikulum endoplazmatycznego i szlaku wydzielniczego) oraz N-końcowy propeptyd (rys. 1). W przeciwieństwie do Inv-CW, prepropeptyd Inv-V zawiera dodatkowo krótką domenę aminokwasową dołączoną do końca C, która może brać udział w kierowaniu białka do wakuoli (9,10). Wspólną cechą dojrzałych białek inwertaz kwaśnych jest obecność pentapeptydu NDPNG tworzącego konserwatywny motyw β -fruktofuranozydazy, który występuje także w inwertazach bakteryjnych i drożdżowych (8). Mimo że sekwencja aminokwasowa Inv-CW i Inv-V jest homologiczna w ok. 40-60%, enzymy te różnią się nieznacznie optimum pH oraz specyficznością substratową. W badaniach nad właściwościami Inv-V i Inv-CW (20), pochodzącymi z tych samych gatunków roślin, wykazano, że chociaż oba typy enzymu posiadają kwaśne optimum pH, to dla Inv-V jest ono z reguły około 0,6-0,9 jednostki wyższe w porównaniu z Inv-CW. Ponadto specyficzność Inv-V w stosunku do rafinozy jest 16-30% niższa niż Inv-CW. Różnice te wywołwane są pojedynczą substytucją w sekwencji aminokwasowej obu enzymów. W konserwatywnej sekwencji (WEC-P/V-DF) Inv-V obecna jest walina, natomiast w tym samym miejscu w Inv-CW stwierdzono występowanie proliny (20).

Inwertazy kwaśne, w przeciwieństwie do Inv-N, ulegają procesowi N-glikozylacji (9). Glikozylacja Inv-CW jest niezbędna do efektywnego transportu przez błonę plazmatyczną, niezależnie od struktury dołączonego do N-końca oligosacharadu. Stwierdzono, że pozbawiona reszty cukrowej Inv-CW ulega szybkiej degradacji w aparacie Golgiego. Natomiast w przypadku Inv-V, ta potranslacyjna modyfikacja, prawdopodobnie nie pełni specyficznej roli podczas kierowania białka do wakuoli (21). Masa cząsteczkowa kwaśnych inwertaz waha się w dość szerokim zakresie (od 50 kDa do 450 kDa), gdyż w natywnej formie mogą one występować w postaci monomerów, dimerów lub oligomerów (12). Ponadto aktywność tych enzymów hamują czynniki blokujące grupy sulfhydrylowe, co przypuszczalnie związane jest z obecnością reszty cysteiny w ich centrum aktywnym (8).



Rys. 1. Schemat struktury pierwszorzędowej inwertaz kwaśnych (wg 9, 10, zmodyfikowane).

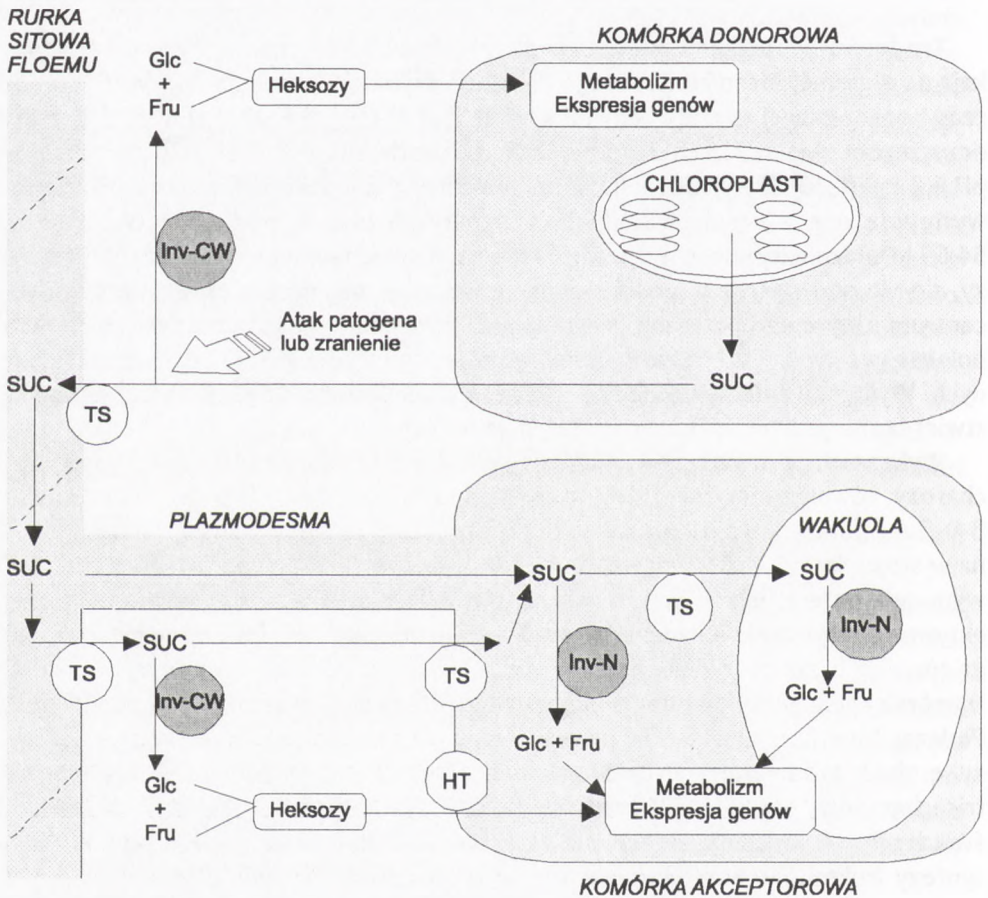
Trudności napotymane podczas badań właściwości biochemicznych Inv-N wynikają ze znacznej niestabilności tego enzymu i szybkiej utraty jego aktywności podczas homogenizacji tkanek. Jedynie w nielicznych przypadkach udało się otrzymać oczyszczone białka enzymatyczne, których optimum pH waha się w zakresie pH 6,8-8,0 (8,10). Z wyjątkiem Inv-N pochodzącej z marchwi (22), w natywnej formie występują one z reguły jako homotetramery złożone z podjednostek o masie 54-65 kDa. Ich aktywność jest gwałtownie hamowana w obecności glukozy i fruktozy, ale nie pod wpływem jonów metali, co wskazuje na znaczne różnice w budowie centrum aktywnego neutralnych i kwaśnych inwertaz (10). Ponadto sekwencja aminokwasowa Inv-N jest bogata w cysteinę i zdecydowanie różni się od inwertaz kwaśnych. Występowanie homologicznej struktury pierwszorzędowej do roślinnej Inv-N stwierdzono jedynie u bakterii fotosyntetyzujących (17,23).

Wykazano, że inwertazy o kwaśnym optimum pH mogą hydrolizować, oprócz sacharozy, również inne dwucukry, które posiadają końcową, niepodstawioną resztę β -D-fruktofurazynową jak np. rafinoza czy stachioza. Jednak aktywność enzymatyczna w stosunku do tych węglowodanów jest znacznie niższa w porównaniu z właściwym substratem, jakim jest sacharoza. Natomiast Inv-N jest najprawdopodobniej aktywna specyficznie jedynie w stosunku do sacharozy (19). Inwertazy kwaśne mogą również uczestniczyć w syntezie fruktanów, które przechowywane są w wakuoli komórek wielu gatunków traw i innych roślin, stanowiąc zapas węglowodanów (13). Podczas biosyntezy fruktanów pierwszy etap obejmuje m. in. powstawanie 1-ketozy, a niektóre inwertazy wykazują aktywność glukotransferazy i katalizują syntezę trisacharydów, najczęściej 1-ketozowych (24). Na podstawie pewnych danych doświadczalnych wskazuje się jednak, że aktywność Inv-V u traw spada podczas biosyntezy fruktanów, natomiast wzrasta w procesie ich rozkładu (13).

3. Rola inwertaz w transporcie i dystrybucji asymilatów

W roślinach sacharoza jest dominującą formą wśród transportowanych cukrów, a inwertaza jest rozpatrywana jako podstawowy enzym biorący udział we włączaniu związków węglowych do metabolizmu podstawowego oraz uczestniczący w translokacji węglowodanów pomiędzy organami (12,25). Istnieje kilka hipotez dotyczących dystrybucji asymilatów pomiędzy organami, które uwzględniają zarówno czynniki determinujące zapotrzebowanie organów akceptorowych, jak i wydajność organów donorowych. Inwertazy stanowią również jeden z czynników kontrolujących te zależności (26,27).

Zasadniczą rolę w procesie rozładunku sacharozy z rurek sitowych floemu do niektórych, ale nie wszystkich, organów akceptorowych odgrywa najprawdopodobniej Inv-CW (rys. 1). Jej aktywność podczas rozładunku floemu ma szczególne znaczenie w tkankach, których komórki łączą jedynie w znikomym stopniu za pośrednic-



twem plazmodesm, a sacharoza z rurek sitowych do komórek akceptorowych musi przemieszczać się apoplastycznie (przez ścianę komórkową). Ma to miejsce np. podczas kiełkowania nasion czy rozwoju pyłku. Jednak w tkankach z dużą ilością połączeń plazmodesmalnych część sacharozy przedostaje się także poprzez obszar ściany komórkowej i obecność Inv-CW może decydować o efektywności rozładowania floemu (15,28).

Wykazano, że Inv-CW bierze udział w dystrybucji sacharozy pomiędzy donorami i akceptorami, np. podczas rozwoju roślin kukurydzy (29). Zmiany ekspresji Inv-CW u tego gatunku prowadzą do zakłóceń w procesie translokacji fotoasymilatów, a mutanty niesyntetyzujące tego enzymu charakteryzują się redukcją biomasy i wielkości dojrzałych nasion. W młodych organach akceptorowych Inv-CW może zwiększać import węglowodanów, utrzymując gradient stężenia sacharozy pomiędzy floemem a akceptorem. Natomiast w organach dojrzałych inwertazy mogą ograniczać intensywność eksportu sacharozy, hydrolizując ją do heksoz, co obniża ładunek sacharozy do floemu i prowadzi do regulacji zwrotnej fotosyntezy (11).

4. Funkcja inwertaz w procesach wzrostu i rozwoju roślin

Wzrost i rozwój roślin regulowany jest przez szereg różnorodnych czynników i wymaga dostarczenia składników odżywczych z organów fotosyntetyzujących. Zaobserwowano ścisłą zależność pomiędzy szybkością wzrostu a aktywnością enzymów metabolizmu sacharozy – inwertazą i syntazą sacharozy. Wykazano, że aktywność trzech głównych typów inwertaz jest uzależniona od rodzaju tkanki, organu i stadium rozwojowego rośliny. Ze względu na różnorodne funkcje, jakie pełni

Rys. 2. Synteza, transport i metabolizm sacharozy w komórkach donorowych i akceptorowych z uwzględnieniem lokalizacji komórkowej różnych typów inwertaz (wg 8, 48, zmodyfikowane). Syntetyzowana w komórkach donorowych liści sacharoza (SUC) kanałem apoplastycznym transportowana jest do rurek sitowych floemu. Załadunek floemu przebiega aktywnie przy udziale transporterów sacharozy (TS). Pod wpływem infekcji lub zranienia następuje aktywacja zewnątrzkomórkowej inwertazy związanej ze ścianą komórkową (Inv-CW), a rozkład sacharozy do glukozy (Glc) i fruktozy (Fru) zakłóca proces ładowania floemu. Hydroliza transportowanej przez floem sacharozy może być katalizowana przez 3 typy inwertaz. W tkankach, których komórki nie łączą się za pomocą plazmodesm sacharoza dostaje się z rurek sitowych łyka do apoplastu prawdopodobnie przy udziale transporterów sacharozy. Następnie sacharoza może być hydrolizowana przez Inv-CW, a powstające glukoza i fruktoza są transportowane do komórek akceptorowych przez transportery heksoz (HT). Alternatywny transport sacharozy może odbywać się bezpośrednio przy udziale transporterów sacharozy. W cytoplazmie komórek akceptorowych sacharoza hydrolizowana jest przez inwertazę neutralną (Inv-N), albo syntazę sacharozy, natomiast w wakuoli przez inwertazę wakuolarną (Inv-V). Wytworzone w wyniku aktywności enzymów rozkładających sacharozę heksozy są nie tylko substratami metabolicznymi, ale regulują również ekspresję genów.



w roślinach sacharoza, rola inwertaz jako enzymów katalizujących rozkład tego dwucukru może być rozpatrywana wielopłaszczyznowo (10). Aktywność Inv-CW jest najwyższa w miejscu transportu cukrów oraz strefie elongacji korzenia i pędu, natomiast aktywność Inv-V – w tkankach z małą lub brakiem aktywności Inv-CW. Inv-N wykrywana jest najczęściej w organach dojrzałych, które wykazują małą lub brak aktywności inwertaz kwaśnych (9). Cheng i wsp. (30) przypuszczają, że jest bardzo prawdopodobne, iż każda tkanka roślinna posiada unikatowe sekwencje genów kodujące różne izoformy inwertaz.

Tkanki, które przechodzą szybki rozwój charakteryzują się wysokim stężeniem heksoz i niską zawartością sacharozy. Ścisła zależność pomiędzy poziomem aktywności Inv-V a intensywnym wzrostem komórek sugeruje, że enzym ten może odgrywać istotną rolę w procesach wzrostu i rozwoju organów roślinnych. Inv-V odpowiada prawdopodobnie za utrzymanie ciśnienia osmotycznego soku komórkowego podczas gwałtownego pobierania wody przez rosnące komórki oraz może dostarczać substratów do biosyntezy ściany komórkowej (28). Ponadto wzrost roślin regulowany jest również przez Inv-CW za pośrednictwem fitohormonów: auksyn i gibberelin. Jeden z możliwych mechanizmów pobudzania wzrostu roślin przy udziale wymienionych fitohormonów polega na ich stymulującym wpływie na proces syntezy Inv-CW. Uwolnione w wyniku jej aktywności zredukowane cukry mogą zostać wykorzystane do biosyntezy polisacharydów. Inv-CW odgrywa również rolę w procesie różnicowania komórek i rozwoju organów roślinnych (8,31).

Skład węglowodanowy dojrzewających owoców i organów spichrzowych prawdopodobnie kontroluje występująca w wakuoli Inv-V. Przykładem może być proces dojrzewania owoców winogron, podczas którego transportowana z liści sacharoza gromadzona jest w wakuolach komórek gron już jako glukoza i fruktoza. Akumulacja tych monosacharydów jest jednym z ważniejszych etapów dojrzewania gron (32). Katalizowana przez Inv-V hydroliza sacharozy do glukozy i fruktozy prawdopodobnie odgrywa rolę w tego rodzaju procesach również u innych gatunków roślin, gromadzących cukry w owocach i organach spichrzowych. Gatunki pomidorów akumulujące w owocach duże ilości monosacharydów (*Lycopersicon esculentum*) charakteryzuje wysoka aktywność Inv-V, a niska aktywność syntazy sacharozy. Natomiast w przypadku gatunków gromadzących znaczne ilości sacharozy (*L. peruvianum*, *L. chmielewskii*), aktywność Inv-V w wakuolach komórek owoców jest stosunkowo niska (33).

Za metabolizm sacharozy w komórkach zróżnicowanych, o niskim zapotrzebowaniu na cukry, odpowiedzialna jest Inv-N. Ten typ inwertazy katalizuje hydrolizę sacharozy w komórkach o niskiej aktywności inwertaz kwaśnych. Inv-N funkcjonuje prawdopodobnie jako główny enzym sacharolityczny, wprowadzający glukozę i fruktozę bezpośrednio do podstawowego metabolizmu komórkowego (19,34).

5. Udział inwertaz w odpowiedzi na stres

Wśród szeregu stresów abiotycznych wpływających na produktywność roślin, podstawową rolę odgrywa stres osmotyczny indukowany suszą, zasoleniem roztworu glebowego lub niską temperaturą. Chociaż fizyczna natura wymienionych stresorów jest zdecydowanie różna, jednak pod ich wpływem następuje w roślinach aktywacja pewnych wspólnych mechanizmów obronnych (35). Jedną z głównych reakcji obronnych jest gromadzenie cukrów rozpuszczalnych, które zmniejszają potencjał osmotyczny soku komórkowego (11) i funkcjonują m.in. jako osmoprotektanty, chroniąc rośliny przed uszkodzeniami wynikającymi z deficytu wody (36). W dojrziałych organach wegetatywnych pod wpływem stresu suszy wyraźnie wzrasta aktywność Inv-V, czemu towarzyszy znaczny wzrost koncentracji monosacharydów (36). Natomiast w organach generatywnych następuje spadek aktywności inwertaz kwaśnych, przy równoczesnym obniżeniu poziomu cukrów redukujących i skrobi oraz wzroście stężenia sacharozy, co hamuje rozwój zalążni i kiełkowanie pyłku, a w konsekwencji uniemożliwia zapłodnienie (37). Przykładowo w warunkach niskiego potencjału wody w zalążni kukurydzy obserwowano gwałtowny spadek ekspresji genów kodujących Inv-CW (*Incw1*, *Incw2*) oraz Inv-V (*Ivr1*, *Ivr2*) (38). Także w pylnikach pszenicy deficyt wody powodował spadek ekspresji genów dla Inv-CW (*Ivr1*) oraz Inv-V (*Ivr5*), jednak tylko wtedy gdy stres wodny miał miejsce na etapie mejozy (39). Wyniki te wskazują na organo- i tkankowospecyficzną regulację aktywności inwertaz w warunkach deficytu wodnego, przy czym w organach generatywnych regulacja ta zachodzi głównie na poziomie transkrypcji.

Pod wpływem niskiej temperatury stwierdza się wzmoczoną aktywność Inv-V i Inv-N, co prowadzi do akumulacji monosacharydów, zarówno u gatunków roślin wrażliwych, jak i odpornych na niską temperaturę (11,40). Uważa się, że monosacharydy funkcjonują nie tylko jako główne źródło metabolitów i energii, niezbędne do reorganizacji metabolizmu i kształtowania odporności komórek na chłód, ale również pełnią rolę krioprotektantów (40). Sacharoza i cukry proste wykazują zdolność do stabilizacji struktury białek i lipidów. Reagując z grupami polarnymi fosfolipidów oraz wzmacniając wiązania hydrofobowe z białkami, pomagają utrzymać natywną strukturę i funkcję błon komórkowych w warunkach hipotermii. Mogą one również wiązać wolne rodniki, zapobiegając procesom oksydacyjnej destrukcji błon komórkowych, takim jak peroksydacja lipidów, zachodzącym pod wpływem niskiej temperatury (41). W roślinach ziemniaka w warunkach niskiej temperatury miniekson jednego z genów kodujących inwertazy kwaśne jest podatny na alternatywny splicing tzn. następuje wycinanie tego eksonu z niektórych transkryptów, jednak fizjologiczne znaczenie tego procesu nie jest w pełni poznane (42). Ponadto wykazano, że ekspresja genów kodujących Inv-V (*Ivr1*, *Ivr2*) gwałtownie spada w warunkach niskiej zawartości tlenu (hipoksji) oraz w warunkach beztlenowych (anoksji). Zmiany te mogą stanowić potencjalny sygnał o endogennym poziomie tlenu w komórkach oraz mieć istotne znaczenie w procesie adaptacji roślin do hipoksji (43).

Ważną rolą przypisywaną Inv-CW jest jej udział w odpowiedzi roślin na atak patogenów. Wysoka aktywność tego enzymu w zainfekowanych organach może dostarczać związków węgla niezbędnych do wzmocnienia ściany komórkowej, syntezy metabolitów wtórnych, inhibitorów enzymów oraz enzymów hydrolitycznych produkowanych w odpowiedzi na infekcję organizmami patogennymi (31,34). Na podstawie szczegółowych badań nad dystrybucją Inv-CW w zaatakowanych przez grzyby tkankach sugeruje się, że wzrost jej aktywności stanowi część mechanizmu obronnego roślin. Poza tym na podstawie analizy zależności pomiędzy metabolizmem węglowodanów a indukcją ekspresji genów odporności wskazuje się, że wiele genów związanych z obroną przed atakiem patogena jest indukowanych przez rozpuszczalne cukry (44). Zgodnie z koncepcją proponowaną przez Jang i Sheen (45), aktywacja genów odporności może być zależna od szlaku transdukcji dostarczanego przez cukry sygnału, gdzie potencjalnym producentem czynników sygnalizacyjnych (glukoza i fruktoza) jest Inv-CW. Autorzy ci zasugerowali, że uszkodzenie mechaniczne (zranienie) oraz infekcje bakteryjne wywołują gwałtowny wzrost ekspresji odpowiadających jej genów. W konsekwencji następuje zwiększona hydroliza apoplastycznej sacharozy, a napływające monosacharydy wywołują represję ekspresji genów fotosyntezy (45,46).

Proces infekcji tkanki roślinnej przez różnorodne patogeny, głównie bakteryjne i grzybowe, wiąże się również ze wzrostem intensywności oddychania. Wzmocniona aktywność inwertaz może być związana z koniecznością szybszego wykorzystania zgromadzonych zapasów sacharozy. Aktywacja inwertaz typu Inv-CW zaspokaja zatem zwiększone zapotrzebowanie na cukry zainfekowanych tkanek, a wzrost poziomu monosachardów generuje sygnały metaboliczne indukujące ekspresję genów odporności, a jednocześnie hamujących proces fotosyntezy. Ponieważ Inv-CW jest istotnym elementem sieci sygnałowej uruchamianej w odpowiedzi na atak patogenów, stąd coraz częściej jest rozważana jako specyficzne białko PR związane z procesem patogenezą (8,31).

6. Mechanizmy regulujące aktywność inwertaz

Regulacja aktywności inwertaz związana jest zarówno ze specyficzną tkankowo ekspresją odpowiadających im genów, jak i regulacją poprzez różnorodne bodźce wewnątrz- i zewnątrzkomórkowe. Poszczególne izoenzymy charakteryzują się zróżnicowaną wrażliwością na identyczne bodźce, a wówczas ekspresja tych samych genów inwertaz może różnić się w znacznym stopniu w zależności od typu tkanki i jej stadium rozwojowego.

Wśród wielu czynników wewnątrzkomórkowych regulujących aktywność inwertaz ważną pozycję zajmują cukry, wytwarzane jako bezpośredni albo pośredni wynik aktywności tych enzymów (8). Na podstawie wyników dotychczasowych badań szlaków sygnalizacji cukrowej w roślinach wyższych jednoznacznie wskazuje się, że zmiany

poziomu cukrów wpływają stymulująco lub hamująco na ekspresję wielu klas genów. W organizmach roślinnych cukrowe szlaki sygnałowe utworzone przez białka i enzymy, analogiczne do białek zidentyfikowanych w drożdżach, tworzą z innymi szlakami transdukcji sygnałów złożoną sieć sygnałową regulującą większość procesów życiowych (28,47). W roślinach kukurydzy zidentyfikowano dwie klasy genów kodujących Inv-V różniących się wrażliwością na poziom cukrów. Ekspresja jednej z klas genów jest aktywowana przez węglowodany, podczas gdy wzrost stężenia cukrów wywołuje represję drugiej klasy genów należących do tej samej rodziny (29). Interesujące jest, że w roślinach gromadzących znaczne ilości węglowodanów, takich jak marchew, nie wykazano wpływu cukrów na ekspresję genów inweraz kwaśnych. Może to być związane z faktem, że regulacyjna rola cukrów w procesie ekspresji genów kodujących inwertazy u tego typu roślin nie byłaby korzystna, dlatego też rośliny albo nie wykształciły takiego mechanizmu regulacji, albo został on utracony w trakcie ewolucji (10).

Czynniki takie jak: infekcja patogenów, zranienie, temperatura, grawitropizm, światło również modulują ekspresję genów kodujących inwertazy (11,31). Ponadto ich ekspresja uzależniona jest od stężenia całej gamy hormonów roślinnych. Stwierdzono, że auksyny, gibereliny, cytokininy, brasinosteroidy oraz kwas absycynowy wpływają na wzrost ekspresji genów Inv-CW, natomiast etylen – jako jedyny fitohormon, wpływa na obniżenie poziomu mRNA Inv-CW i wywołuje spadek jej aktywności (31). Dokładne zbadanie tej zależności może ułatwić wyjaśnienie molekularnych mechanizmów fizjologicznej reakcji roślin na fitohormony.

Podczas gdy indukcja aktywności inwertaz najczęściej zachodzi w wyniku wzmoczonej transkrypcji, redukcja aktywności tych enzymów uzależniona jest głównie od mechanizmów posttranslacyjnych, w tym inaktywacji przez specyficzne inhibitory białkowe. Są to niskocząsteczkowe polipeptydy o masie cząsteczkowej od 15 do 23 kDa, charakteryzujące się dużą termostabilnością i kwasoodpornością (48). W szczegółowych badaniach struktury krystalicznej wyizolowanego z tytoniu białkowego inhibitora Inv-CW (Nt-CIF) ujawniono występowanie N-końcowej domeny, która prawdopodobnie jest istotna dla integralności strukturalnej Nt-CIF (49). Stwierdzono, że inhibitor hamujący aktywność Inv-CW wykazuje kolokalizację z białkiem Inv-CW w ścianie komórkowej, co sugeruje jego ważną rolę fizjologiczną w regulacji aktywności tego enzymu. Stopień inhibicji aktywności inwertazy przez inhibitory białkowe uzależniony jest od wartości pH oraz od stężenia sacharozy. Najwyższy poziom zahamowania aktywności enzymatycznej przez inhibitory białkowe wykazano w warunkach pH optymalnego dla kwaśnych inwertaz (ok. pH 4,5). Natomiast stosunkowo niskie stężenia sacharozy hamują tworzenie kompleksu enzym-inhibitor (34). Wydaje się, że sacharoza może chronić Inv-CW przed inhibicją, jednak zaskakujący jest fakt, że silne właściwości ochronne sacharozy obserwowano jedynie dla specyficznej kombinacji Inv-CW i Nt-CIF izolowanych z kultur zawiesinowych komórek tytoniu. Badania *in vitro* wskazują, że udział w tworzeniu kompleksu enzym-inhibitor biorą również kationy dwuwartościowe (Mg^{2+} , Zn^{2+}), a ich obecność potęguje spadek aktywności Inv-CW wywołany przez inhibitory białkowe (48).

Jeden ze sposobów posttranslacyjnej regulacji aktywności Inv-V wiąże się z kontrolą kompartmentacji i degradacji enzymu. Funkcjonowanie tego mechanizmu związane jest z obecnością specyficznych pęcherzyków powstałych z retikulum endoplazmatycznego (PPVs), które zawierają prekursor proteaz cysteinowych uczestniczących w degradacji składników komórkowych podczas starzenia się roślin oraz w procesie apoptozy (50). Inv-V może być dosyć długo przechowywana w tego typu charakterystycznych, wrzecionowatych pęcherzykach rozpiętych pomiędzy rybosomami a wakuolą, co znacznie opóźnia proces transportu enzymu do miejsca docelowego, którym jest wakuola. W pęcherzykach PPVs stwierdzono występowanie nieaktywnej formy proteazy VPEy, która uwolniona razem z Inv-V do kwaśnego środowiska wakuoli ulega autoaktywacji i powoduje degradację Inv-V. System kompartmentacji Inv-V w PPVs umożliwia kontrolę zarówno czasu jej aktywacji w wakuoli, jak i wrażliwości na późniejszy rozkład przez proteazę VPEy. Stwarza to dodatkową, poza regulacją na poziomie mRNA oraz białka, możliwość regulacji aktywności tego typu inwertazy (28,50).

7. Manipulacje aktywnością inwertaz w roślinach transgenicznych – aspekty poznawcze i praktyczne

7.1. Rośliny transgeniczne w badaniach nad funkcją fizjologiczną inwertaz

Aktualnie coraz więcej danych na temat roli fizjologicznej inwertaz uzyskuje się dzięki manipulacjom genami kodującymi inwertazy w roślinach transgenicznych. Geny kwaśnych inwertaz z drożdży są poddawane ekspresji w poszczególnych przedziałach subkomórkowych (apoplaście, wakuoli i cytoplazmie) komórek roślinnych, a uzyskana nadekspresja genu inwertazy drożdżowej w roślinach transgenicznych wywołuje zmiany w metabolizmie sacharozy. Z reguły prowadzi to do zahamowania transportu tego dwucukru pomiędzy tkankami donorowymi a akceptorowymi, co skutkuje zahamowaniem fotosyntezy, rozwoju liści i korzeni oraz kompletną zmianą ich morfologii (51,52).

Wysunięto hipotezę, że plasmodesmy posiadają specyficzną zdolność przemieszczania cząsteczek sygnałowych koordynujących rozwój liścia i jego funkcje fizjologiczne. Wysoka aktywność inwertaz w liściach transgenicznego tytoniu, przy jednoczesnej redukcji połączeń plazmatycznych, prawdopodobnie ogranicza przemieszczanie cząsteczek sygnałowych, co może wpływać na proces szybszego starzenia się liścia (9). Transgeniczne rośliny pomidora z genem inwertazy drożdżowej, którego ekspresja następowała w apoplaście, charakteryzowały się znacznie zredukowanym wzrostem. Wynikało to prawdopodobnie z akumulacji inwertazy w liściach, łodygach i korzeniach (51). Rośliny ziemniaka transformowane genem inwertazy drożdżowej, którego nadekspresję uzyskano w apoplaście komórek liści, ce-

chowały się zahamowanym wzrostem i wytwarzały mniejszą liczbę bulw w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Ponadto komórki liści gromadziły glukozę, fruktozę i aminokwasy, czemu towarzyszył wzrost ciśnienia osmotycznego oraz zahamowanie procesu fotosyntezy (53).

Uzyskanie transgenicznych roślin marchwi ze zredukowaną aktywnością Inv-V i Inv-CW umożliwiło wysunięcie hipotezy, że enzymy te odgrywają zasadniczą rolę w rozwoju oraz kontroli składu węglowodanowego komórek organów spichrzowych, ponieważ decydują o efektywności transportu asymilatów do tkanek spichrzowych. W normalnie rozwijających się roślinach marchwi aktywność Inv-V i Inv-CW może kontrolować różnicowanie się organów, poprzez wpływ na dystrybucję związków węgla pomiędzy tkankami. Zaburzenie tego procesu wywołuje anomalie w transporcie fotoasymilatów do korzeni i gromadzenie ich w liściach. Konsekwencją jest brak formowania się korzenia głównego (34). Przypuszcza się, że Inv-V poprzez rozkład transportowanej przez floem sacharozy podtrzymuje ciśnienie osmotyczne w rozwijających się komórkach korzenia, natomiast w późniejszej fazie wpływa na utrzymanie gradientu stężenia sacharozy pomiędzy korzeniem a liśćmi (54). Zmiana fenotypu roślin może wiązać się również z rozregulowaniem procesu sygnalizacji cukrowej pomiędzy tkankami (46,54). Na podstawie wszystkich danych przypuszcza się, że ekspresja inwertaz w nieodpowiednich miejscach, jak i w niewłaściwym czasie, prowadzi do drastycznych zmian w fizjologii oraz morfologii roślin transgenicznych.

7.2. Inwertazy w biotechnologii roślin

Kompleksowe oddziaływanie inwertaz na metabolizm skłaniają do poszukiwań możliwości praktycznego wykorzystania metod manipulacji genami kodującymi te enzymy w roślinach użytkowych. Badania te obejmują wiele aspektów ilościowej i jakościowej poprawy plonowania oraz eliminowania strat powstających w wyniku procesu przechowywania uzyskanego plonu.

Jeden z kierunków badawczych dotyczy udziału inwertaz w reakcji roślin na abiotyczne czynniki stresowe oraz możliwości manipulacji metabolizmem węglowodanów w celu uzyskania podwyższonej odporności gatunków istotnych dla rolnictwa. Ponieważ stres wodny, którego przyczyną jest głównie susza, nadmierne zasolenie roztworu glebowego lub niska temperatura, jest głównym czynnikiem limitującym plonowanie roślin, szczególnie interesująca jest, jak się wydaje, zdolność niwelowania negatywnych skutków jego oddziaływania. Stwierdzono, że spośród wszystkich dotychczas znanych genów inwertaz, gen *Ivr2* kodujący Inv-V jest jedynym, który ulega specyficznej indukcji pod wpływem stresu wodnego. Wzrost ekspresji genu *Ivr2* prowadzi do akumulacji heksoz i wzrostu ciśnienia osmotycznego soku komórkowego, co w konsekwencji indukuje odporność tkanek na odwodnienie (55).

Wykazano, że nadekspresja inwertazy drożdżowej w przestrzeni apoplastycznej tytoniu wpływała na podwyższoną tolerancję tego gatunku na stres wywołany nadmiernym zasoleniem. Rośliny transgeniczne charakteryzowały się dużo wyższym ciśnieniem osmotycznym soku komórkowego niż typ dziki, a wysoka zawartość heksoz w chloroplastach chroniła aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniem w warunkach stresowych (56). Podobne rezultaty uzyskano także w przypadku roślin pomidora (57,58). Transformacja roślin ziemniaka genem inwertazy drożdżowej wiązała się z jego podwyższoną odpornością na niską temperaturę. Wynikało to prawdopodobnie z faktu, że monosacharydy produkowane w wyniku nadekspresji apoplastycznej inwertazy, oprócz roli osmoregulacyjnej, mają również zdolność do stabilizacji i ochrony natywnej struktury błon komórkowych w warunkach hipotermii (40).

Z punktu widzenia przechowalnictwa obiecująca jest również, jak się wydaje, perspektywa zapobiegania stratom ilościowym i jakościowym podczas przechowywania uzyskanego plonu. Przechowywanie bulw ziemniaczanych w warunkach obniżonej temperatury jest jednym ze sposobów zapobiegania ich przedwczesnemu kiełkowaniu. Jednak niskie temperatury sprzyjają procesowi scukrzania skrobi i gromadzeniu cukrów rozpuszczalnych (ang. *cold-induced-sweetening*), przez co ulega pogorszeniu jakość kulinarna i przetwórcza bulw (59). Akumulacja heksoz jest wynikiem zaburzenia równowagi pomiędzy procesem degradacji skrobi a intensywnością glikolizy. Prowadzi to do wzrostu zawartości sacharozy, która w późniejszym etapie ulega hydrolizie do glukozy i fruktozy, przypuszczalnie przy udziale Inv-V (48). W celu przeciwdziałania gromadzeniu heksoz, do roślin ziemniaka wprowadzono pochodzący z tytoniu gen *Nt-inhh*, kodujący białkowy inhibitor Inv-V (Nt-VIF). Konsekwencją tego zabiegu była ponad 75% redukcja zawartości monosacharydów w transgenicznych bulwach przechowywanych w warunkach obniżonej temperatury. Ponadto nie wykazano negatywnego wpływu transformacji genem *Nt-inhh* na plon, a koncentracja skrobi nie uległa istotnym zmianom, dzięki czemu jakość bulw była dużo wyższa w porównaniu z surowcem kontrolnym (60). Zahamowanie aktywności Inv-V za pomocą wprowadzenia do roślin genu kodującego specyficzny inhibitor białkowy może przyczynić się również do stabilizacji sacharozy w korzeniach buraka cukrowego, co wzbudza duże zainteresowanie, szczególnie ze względów ekonomicznych. Stwierdzono, że mechaniczne uszkodzenia korzeni podczas ich zbioru wpływają na wzrost aktywności Inv-V. Dlatego też w początkowym okresie przechowywania buraków cukrowych znaczna część sacharozy ulega degradacji do heksoz. Ostatnio udało się zidentyfikować pojedynczą izoformę Inv-V (VI-1), która odpowiada za indukowaną zranieniem akumulację monosacharydów w dojrzałych korzeniach (61). Pilotażowe badania nad możliwością redukcji aktywności Inv-V w roślinach buraka cukrowego transformowanego genem kodującym białkowy inhibitor Nt-VIF są wyjątkowo obiecujące (48).

Interesujące są także poszukiwania efektywnych i bezpiecznych metod zapobiegania krzyżowaniu transgenów, co można uzyskać dzięki roślinom niezdolnym do

wytwarzania funkcjonalnego pyłku. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wykazano, że w procesie dojrzewania pyłku tytoniu udział bierze specyficzna tkankowo izoforma Inv-CW (Nin88) (48). Metodą postranskrypcyjnego wyciszania genów, za pomocą konstruktów genowych zawierających sekwencje antysensowe w stosunku do Nin88, uzyskano rośliny produkujące sterylny pyłek. Ekspresja antysensowego konstruktów *Nin88* w transgenicznym tytoniu nie wpłynęła w żaden sposób na jego wzrost i rozwój, z wyjątkiem indukcji męskiej sterility (62). Linie męskosterylne różnych gatunków roślin są również ważnymi komponentami odmian mieszańcowych (heterozyjnych), które lepiej plonują niż linie rodzicielskie, są odporniejsze na choroby oraz niekorzystne oddziaływanie środowiska. Wprowadzenie do prac hodowlanych linii z cytoplazmatyczną męską sterility stanowiło istotny przełom, gdyż niezdolność do wytwarzania funkcjonalnego pyłku eliminuje konieczność przeprowadzania żmudnej, ręcznej kastracji pylników. Ponadto gwarantuje, że otrzymane nasiona mieszańcowe są wynikiem przekrzyżowania a nie samozapylenia (63).

W ostatnich badaniach wskazuje się, że Inv-CW odgrywa podstawową rolę w procesie opóźniania starzenia się roślin, który jest indukowany za pośrednictwem cytokinin (64). Z reguły w tkankach o podwyższonej koncentracji cytokinin stwierdza się również wzrost aktywności tego enzymu. Ekspresja Inv-CW z komosy czerwonej (*Chenopodium rubrum*) w roślinach transgenicznego tytoniu istotnie wpływała na opóźnienie starzenia się liści, co sugeruje, że Inv-CW może efektywnie zastępować działanie cytokinin w tym procesie.

8. Perspektywy nowych zastosowań

Inwertazy, oprócz wykorzystania w inżynierii metabolicznej roślin, mogą znaleźć zastosowanie w produkcji biosensorów. Technologia wytwarzania biosensorów opiera się najczęściej na metodach immobilizacji specyficznych enzymów na odpowiednich nośnikach. Immobilizacja enzymów chroni ich centra aktywne przed inaktywacją, co zapewnia makromolekułom białkowym znaczną stabilność przy jednoczesnej redukcji kosztów biokatalizy. Wysoce specyficzne i czułe biosensory, oparte na immobilizowanych inwertazach, mogą być stosowane, np. w przemyśle spożywczym jako detektory obecności jonów metali ciężkich (65) oraz stężenia sacharozy w produktach żywnościowych (66). Dotychczas w tym celu stosowane były jedynie inwertazy drożdżowe (67,68), natomiast ostatnio pojawiło się doniesienie o możliwości wykorzystania również inwertaz roślinnych (66). Izolowane z miąższu owoców arbuza kwaśne inwertazy efektywnie immobilizowano na nośniku biopolimerowym (agaroza-guma guar). Immobilizowane enzymy charakteryzowała wysoka termostabilność (> 65°C) oraz trwałość (do 110 dni), przy możliwości wielokrotnego wykorzystania w około dwunastu cyklach. Podane cechy membran biopolimerowych z unieruchomionymi inwertazami roślinnymi mogą uczynić z nich cenny surowiec wykorzystywany w produkcji biosensorów.

9. Podsumowanie

Inwertazy roślinne zaangażowane są w podstawowe dla życia roślin szlaki metaboliczne, gdyż substraty i produkty ich aktywności są zarówno cząsteczkami odżywczymi jak i sygnałowymi. Inwertazy bezpośrednio lub przy udziale regulatorów kontrolują wiele aspektów wzrostu i rozwoju roślin, począwszy od ekspresji genów aż do długodystansowego transportu asymilatów. Dzięki dynamicznemu rozwojowi biotechnologii, manipulacje ekspresją genów kodujących inwertazy w roślinach transgenicznych, umożliwiły nie tylko poznanie funkcji fizjologicznych tych enzymów, ale również mogą przyczynić się do poprawy plonowania roślin, zwłaszcza w warunkach stresowych. Ze względu na szereg procesów na jakie oddziałują inwertazy, poznanie dokładnego mechanizmu regulacji ich aktywności stwarza możliwości opracowania skutecznych metod kontroli metabolizmu roślin. Działania te zmierzają nie tylko w kierunku wzrostu plonowania, ale również poszukiwania ekonomicznych sposobów długotrwałego przechowywania plonów przy zminimalizowaniu strat ilościowych i jakościowych. Kolejnym ważnym aspektem, jeżeli chodzi o potencjał biotechnologiczny inwertaz, jest możliwość konstruowania linii roślin męskosterylnych znajdujących szerokie zastosowanie w tworzeniu odmian mieszańcowych. Interesujące jest także, jak się wydaje, wykorzystanie inwertaz roślinnych w produkcji biosensorów stosowanych w przemyśle spożywczym. Współdziałanie wielu dyscyplin badawczych zajmujących się biologią roślin umożliwia zrozumienie kompleksowej funkcji fizjologicznej różnych izoenzymów inwertaz. W toku prowadzonych badań może wyłonić się jeszcze wiele zaskakujących aspektów ich oddziaływania, co prawdopodobnie stworzy nowe perspektywy praktycznego wykorzystania potencjału inwertaz w biotechnologii.

Literatura

1. Starck Z., (2003), *Transport i dystrybucja substancji pokarmowych w roślinach*, Wyd. SGGW, Warszawa.
2. Gibson S. I., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 1532-1539.
3. Gibson S. I., (2005), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 8, 93-102.
4. Smeekens S., (2000), *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 49-58.
5. Rolland F., (2002), *Plant Cell*, 14, 185-205.
6. González M. C., Roitsch T., Cejudo F. J., (2005), *Planta*, 222, 386-395.
7. Weber H., Roitsch T., (2000), *Trends Plant Sci.*, 5, 47-48.
8. Roitsch T., González M. C., (2004), *Trends Plant Sci.*, 9, 606-613.
9. Tymowska-Lalanne Z., Kreis M., (1998), *Adv. Bot. Res.*, 28, 71-117.
10. Sturm A., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 1-7.
11. Szadel A., Lorenc-Plucińska G., (2002), *Post. Biol. Kom.*, 29, 47-59.
12. Liu C.-C., Huang L.-C., Chang C.-T., Sung H.-Y., (2006), *Food Chem.*, 96, 621-631.
13. Gallagher J. A., Cairns A. J., Pollock C. J., (2004), *J. Exp. Bot.*, 55, 557-569.
14. Hedley P. E., Maddison A. L., Davidson D., Machray G. C., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 817-821.
15. Sherson S. M., Alford H. L., Forbes S. M., Wallace G., Smith S. M., (2003), *J. Exp. Bot.*, 54, 525-531.
16. Ji X., Van den Ende W., Van Laere A., Cheng S., Bennett J., (2005), *J. Mol. Evol.*, 60, 615-634.
17. Bosch S., Grof C. P. L., Botha F. C., (2004), *Plant Sci.*, 166, 1125-1133.

18. Vargas W., Cumino A., Salerno G. L., (2003), *Planta*, 216, 951-960.
19. Hsiao C. C., Fu R. H., Sung H. Y., (2002), *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 43, 115-122.
20. Goetz M., Roitsch T., (1999), *The Plant J.*, 20, 707-711.
21. Pagny S., Denmat-Ouisse L. A., Gomord V., Faye L., (2003), *Plant Cell Physiol.*, 44, 173-182.
22. Lee H-S., Sturm A., (1996), *Plant Physiol.*, 112, 1513-1522.
23. Sturm A., Hess D., Lee H-S., Lienhard S., (1999), *Physiol. Plant.*, 107, 159-165.
24. Obenland D. M., Simmen U., Boller T., Wiemken A., (1993), *Plant Physiol.*, 1001, 1331-1339.
25. Ciereszko I., (2002), *Post. Biol. Kom.*, 29, 269-289.
26. Day D. A., Copeland L., (1991), *Plant Physiol. Biochem.*, 29, 185-201.
27. Greiner S., Krausgrill S., Rausch T., (1998), *Plant Physiol.*, 116, 733-742.
28. Koch K., (2004), *Curr. Opi. Plant Biol.*, 7, 235-246.
29. Xu J., Avigne W. T., McCarty D. R., Koch K. E., (1996), *Plant Cell*, 8, 1209-1220.
30. Cheng W. H., Taliercio E. W., Chourey P. S., (1996), *The Plant Cell*, 8, 971-983.
31. Roitsch T., Balibrea M. E., Hofmann M., Proels R., Sinha A. K., (2003), *J. Exp. Bot.*, 54, 513-524.
32. Davies Ch., Robinson S. P., (1996), *Plant Physiol.*, 111, 275-283.
33. Ohyama A., Ito H., Sato T., Nishimura S., Imai T., Hirai M., (1995), *Plant Cell Physiol.*, 36, 369-376.
34. Sturm A., Tang G. Q., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 401-407.
35. Zhu J. K., (2001), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 4, 401-406.
36. Pelleshi P., Rocher J. P., Prioul J. L., (1997), *Plant Cell Environ.*, 20, 493-503.
37. Zeinselmeier C., Schussler J. R., Jone R. J., Westgate M. E., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 385-391.
38. McLaughlin J. E., Boyer J. S., (2004), *Ann. Bot.*, 94, 675-689.
39. Koonjul P. K., Minhas J. S., Nunes C., Sheoran I. S., Saini H. S., (2005), *J. Exp. Bot.*, 56, 179-190.
40. Deryabin A. N., Dubinina I. M., Burakhanova E. A., Astakhova N. V., Sabelnikova E. P., Trunova T. I., (2005), *J. Thermal. Biol.*, 30, 73-77.
41. Bray E. A., Bailey-Serres J., Weretilnyk E., (2000), *Responses to abiotic stresses*, in: *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Eds. Buchanan B., Gruissem W., Jones R., American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, 1158-1203.
42. Bournay A. S., Hedley P. E., Maddison A., Waugh R., Machray G. C., (1996), *Nucleic Acids Res.*, 24, 2347-2351.
43. Zeng Y., Wu Y., Avigne W. T., Koch K., (1999), *Plant Physiol.*, 121, 599-608.
44. Herbers K., Meuwly P., Frommer W. B., Métraux J-P., Sonnewald U., (1996), *The Plant Cell*, 8, 793-803.
45. Jang J. C., Sheen J., (1997), *Trends Plant Sci.*, 2, 208-214.
46. Smeekens S., (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 230-234.
47. Hetmann A., Kowalczyk S., (2003), *Post. Biol. Kom.*, 30, 87-112.
48. Rausch T., Greiner S., (2004), *Biochim. Biophys. Acta*, 1696, 253-261.
49. Hothorn M., D'Angelo I., Marquez J. A., Greiner S., Scheffzek K., (2004), *J. Mol. Biol.*, 335, 987-995.
50. Rojo E., Zouhar J., Carter C., Kovaleva V., Raikhel N. V., (2003), *PNAS*, 100, 7389-7394.
51. Dickinson C. D., Altabella T., Chrispeels M. J., (1991), *Plant Physiol.*, 95, 420-425.
52. Büssis D., Heineke D., Sonnewald U., Willmitzer L., Raschke K., Heldt H-W., (1997), *Planta*, 202, 126-136.
53. Heineke D., Sonnewald U., Büssis D., Günter G., Leidreiter K., Wilke I., Raschke K., Willmitzer L., Heldt H. W., (1992), *Plant Physiol.*, 100, 301-308.
54. Tang G. Q., Lüscher M., Sturm A., (1999), *Plant Cell*, 11, 177-189.
55. Kim J-Y., Mahé A., Brangeon J., Prioul J-L., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 71-84.
56. Fukushima E., Arata Y., Endo T., Sonnewald U., Sato F., (2001), *Plant Cell Physiol.*, 42, 245-249.
57. Balibrea M. E., Amico J. D., Bolarin M. C., Pérez-Alfocea F., (2000), *Physiol. Plant.*, 110, 503-511.
58. Balibrea M. E., Cuartero J., Bolarin M. C., Pérez-Alfocea F., (2003), *Physiol. Plant.*, 118, 38-46.
59. Nielsen T. H., Deiting U., Stitt M., (1997), *Plant Physiol.*, 113, 503-510.
60. Greiner S., Rausch T., Sonnewald U., Herbers K., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 708-711.
61. Rosenkranz H., Vogel R., Greiner S., Rausch T., (2001), *J. Exp. Bot.*, 52, 2381-2385.
62. Goetz M., Godt D. E., Guivarc'h A., Kahmann U., Chriqui D., Roitsch T., (2001), *PNAS*, 98, 6522-6527.

63. Majewska-Sawka A., Sadoch Z., (2003), *Kosmos*, 52, 413-423.
64. Balibrea Lara M. E., Gonzalez Garcia M-C., Fatima T., Ehness R., Lee T. K., Proels R., Tanger W., Roitsch T., (2004), *Plant Cell*, 16, 1276-1287.
65. Trojanowicz M., Lompagnone D., Goncales C., Jonia Z., Palleschi G., (2004), *Anal. Sci.*, 20, 889-904.
66. Bagal D., Karve M. S., (2006), *Anal. Chim. Acta*, 555, 316-321.
67. Prodanović R., Jovanović S., Vujčić Z., (2001), *Biotechnol. Lett.*, 23, 1171-1174.
68. Isik S., Alkan S., Toppare L., Cianga I., Yagci Y., (2003), *Euro. Poly. J.*, 39, 2375-2381.