

УДК 581.1

КИСЛАЯ ВАКУОЛЯРНАЯ ИНВЕРТАЗА В ПОКОЯЩИХСЯ И ПРОРАСТАЮЩИХ СЕМЕНАХ КОНСКОГО КАШТАНА¹

© 2009 г. Н. В. Обручева, С. В. Литягина

Институт физиологии растений РАН
127276 Москва, Ботаническая ул., д. 35

E-mail: obroucheva@ippras.ru

Поступила в редакцию 22.04.09 г.
Окончательный вариант получен 27.05.09 г.

В осевых органах семян конского каштана после опадения и вплоть до прорастания поддерживается высокая оводненность тканей и сохраняются вакуоли, особенности метаболизма которых могут влиять на ход подготовки клеток к инициации роста при прорастании. Показано, что активность кислой вакуолярной инвертазы и ее способность расщеплять как сахарозу, так и рафинозу, а также величины молекулярных масс субъединиц (63 и 65 кДа) и мультимера (500–550 кДа) фермента не меняются на протяжении периода покоя, выхода из него и прорастания. Активность фермента возрастает при набухании в оптимальных для прорастания условиях, что обусловлено синтезом новых молекул фермента на долгоживущей мРНК. Сохранность фермента в вакуолях покоящихся семян и возрастание его активности при набухании у вышедших из покоя семян обеспечивают быстрый гидролиз притекающей из семядолей сахарозы, способствуя возрастанию осмотического давления и, как следствие, началу растяжения клеток, т.е. прорастанию.

Ключевые слова: *Aesculus hippocastanum*, рекальцитрантные семена, осевые органы, вакуолярная инвертаза, прорастание, вакуолизация.

Исследования инвертаз (К.Ф. 3.2.1.26) в различных растительных тканях и органах позволили обнаружить две инвертазы (Sturm, 1999), сходные по оптимуму pH и продуктам реакции – глюкозе и фруктозе, но отличающиеся по физиологической роли и по локализации внутри клетки: инвертазу клеточной стенки (cell wall invertase) и вакуолярную инвертазу (vacuolar invertase) (Roitsch, Tanner, 1996). Считается, что кислая инвертаза, связанная с клеточной стенкой, является ключевым ферментом при разгрузке флоэмы (Roitsch et al., 2003) и расщепляет сахарозу, доставленную пока не выявленными транспортерами сахарозы в апопласт растущего органа из фотосинтезирующих или запасующих органов. В результате ее функционирования моносахара могут непосредственно использоваться на синтез полимеров клеточной стенки или доставляться при помощи транспортеров моносахаров в цитоплазму и включаться в метаболизм.

Сахароза, не подвергаясь гидролизу на уровне клеточной оболочки и не включившаяся в метаболизм, поступает в вакуоль, где может накапливаться в заметных количествах. Вакуолярная инвертаза может расщеплять ее до глюкозы и фруктозы, что приведет к накоплению эндогенных осмотиков и

возрастанию осмотического давления. Поэтому именно вакуолярная инвертаза может играть важную роль в поступлении воды в растущие клетки и, следовательно, в инициации роста при прорастании.

Вакуолярная инвертаза характеризуется менее кислым оптимумом pH (4.5–5.5), чем таковая клеточной стенки (3.5–5.0). Например, оптимум pH вакуолярной инвертазы из моркови *Daucus carota* (Unger et al., 1992), *Arabidopsis thaliana* (Tang et al., 1996) и ячменя *Hordeum vulgare* (Karupiah et al., 1989) на 0.6–0.9 единиц выше, чем у инвертазы клеточных стенок из тех же тканей. Субстратом для обеих кислых инвертаз могут быть не только сахароза, но и другие фруктофуранозиды с фруктозным остатком на конце молекулы, например такие олигосахариды, как рафиноза, стахиоза, вербаскоза. Их гидролиз происходит гораздо медленнее, чем у сахарозы (Sturm, 1999; Hashizume et al., 2003).

Вакуолярной инвертазе в литературных источниках уделяется гораздо меньше внимания, чем инвертазе клеточных стенок. Активность кислой вакуолярной инвертазы была обнаружена в ряде растений, и ее ферментативные свойства были охарактеризованы. В работах на различных объектах показано, что инвертаза может существовать в виде нескольких изоферментов с различными величинами констант Михаэлиса для сахарозы, но с одинаковым оп-

¹ Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 08-04-00416).

тимумом рН для разных изоформ (Obenland et al., 1993; Hashizume et al., 2003).

Известна активность вакуолярной инвертазы только для семян ортодоксального типа, т.е. для обычных семян, которые при созревании теряют воду до влажности ниже 10% и в таком воздушно-сухом состоянии хранятся до посева. Как правило, по мере потери воды вакуоли в них превращаются в хранилище резервного белка; они восстанавливаются при прорастании, поглощая воду, и тогда играют роль осмотического компартмента. Синтез белка инвертазы *de novo* был показан в семенах салата *Lactuca sativa*, выходящих из покоя (Eldan, Mayer, 1974). Наиболее полно появление и рост активности этого фермента описаны для семян *A. thaliana*, которые выходят из состояния покоя под действием освещения красным светом (730 нм), приводящего к синтезу активного гиббереллина. Гиббереллин индуцирует экспрессию двух генов вакуолярной инвертазы – *Atβfruct3* и *Atβfruct4*, в результате чего его ферментативная активность обнаруживается после инициации роста и усиливается по мере роста проростка (Mitsuhashi et al., 2004). Активность вакуолярной инвертазы была отмечена также в проросших семенах *A. thaliana* (Mitsuhashi et al., 2004) и моркови (Unger et al., 1992), а также в колеоптилях пшеницы *Triticum aestivum* (Krishnan et al., 1985). Таким образом, активность кислой вакуолярной инвертазы связана с прорастанием, и ее значимость может заключаться в поддержании осмотического давления в клетках растущего проростка, что необходимо для растяжения клеток осевых органов.

Семена другого, рекальцитрантного, типа отличаются тем, что при потере воды в ходе созревания ниже 60% они погибают, т.е. неустойчивы к высыханию. К таким семенам относится конский каштан *Aesculus hippocastanum*, в осевых органах которого после опадения семян поддерживается влажность 62–65% (Обручева, Антипова, 2004) в течение всего периода зимнего покоя. У вышедших из покоя набухших семян влажность осевых органов возрастает к прорастанию до 73–74%. В семенах рекальцитрантного типа исследований вакуолярной инвертазы не проводилось, хотя известно, что в коре гипокотилия у зрелых покоящихся семян вакуоли сохраняются. Сохранность вакуолей была подтверждена присутствием аквапоринов тонопласта в осевых органах этих семян (Шижнева, 2007). Высокая оводненность тканей осевых органов семян каштана, обусловленная сохранностью их вакуолей, свидетельствует о преимуществах этого объекта с позиций понимания роли вакуолизации в инициации роста клеток. Семена каштана уникальны тем, что при прорастании вакуоли в осевых органах не реставрируются, а, сохранившись, могут сразу начать функционировать как осмотический компартмент. Цель работы – изучить свойства вакуолярной инвертазы как одного из ключевых ферментов в метаболизме вакуолей.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В качестве объекта исследования выбраны рекальцитрантные семена конского каштана *Aesculus hippocastanum* L. Их характерной особенностью является прорастание только за счет растяжения клеток гипокотилия, которое непосредственно связано с их вакуолизацией (Obroucheva, 1999).

Зрелые опавшие семена собирали в начале октября в Главном ботаническом саду им. Н.В. Цицина РАН, Москва. Семена подвергали стратификации в ящиках с влажным песком в холодной камере при +4°C в темноте. В таких условиях стратификация длится 16–18 нед., в результате чего семена выходят из глубокого покоя и приобретают способность прорасти. По ходу стратификации для анализов отбирали порции семян с неповрежденной кожурой и помещали их в оптимальные для прорастания условия (погружали в воду на 1 см в темный термостат при 27°C). Семена считали проросшими, если на поверхности семени появлялся кончик корня. По количеству проросших семян и длительности прорастания в оптимальных условиях определяли степень выхода из покоя. Исследования проводили по ходу стратификации во время глубокого покоя, во время выхода из покоя и в отсутствие покоя, т.е. при быстром прорастании.

В другой серии опытов использовали семена с частично удаленной (вокруг осевых органов) семенной кожурой. Для облегчения проникновения воды и раствора циклогексимид (30 мкг/мл) такие семена помещали осевыми органами вниз.

В третьей серии опытов использовали отделенные от семени осевые органы, состоящие из зародышевого корешка, гипокотилия и почечки, и инкубировали их при 27°C в растворе α-аманитина (5 мкг/мл). Во всех сериях опытов брали пробы для определения активности вакуолярной инвертазы *in vitro*.

Определение активности инвертазы. По ходу стратификации, набухания и при прорастании из семян извлекали осевые органы, затем их взвешивали, замораживали и хранили при температуре –20°C. Растительный материал (200 мг) растирали на холоду с кварцевым песком в 0.01 М фосфатном буфере (рН 6.47) и центрифугировали при +4°C 20 мин при 16000 g. Супернатант для удаления эндогенных сахаров диализовали 24 ч против того же буфера при +4°C. Аликвоты супернатанта инкубировали в 0.01 М фосфатно-цитратном буфере (рН 5.5) с субстратом 30 мин при 30°C, субстратом служили 50 мМ сахароза и 50 мМ рафиноза. Реакцию останавливали кипячением в течение 2 мин. Активность инвертазы определяли по количеству полученной фруктозы (Туркина, Соколова, 1971) и рассчитывали на единицу белка, для чего определяли содержание белка с помощью метода Брэдфорд (Bradford, 1976).

Определение молекулярной массы. Для определения молекулярной массы инвертазы использова-

ли два подхода: сначала выделяли нативный белок инвертазы с помощью нативного электрофореза, а затем подвергали этот белок разделению в денатурирующих условиях для установления молекулярной массы субъединиц.

Пробу белка для нативного электрофореза смешивали с равным объемом двукратного буфера, содержащего 0.5 М *трис*-HCl (pH 6.8), 15%-ный глицерин и 0.02% бромфенолового синего. Электрофорез проводили в 7%-ном полиакриламидном геле при силе тока 20 мА в течение 2.5 ч при +4°C (Davis, 1964). В качестве маркеров применяли набор белков для нативного электрофореза ("Sigma", США).

Для обнаружения активности инвертазы гель помещали в раствор 0.01 М фосфатно-цитратного буфера (pH 5.5) на 10 мин при 37°C. Буфер удаляли, к гелю добавляли 0.6 М сахарозу в 0.01 М фосфатно-цитратном (pH 5.5) буфере на 1 ч при 37°C. Реакцию останавливали кипящей смесью, содержащей 0.2%-ный 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид и 4%-ный NaOH. В течение 10 мин развивалось устойчивое розово-красное окрашивание продукта реакции – фруктозы. Для определения молекулярной массы субъединиц фермента из геля вырезали окрашенный участок, тщательно растирали с 10%-ной ТХУ, затем центрифугировали 20 мин при 16000 г на холоду, а супернатант сливали. К осажденному белку добавляли 7%-ную ТХУ и центрифугировали 20 мин при 16 000 г, процедуру повторяли дважды. От ТХУ осадок отмывали три раза холодным 80%-ным ацетоном. После этого осадок растворяли в буфере для образцов, содержащем 62.5 мМ буфер *трис*-HCl (pH 6.8), 2%-ный додецилсульфат натрия, 10%-ный глицерин, 5%-ный β-меркаптоэтанол и 0.02%-ный бромфеноловый синий. Белки денатурировали в течение 5 мин при 95°C. Денатурирующий электрофорез проводили в 10%-ном полиакриламидном геле по описанному ранее методу (Laemmli, 1970). В качестве маркеров использовали набор белков известной молекулярной массы ("Sigma", США). На гели наносили аликвоты с равным количеством белка. Электрофорез проводили в течение 1.5 ч при 4–6°C и силе тока 20 мА. Гели фиксировали с одновременным окрашиванием в растворе 0.1%-ного красителя Кумасси R-250 в смеси метанол : уксусная кислота : вода в соотношении по объему 5 : 1 : 4. Гели отмывали в смеси метанол : уксусная кислота : вода в соотношении 1 : 1 : 8.

Опыты ставили в течение трех лет. Анализы проводили в трех повторностях, каждая проба состояла из пяти осевых органов. Результаты представлены в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку в осевых органах каштана преобладает сахароза, но имеется небольшое количество ра-

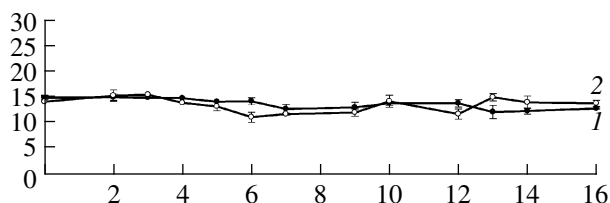


Рис. 1. Активность вакуолярной инвертазы в осевых органах конского каштана по ходу стратификации семян. По оси абсцисс – длительность стратификации, нед.; по оси ординат – количество расщепленного субстрата, ммоль/мг белка. Используются субстраты: 1 – сахароза; 2 – рафиноза.

финозы (Обручева и др., 2006), то оба углевода могут быть субстратом для вакуолярной инвертазы в начальный период набухания семян. Мы исследовали активность кислой вакуолярной инвертазы *in vitro* и ее способность расщеплять сахарозу и рафинозу в покоящихся, выходящих из покоя и в непокоящихся семенах. Как видно из данных рис. 1, инвертаза успешно расщепляла сахарозу и рафинозу. Активность инвертазы обнаружена уже в зрелых опавших семенах (0 нед. стратификации), далее фермент сохранялся в активной форме в течение всего периода покоя, причем уровень активности по ходу стратификации оставался примерно одинаковым.

Способность вакуолярной инвертазы расщеплять рафинозу установлена далеко не во всех растительных объектах, но обнаружена в колеоптилях пшеницы (Krishnan et al., 1985), сухих семенах моркови (Unger et al., 1992), междоузлиях стебля ячменя (Karupiah et al., 1989) и плодах японской груши *Pyrus serotina* (Hashizume et al., 2003). Мы также обнаружили ее в осевых органах каштана.

Активность инвертазы заметно увеличивалась по ходу набухания семян на всех исследуемых сроках стратификации (рис. 2). Это скорее всего связано с притоком сахарозы в осевые органы в течение первой трети периода набухания семян. Активность фермента исследовали в осевых органах набухающих семян после 4-й (покоящиеся семена), 9-й (выходящие из покоя) и 14-й (непокоящиеся семена) недель стратификации и при наклевывании этих семян. Независимо от продолжительности стратификации наблюдали сходную динамику активности вакуолярной инвертазы в осевых органах набухающих семян. Происходило заметное возрастание активности фермента уже к середине периода набухания (рис. 2), что, вероятно, связано с началом притока сахарозы из семядолей в осевые органы (Обручева и др., 2006). К проклевыванию активность инвертазы усиливалась примерно в два раза, что вызвано продолжающимся притоком сахарозы из семядолей.

Для того чтобы получить представление о молекулярной массе инвертазы, использовали нативный электрофорез. Единственную окрашенную полосу

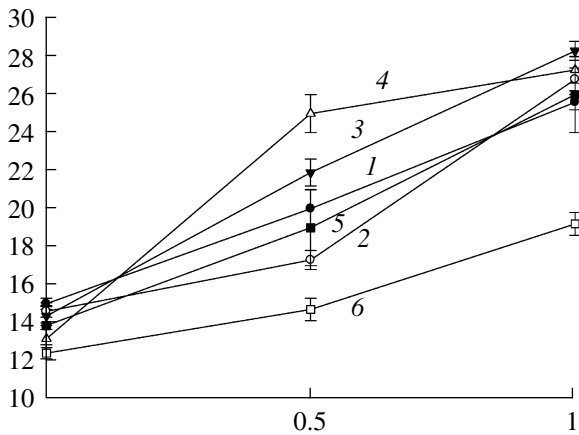


Рис. 2. Активность вакуолярной инвертазы в осевых органах по мере набухания и прорастания семян каштана. По оси абсцисс – относительная длительность набухания (период до начала прорастания принят за единицу); по оси ординат – количество расщепленной сахарозы, ммоль/мг белка. Время стратификации, нед.: 1 – 3, 2 – 5, 3 – 6, 4 – 9, 5 – 12, 6 – 14.

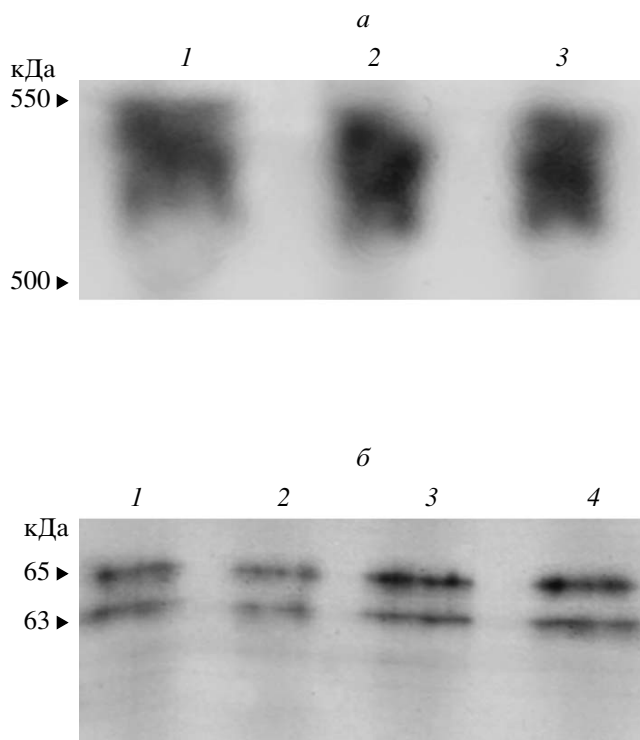


Рис. 3. Результаты электрофореза белка вакуолярной инвертазы из осевых органов семян каштана: *а* – нативного, *б* – денатурирующего. *а*: 1, 2 – после 4 и 9 нед. стратификации, 3 – наклюнувшиеся семена; *б*: 1 – 3 – после 4, 9 и 14 нед. стратификации соответственно, 4 – наклюнувшиеся семена.

инвертазы в геле наблюдали в диапазоне от 500 до 550 кДа (рис. 3, *а*). Интенсивность окрашивания не менялась в осевых органах в течение периода покоя и при прорастании, что сопоставимо с данными по

измерению энзиматической активности *in vitro*. Из литературных данных известно, что инвертаза может быть мультимерным белком. В ряде работ молекулярную массу фермента определяли при помощи гель-фильтрации и обнаружили белки с молекулярной массой 50–70 кДа, а также нашли их димеры и тримеры (Karupian et al., 1989; Unger et al., 1992; Obenland et al., 1993; Hashizume et al., 2003). Можно допустить, что вакуолярная инвертаза и в осевых органах каштана является мультимерным белком. Для определения молекулярной массы субъединиц инвертазы использовали электрофорез в денатурирующих условиях (рис. 3, *б*), в результате которого выявлены полосы с молекулярной массой 63 и 65 кДа. Следовательно, инвертаза в осевых органах каштана скорее всего является мультимерным белком с молекулярной массой 500–550 кДа, который состоит из восьми субъединиц с молекулярными массами 63 и 65 кДа. Молекулярная масса субъединиц вакуолярной инвертазы, обнаруженной в осевых органах семян каштана, сопоставима с таковой обнаруженных в других объектах, но степень агрегированности субъединиц в холоферменте каштана гораздо выше.

Хорошо известно, что циклогексимид в диапазоне концентраций 2–30 мкг/мл является ингибитором трансляции на рибосомах и подавляет прорастание (Брукер и др., 1982; Rajjou et al., 2004), что было продемонстрировано в ряде работ на разных объектах. Усиление активности вакуолярной инвертазы в наших опытах может быть обусловлено либо активацией фермента, либо его новообразованием. Чтобы оценить, происходит ли при набухании и прорастании семян синтез *de novo* молекул вакуолярной инвертазы, были проведены длительные опыты по инкубированию семян с частично удаленной семенной кожурой. Длительность инкубации составляла от 6 (5 нед. стратификации) до 1 сут (16 нед. стратификации), что вызвано постепенным ускорением выхода семян из состояния покоя и сокращением периода набухания до проклевывания (таблица). Конец инкубации в среде с циклогексимидом соответствовал тому времени, когда у контрольных семян происходило наклевание, хотя в растворе ингибитора наклевание не происходило. При измерении активности фермента наблюдали постепенное усиление действия циклогексимиды по мере набухания семян (таблица), что характерно для всех исследованных сроков. Так, при инкубации после 6 нед. стратификации в середине периода набухания семян ингибирование активности фермента составляло 27%, а при прорастании – 48%, аналогичное усиление ингибирования происходило после 14 нед. стратификации (с 12 до 29%). Даже при коротких экспозициях (0.5–1 сут) происходило ингибирование активности на 12%. Можно предположить, что в осевых органах набухающих и прорастающих семян возрастание активности фермента определяется главным образом ранее синтезированными молекулами инвертазы,

Ингибирование циклогексимидом активности кислой вакуолярной инвертазы в осевых органах семян каштана, % от инкубации без ингибитора

Длительность стратификации, нед.	Ингибирование в середине периода набухания	Инкубация, сут	Ингибирование при прорастании	Инкубация, сут
5	30	3	Нет данных	6
6	27	2	48	5
9	31	2	35	3.5
12	Нет данных	1.5	28	3
14	12	1	29	2
16	12	0.5	23	1

но наряду с ними при набухании семян образуются и новые молекулы фермента, хотя их доля в проявлении активности меньше.

Далее, чтобы установить, происходит ли отмеченный синтез молекул фермента при набухании на вновь образованной мРНК или же на матрицах долгоживущей мРНК, сформированных еще в созревающих семенах, в инкубационную среду вносили раствор α -аманитина, который избирательно подавляет синтез мРНК, катализируемый ДНК-зависимой РНК-полимеразой II. Известно, что семена прорастают в этом ингибиторе очень медленно, и дальнейшего развития проростка не происходит (Брукер и др., 1982; Rajjou et al., 2004). Мы использовали изолированные из семени осевые органы для облегчения проникновения раствора ингибитора, в результате чего в течение 2 сут проклевывания не происходило, хотя контрольные осевые органы достигали длины и веса осей в целых проклюнувшихся семенах. При

измерении активности фермента (рис. 4) оказалось, что α -аманитин не ингибировал активность вакуолярной инвертазы. Следовательно, обнаруженный нами (таблица) синтез инвертазы *de novo* происходил на старых долгоживущих матрицах РНК и не нуждался в новом синтезе мРНК.

Таким образом, у рекальцитрантных семян сохраняется активная вакуолярная инвертаза, и ее свойства не меняются в период от опадения семян, в течение покоя и до прорастания. При набухании в оптимальных для прорастания условиях ее активность усиливается, что связано с синтезом новых молекул белка на долгоживущей мРНК. Сохранение активной вакуолярной инвертазы в осевых органах и усиление ее активности при набухании обеспечивают возможность активного расщепления притекающей из семядолей сахарозы до моносахаров, что увеличивает осмотическое давление и приводит к быстрой инициации роста растяжением, т.е. к прорастанию.

Полученная нами характеристика ферментативной активности вакуолярной инвертазы отличает рекальцитрантные семена от ортодоксальных тем, что в семенах каштана происходит ранний (до прорастания) приток сахарозы в осевые органы из запасов, а в ортодоксальных семенах такой приток имеет место после начала прорастания. Этот вывод соответствует наблюдениям японских исследователей (Mitsuhashi et al., 2004), показавших, что экспрессия генов вакуолярной инвертазы начинается только при набухании и приводит к обнаружению активности фермента уже после прорастания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Брукер Д.Д., Ченг С.П., Маркус А. Синтез белка и прорастание семян // Физиология и биохимия покоя и прорастания семян. М.: Колос, 1982. С. 387–396.

Обручева Н.В., Антипова О.В. Роль поступления воды в переходе рекальцитрантных семян от покоя к прорастанию // Физиология растений. 2004. Т. 51. С. 942–951.

Обручева Н.В., Литягина С.В., Рихтер А. Динамика углеводов в осевых органах семян конского каштана при

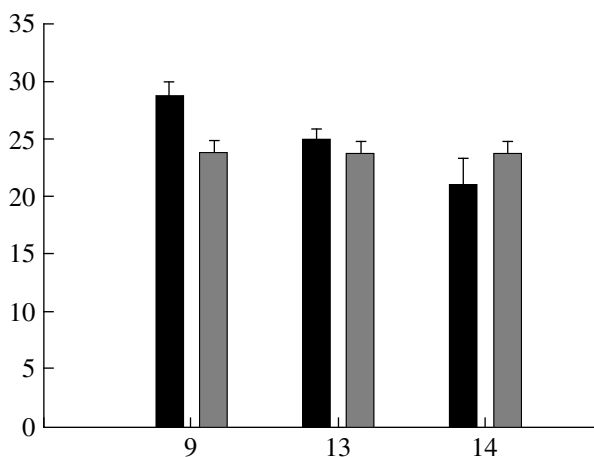


Рис. 4. Влияние α -аманитина на активность кислой вакуолярной инвертазы в осевых органах, изолированных из семян каштана в течение стратификации. По оси абсцисс – длительность стратификации, нед.; по оси ординат – количество расщепленной сахарозы, ммоль/мг белка. Осевые органы: (■) – контрольные, (■) – в растворе α -аманитина.

- переходе от покоя к прорастанию // Там же. 2006. Т. 53. С. 869–879.
- Туркина М.В., Соколова С.В. Методы определения моносахаридов и олигосахаридов // Биохимические методы в физиологии растений. М.: Наука, 1971. С. 7–34.
- Шижнева И.А. Участие аквапоринов в поступлении воды в осевые органы прорастающих семян: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: Ин-т физиологии растений РАН, 2007. 28 с.
- Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
- Davis B.J. Description of discontinuous buffer system for non-denaturing gels and disc electrophoresis // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1964. V. 209. P. 373–381.
- Eldan M., Mayer A.M. Acid invertase in germinating *Lactuca sativa* seeds: Evidence for *de novo* synthesis // *Phytochemistry*. 1974. V. 13. P. 389–395.
- Hashizume H., Tanase K., Shiratake K. et al. Purification and characterization of two soluble acid invertase isozymes from Japanese pear fruit // *Ibid.* 2003. V. 63. P. 125–129.
- Karuppiyah N., Vadlamudi B., Kaufman P.B. Purification and characterization of soluble (cytosolic) and bound (cell wall) isoforms of invertases in barley (*Hordeum vulgare*) elongating stem tissue // *Plant Physiol.* 1989. V. 91. P. 993–998.
- Krishnan H.B., Blanchette J.T., Okita T.W. Wheat invertases // *Ibid.* 1985. V. 78. P. 241–245.
- Laemmli U.R. Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis // *Nature*. 1970. V. 227. P. 680–685.
- Mitsuhashi W., Sasaki S., Kanazawa A. et al. Differential expression of acid invertase genes during seed germination in *Arabidopsis thaliana* // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2004. V. 68. P. 602–608.
- Obenland D.M., Simmen U., Boller T., Wiemken A. Purification and characterization of three soluble invertases from barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves // *Plant Physiol.* 1993. V. 101. P. 1331–1339.
- Obroucheva N.V. Seed germination: A guide to the early stages. Leiden: Backhuys Publ., 1999. 158 p.
- Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I. et al. The effect of α -amanitin on the *Arabidopsis* seed proteome highlights the distinct roles of stored and neosynthesized mRNA during germination // *Plant Physiol.* 2004. V. 134. P. 1–16.
- Roitsch T., Tanner W. Cell wall invertase: bringing the gap // *Bot. Acta.* 1996. V. 109. P. 90–93.
- Roitsch T., Balibrea M.E., Hofmann M. et al. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein // *J. Exp. Bot.* 2003. V. 54. P. 513–524.
- Sturm A. Invertases. Primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning // *Plant Physiol.* 1999. V. 121. P. 1–7.
- Tang X., Ruffner H.P., Scholes J.D., Rolfe S.A. Purification and characterization of soluble invertases from leaves of *Arabidopsis thaliana* // *Planta.* 1996. V. 198. P. 17–23.
- Unger C., Hofsteenge J., Sturm A. Purification and characterization of a soluble β -fructofuranosidase from *Daucus carota* // *Eur. J. Biochem.* 1992. V. 204. P. 915–921.

Acid Vacuolar Invertase in Hibernating and Germinating Seeds of the Horse Chestnut

N. V. Obroucheva and S. V. Lityagina

Institute of Plant Physiology, Russian Academy of Sciences, ul. Botanicheskaya 35, Moscow, 127276 Russia

e-mail: obroucheva@ippras.ru

Abstract—A high water content is maintained in the tissues of the axial organs of horse chestnut seeds after the fruit is shed and down to the time the seeds germinate. The plant cell vacuoles, features of whose metabolism can influence the cells' preparation to initiate growth in germination, are preserved. It was shown that the activity of acid invertase and its capacity to digest both sucrose and raphinose remain stable throughout the period of hibernation and the transition to germination, as do the molecular weight of its subunits (63 and 65 kDa) and multimer (500 to 550 kDa). The activity of the enzyme increases when the seeds swell under optimal conditions for germination; this is associated with the synthesis of new molecules of the enzyme in long-lived mRNA matrices. The storability of the enzyme in the vacuoles of hibernating seeds, together with the increase in its activity when seeds coming out of hibernation swell, ensures the rapid hydrolysis of sucrose issuing from the seeds' cotyledons, thus leading to increased osmotic pressure and, as a result, the beginning of cell elongation, i.e., germination.

Key words: *Aesculum hippocastanum*, recalcitrant seeds, axial organs, vacuolar invertase, germination, vacuolization.