

УДК 581.19; 633.11

**ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ ИЗМЕРЕНИЯ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ
СИНТЕЗА АСПАРАГИНА ПШЕНИЦЫ ПРИ РЖАВЧИННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ**

**БИДАЙДЫҢ ТАТ АУРУЛАРЫНДАҒЫ АСПАРАГИН СИНТЕЗІ ФЕРМЕНТТЕРІНІҢ
БЕЛСЕНДІЛІГІН ӨЛШЕУ ӘДІСТЕМЕСІН ОҢТАЙЛАНДЫРУ**

**OPTIMIZATION OF THE METHOD OF MEASUREMENT OF ENZYME ACTIVITY OF
OF ASPARAGIN SYNTHESIS OF WHEAT AT RUST DISEASES**

Ж.С. КУДИЯРОВА
Ж.С. ҚҰДИЯРОВА
ZH.S. KUDIYAROVA

(Алматынський технологический университет, г. Алматы)
(Алматы технологиялық университеті, Алматы қ.)
(Almaty Technological University, Almaty)
E-mail: zhanar_ks@mail.ru

*В данной статье представлены результаты исследований активности ферментов, связанных с синтезом аспарагина – аспарагин синтетазы (АС) и аспарагиназы в листьях пшеницы в норме и при стрессовых условиях, как ржавчинные заболевания. Проведены модификации и оптимизации методов экстрагирования белков и измерения активности аспарагин синтетазы, а также исследования по разработке высокоэффективного метода альтернативной высокоэффективной жидкой хроматографии для измерения аспарагина, воспроизведенного аспарагин синтетазой. В результате эксперимента наблюдается, что активность связанных с синтезом аспарагина повышается, и соответственно увеличивается концентрация аспарагина при инфицировании растения желтой ржавчиной (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*). Выявлено, что активность АС и аспарагиназы в зараженных листьях пшеницы выше, чем у незараженных (контрольных) растениях.*

Из полученных результатов сделано предположение, что при стрессовых условиях ферменты метаболизма аспарагина работают интенсивнее, поэтому активность АС, как и активность аспарагиназы повышается. Вероятно, что аспарагин играет важную роль в адаптации растений к биотическим стрессовым условиям.

Бұл мақалада аспарагин синтезіне тікелей байланысты аспарагин синтетаза және аспарагиназа ферменттерінің белсенділіктерін қалыпты және күйзеліс жағдайларында (тат ауруларына шалдыққанда) зерттеу нәтижелері көрсетілген.

Ақуыздарды бөліп алу және аспарагин синтетазаның, аспарагиназаның белсенділігін өлшеу әдістері өзгертіліп оптимизацияланған, сонымен қатар аспарагин синтетазаның белсенді жұмысының нәтижесінде пайда болған аспарагиннің мөлшерін анықтау үшін жоғары эффективті сұйық хроматографиясы әдісіне ұқсас жоғары эффективті әдіс өңделген.

*Тәжірибе нәтижесінде (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*) сары тат ауруымен инфицирленген өсімдіктерде аспарагинді түзетін аспарагин синтетаза және оны ыдырататын аспарагиназа ферменттерінің белсенділіктері артқандығы байқалған. Ауруға шалдыққан бидай жапырақтарында аспарагин синтетазаның белсенділігі 1,5 есе, ал аспарагиназаның белсенділігі 2 еседен артық артқандығы анықталды.*

Алынған мәліметтерге сүйене отырып мынадай тұжырым жасауға болады, яғни күйзеліс жағдайында аспарагин метаболизміне қатысатын ферменттер қарқынды жұмыс жасайды, сондықтан аспарагин синтетаза және аспарагиназа ферменттерінің белсенділігі артады. Өсімдіктердің биотикалық күйзеліс жағдайларына бейімделуінде аспарагин маңызды қызмет атқаруы мүмкін.

This article presents the results of research activity of enzymes associated with the synthesis of asparagine synthetase and asparaginase in wheat leaves under normal and stress conditions such as rust diseases. We have carried out the modification and optimization of protein extraction and asparagine synthetase assay methods, as well as research on the development of high-throughput methods, as an alternative to High pressure liquid chromatography for measuring the asparagine produced in the asparagine synthetase assay.

*In the experiment, observed that the activity associated with the synthesis of asparagine increased and accordingly increases the concentration of asparagine in plants infected with yellow rust (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*). Revealed that AC activity in infected wheat leaves 1.5 times higher than that of uninfected (control) plants and asparaginase - more than 2 times.*

From the obtained results has been suggested that under stress conditions asparagine metabolism enzymes are working more intensively, as activities of asparagines synthetase and asparaginase have increased. Likely that asparagine plays an important role in the adaptation of plants to biotic stress conditions.

Ключевые слова: аспарагин, аспарагин синтетаза (АС), аспарагиназа, устойчивые и неустойчивые к ржавчине растения.

Негізгі сөздер: аспарагин, аспарагин синтетаза (АС), аспарагиназа, тат ауруларына төзімді және төзімсіз өсімдіктер

Keywords: asparagine, asparagine synthetase, asparaginase, rust-resistant, rust-susceptible plants.

Введение

Изучение ключевых ферментов азотного обмена в норме и при стрессовых условиях у важнейших злаковых культур Казахстана открывают новые пути для управления процессами, которые определяют биологическую продуктивность, его качество и устойчивость к стрессовым условиям как ржавчинные заболевания.

В среде, окружающей растения, обитает множество бактерий, грибов, вирусов и др. При этом растения, зачастую, благополучно процветают. Следовательно, большинство растений устойчивы к большинству потенциально патогенных микроорганизмов. Тем не менее, одной из серьезных проблем сельского хозяйства является экономический ущерб, наносимый культурным растениям патогенами [1].

Инфицирование возбудителями разных болезней является распространенным стрессовым воздействием, вызывающим обычно каскад метаболических изменений, которые можно суммировать как мультикомпонентные ответы. Они включают накопление полисахаров, фенолов, лигнина, суберина, фитоалексинов и фитонцидов и ферментов, участвующих в синтезе гидроксипролин богатых белков и аминокислот, индукцию синтеза и

увеличения уровня так называемых «pathogenesis-related» (PR)-белков и аспарагина [2].

Аспарагин играет центральную роль в запасании и транспортировке азота в растениях, накоплении в их различных тканях, особенно в условиях стресса, при которых растения не в состоянии поддерживать нормальный уровень синтеза белка.

Аккумуляция аспарагина происходит при нормальных физиологических процессах, как при прорастании семян, транспорте азота, а также его концентрация повышается при абиотических и биотических стрессах, например, при засухе, засолении почв, недостатке минералов, в присутствии токсических металлов и при патогенных заболеваниях [3].

Аспарагин является мобильным посредником азотсодержащих молекул, который может быстро перемещаться в любую часть растения при определенных физиологических условиях, включая недостаток неорганического азота. Известно, что в растениях главный путь биосинтеза аспарагина это преобразование аспартата в аспарагин с помощью глютамин-зависимой аспарагин синтетазы, который является основным ферментом производства аспарагина [4]. Аспарагин синтетаза (АС) (EC 6.3.1.1 и 6.3.5.4 EC) катализирует АТФ-зависимую реакцию трансаминирования аспартата для синтеза аспарагина.

Реакция требует присутствие ионов магния и энергию гидролиза АТФ. Синтез аспарагина происходит при амидировании аспартата, используя либо глютамин или ионы аммония в качестве донора аминокислот [5]. Поэтому измерение активности АС оказалось чрезвычайно трудным из-за его относительно короткого периода полураспада в растительных клетках [6, 7] из-за наличия эндогенных природных ингибиторов [8] и относительно высокой активности цитоплазматических аспарагиназ [9] и глутаминсинтетаз [10], которые используют аспарагин и конкурируют за аналогичный субстрат [11].

Фермент L-аспарагиназа (ЕС 3.5.1.1) катализирует гидролиз аспарагина в аспарагиновую кислоту, который затем переассимилируется для биосинтеза других азотсодержащих соединений (Lea et al. 2007). Описаны два семейства аспарагиназ: бактериальные и растительные. Sodek et al. [12] показали наличие двух подвидов растительных аспарагиназ, различающихся по их зависимости от ионов калия. Выявлено, что калий-зависимые аспарагиназы более широко распространены в высших растениях [13].

Улучшение качества и устойчивости растений к биотическим стрессам необходимо для обеспечения продовольственной безопасности злаковых культур. Поэтому целью данной работы являлось исследование активности этих наиболее важных ферментов при адаптации растений к стрессовым условиям, как ржавчинные заболевания.

Объекты и методы исследований

Объекты исследований: устойчивый к желтой ржавчине сорт озимой пшеницы «Наз», и восприимчивые – «Саппо», «Александрия», «Окли», «Литтл Нот». Растения выращивали в теплице и опытные варианты инокулировали спорами возбудителя желтой ржавчины (*Puccinia striiformis f.sp. tritici*). Инокуляцию проводили смесью спор гриба с техническим тальком. Инфицированные и контрольные растения покрыли полиэтиленовой пленкой и инкубировали в холодной комнате при температуре 8°C в течение двух дней. После этого сняли пленку и оставили их на 12-14 дней в теплице при свете с температурой 20°C. Выращенные споры были собраны и сохранены в холодильнике с силикагелем для последующих экспериментов. Все анализы были проведены

на инокулированных (опытных) и неинокулированных (контрольных) листьях.

Методы экстрагирования белков. Для измерения активности аспарагин синтетазы листьев пшеницы были изменены и оптимизированы методы, описанные для люпина и гороха [14,15]. Ткани растений растирали с помощью азота и гомогенизировали буфером (4 мл/г), содержащим 100 мМ HEPES, pH 8,5, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ДТТ (DTT), 10% глицерина (объем/объем) и 67 мМ 2-меркаптоэтанола. Экстракт фильтровали через 2 слоя фильтра (miracloth), затем центрифугировали при 40000 об/мин в течение 20 мин при 4°C. Супернатант обрабатывали 2-меркаптоэтанолом (0,5 мкл/мл) перед осаждением сульфатом аммония до 42% насыщения. Белки осаждали в течение 30 минут с охлаждением на льду с перемешиванием, pH поддерживается на уровне 7,8. После центрифугирования при 20000 об/мин в течение 10 мин при 4°C, осадок пересуспендировали с 2 миллилитром буфера для экстракции. Концентрации белка были измерены в полученном осадке и в супернатанте. Экстракт обесоливали на колонке PD 10, промытом буфером для экстракции при температуре 4°C. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Брэдфорда [16].

Анализ активности аспарагин синтетазы. Буфер для определения активности аспарагин синтетазы содержал 10 мМ Gln, 30 мМ АТФ, 10 мМ Asp, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, 0,1 мМ ЭДТА и Heps 50 мМ pH 7,75 с 400 мкл обесоленного экстракта в общем объеме 500 мкл. Реакция проводилась при 30°C в течение 60 минут, а затем ее останавливали добавлением 100 мкл сульфосалициловой кислоты (200 мг/мл). Пробирки центрифугировали и определяли аспарагин в супернатанте. Был разработан высокоэффективный метод альтернативный ВЭЖХ для измерения аспарагина, воспроизведенного аспарагин синтетазой. Нами опробовано два метода: с использованием микро-титра для колориметрического обнаружения аспарагина с помощью спиртового раствора нингидрина – "Количественный колориметрический тест для L-аспарагина" [17] и с использованием ферментативного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Методы экстрагирования белков для измерения активности аспарагиназы. Свежие листья пшеницы (1 г) растирали с помощью

жидкого азота и гомогенизировали с охлажденным буфером для экстракции [20], содержащем Трис-НСІ буфер (50 мМ), 1 мМ ДТТ (DTT), 50 мМ КСІ, 10% глицерина (объем/объем), рН 7,3. Экстракт фильтровали и центрифугировали при 10000 об/мин в течение 20 минут при 2°C. Супернатант (2,5 мл) обессоливали на колонке PD-10 с Sephadex G-25 при 4°C. Элюаты с высоким содержанием белков были концентрированы в течение 2 часов, затем был проведен ферментный анализ [18, 19].

Анализ активности аспарагиназы. Активность L-аспарагиназы определяли с помощью L-аспарагиновой β -гидроксамата в качестве субстрата и метод адаптировали согласно Lanvers et al. (2002) [20], который основан на измерении реакции 8-оксихинолина с гидроксиламином, освобожденного от L-аспарагиновой β -гидроксамата, которая производит зеленый краситель индоксин. Стандартные смеси подготовлены с гидроксиламином гидрохлоридом в экстрагируемом буфере. Анализы проводились при температуре 37°C в течение 30 мин, реакция была остановлена с 250 мкл 24,5% (вес/объем) трихлоруксусной кислотой. После центрифугирования в течение 5 мин при 500 об/мин, 50 мкл реакционной смеси было добавлено к 200 мкл 8-оксихинолина в соотношении (1 объем 2% 8-оксихинолина в абсолютном этаноле + 3 объема натрия бикарбоната). Образцы инкубировали при 100°C в течение 1 мин, а после охлаждения до комнатной температуры, поглощение зеленого красителя индооксина измеряли при 710 нм с использованием микропланшетного ридера *SPECTRAmax* (Molecular Devices, Великобритания). В контрольных образцах вместо фермента использовали воду.

Результаты и их обсуждение

До настоящего времени изучение и измерение ферментативной активности аспарагин синтетазы (АС) в растительных тканях является проблематичным. Малое количество данных о методах определения активности этого фермента в растениях, которые имели ограниченный успех в связи с нестабильным характером фермента. Нами сделана попытка адаптировать имеющиеся методы анализа, описанные для люпина и гороха по Lima, Sodek (2003) и Romagni, Dayan (2000) для листьев и семян пшеницы путем модификации и оптимизации методов экстрагиро-

вания белка и измерения активностей аспарагин синтетазы.

Оптимизация методов выделения белков и измерение активности аспарагин синтетазы. Для поддержания лабильного фермента в активной, димеризованной конформации в процессе выделения белков нами были использованы защитные реагенты как глицерин и тиоловые соединения (Joy et al. 1983, Snapp и Vance 1986). Белки экстрагировали в буферах, как с включением глицерина, так и без него. Показано, что экстракты, содержащие 10% глицерина, показали в 3,5 раза выше активность АС, чем активность экстрактов без глицерина. Также были использованы различные концентрации глицерина в буфере: 10%, 15%, 20% и 25%.

Для осаждения белков проводились эксперименты с разными концентрациями сульфата аммония: 65%, 40%, 1,32% и 0,66% насыщения. Определена оптимальная концентрация - 42%, как в методике, описанной в статье Lima и Sodek (2003). Для очистки от эндогенных ингибиторов фермент АС обессоливали на колонке PD-10, с Sephadex G-25, которая была уравновешена с буфером без глицерина. Последующее концентрирование ферментного препарата было необходимо для получения высокой активности АС (Romagni и Dayan 2000). В нашей работе, при использовании *Centriprep Ultracel YM-30*, было потеряно большинство белков, поэтому в дальнейшем использовали вакуумные сушилки, и даже в таком случае, после длительного процесса концентрирования снижалась ферментативная активность. Поэтому концентрировали в течение 2 часов. Ферментативную реакцию останавливали кипячением, что сильно повлияло на активность фермента, поэтому реакцию в последующем терминировали сульфосалициловой кислотой.

Разработан колориметрический метод для измерения концентрации аспарагина, воспроизведенного аспарагин синтетазой. Этот высокоэффективный метод альтернативный ВЭЖХ, был основан на методике, описанной Sheng et al. (1993). Изменения были внесены в концентрации раствора нингидрина (0,05% или 0,1%) и количество белка, добавленного в реакционную смесь (100 мкл или 200 мкл экстракта). Сочетание 100 мкл белка и 0,05%-ного раствора нингидрина показали оптимальные результаты. Активность АС измерялась в день его получения; т.к. на следующий день

сохранялось только около 80% активности. В исследованиях Romagni и Dayan (2000) показано, что активность фермента АС зависит от концентрации АТФ, которая была оптимальной при концентрациях в диапазоне 3-10 мМ. Нами использованы разные концентрации АТФ, глутамина и аспартата (1-5 мМ Gln, 1.6-8 мМ Asp и 10-50 мМ АТФ), которые не выявили оптимальных результатов. Успешные результаты были достигнуты при изме-

рении активности АС листьях пшеницы, зараженных и незараженных желтой ржавчиной. Показано, что активность АС зараженных ржавчиной растений примерно в 1,5 раза выше, чем в контрольных, незараженных растениях. При этом активность фермента в незараженных растениях не была столь высокой, как в зараженных ржавчиной и восприимчивых растениях (рис. 1 и 2).

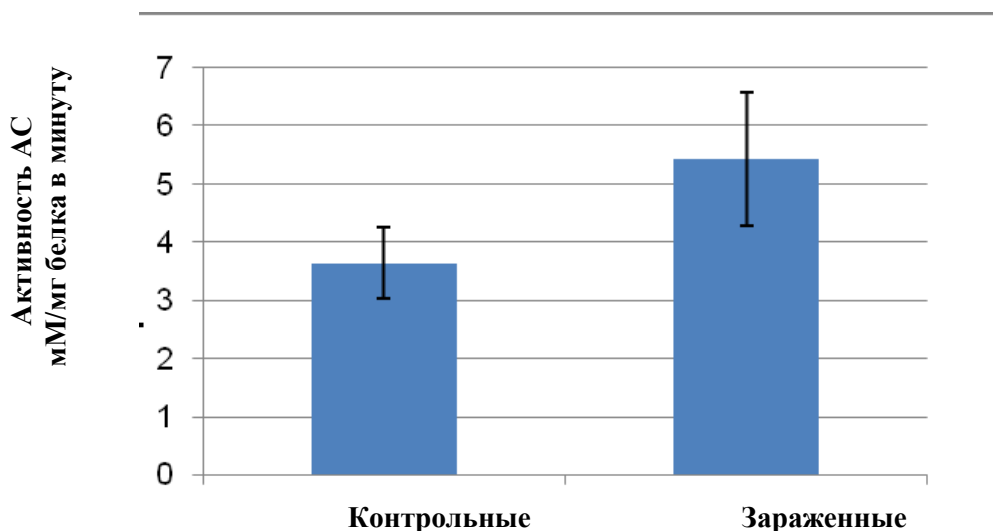


Рисунок 1 – Активность АС листьев пшеницы сорта Саппо в теплице

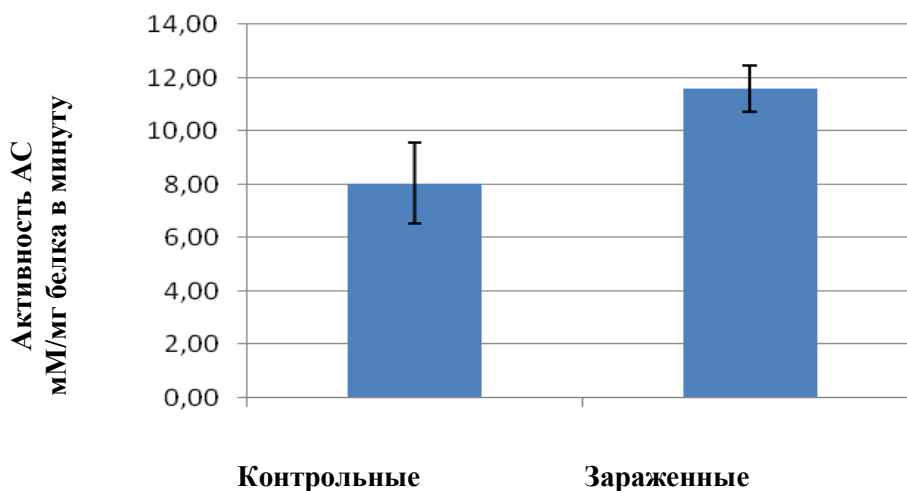


Рисунок 2 – Активность АС листьев пшеницы сортов Окли и Литтл Нот в поле

Измерение активности аспарагиназы. Была использована методика выделения белка калий-зависимых аспарагиназ и анализ фермента [21]. Эксперименты проводились с использованием того же буфера, как и для анализа аспарагин синтетазы, с глицерином и без глицерина. В буфере, содержащем глице-

рин, активность была в два раза больше, чем без глицерина. Поэтому для выделения белка из свежих листьев пшеницы был использован буфер, содержащий 10% глицерина, а для обессоливания буфер без глицерина, и образцы обессоливали с этим буфером для очистки на колонке PD-10 с Sephadex G-25. рН варьи-

ровали между 8,0 и 7,3. Для определения ферментативной активности с использованием L-аспарагиновой β -гидроксамата оптимальной рН явилось 7,3. Активность аспарагиназы в

экстрактах из зараженных листьев пшеницы была в 2 раза выше, чем в незараженных листьях (рис. 3 и 4).

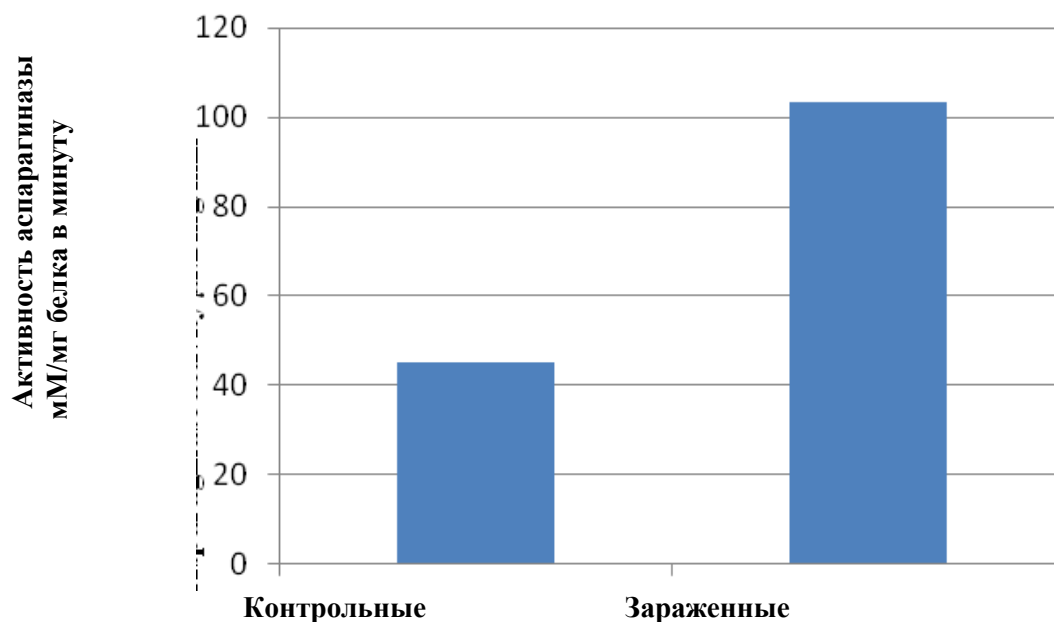


Рисунок 3 - Активность L-аспарагиназы листьев пшеницы сорта Окли, Литтл Нотт, контрольных и зараженных желтой ржавчиной (*Puccinia striiformis*) из полей.



Рисунок 4 - Листья пшеницы, зараженные желтой ржавчиной (*Puccinia striiformis*) в условиях теплицы (а) и поля (б)

Выводы

Известно, что при абиотических и биотических стрессах происходит интенсивное накопление аммония в клетках растений, и аспарагин-синтетазы могут использовать аммоний непосредственно в качестве субстрата. В этом исследовании был показан высокий уровень аспарагина в зараженных желтой ржавчиной (*Puccinia striiformis*) листьях пшеницы.

В наших исследованиях были оптимизированы методы выделения белков для замера активностей ферментов метаболизма аспартата. Были получены оптимальные ре-

зультаты для осаждения белков при использовании сульфата аммония в концентрации 42% и включении 10%-го глицерина. Выявлено, что активность АС в зараженных листьях пшеницы в 1,5 раза выше, чем у незараженных (контрольных) растений, а аспарагиназы – в более чем в 2 раза.

Из полученных результатов сделано предположение, что при стрессовых условиях ферменты метаболизма аспартата работают интенсивнее, поэтому активности АС, как и активность аспарагиназы, повышаются. Вероятно, что аспарагин играет важную роль в

адаптации растений к биотическим стрессовым условиям.

Благодарности

Данная работа была проведена в лаборатории отдела растительных наук (Plant Science Department) в рамках проекта научной стажировки «Активности ферментов, связанных с синтезом аспартата пшеницы при биотических и абиотических стрессовых условиях» в Ротамстедском Исследовательском Центре (Rothamsted Research, Harpenden, Herts AL5 2JQ). Автор благодарен Найджелу Холфорд (Nigel Halford) и Нире Муттукумару (Nira Muttucumar) за помощь в выполнении данного проекта и Джону Вест (John West) за предоставление образцов спор желтой ржавчины и зараженных растений из полевых питомников.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рябушкина Н.А. Состояние проблемы устойчивости растений к грибковым патогенам на примере представителей рода *VITIS* // «Биотехнология. Теория и практика», (ISSN 1028-9399) – 2013. - №1. – С. 1-12.
2. Campbell, N.A. and Reece, J.B. *Biology* / (7th ed).- San Francisco: Benjamin Cummings, 2005. – 336 p.
3. Lea P.J., Sodek L., Parry M.A.J., Shewry P.R., Halford N.G. Asparagine in plants. // *Ann Appl Biol*.150. – 2007 – P.1-26.
4. Azevedo R.A., Lancien M., Lea P.J. The aspartic acid metabolic pathway, an exciting and essential pathway in plants. // *Amino Acids*, 30. – 2006 – P.143-162.
5. Larsen T., *et al.*, Three-dimensional structure of *Escherichia coli* asparagine synthetase B. A short journey from substrate to product // *Biochemistry* 38. -1999- P.16146-16157.
6. Richards N.G., Schuster S.M. Mechanistic issues in asparagine synthetase catalysis. // *In Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology: Amino Acid Metabolism Part A – Wiley: New York. – 1998.- P.145-198.*
7. Ireland R.J., Lea P.J. The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine, and aspartate metabolism. // *In Plant Amino Acids: biochemistry and biotechnology; Dekker: New York. – 1999. – P.78-84.*
8. Rognes S.E. Anion regulation of lupine asparagine synthetase: Chloride activation of the glutamine-utilizing reactions. // *Phytochemistry*, 1980.- Vol.19.- P. 2287-2293.
9. Hughes C.A., Beard H.S., Matthews B.F. Molecular cloning and expression of two cDNAs encoding asparagine synthetase in soybean. // *Plant Mol. Biol.*- 1997.- Vol. 33.- P. 301-311.
10. Sieciechowicz K.A., Joy K.W., Ireland R.J. The metabolism of asparagine in plants. // *Phytochemistry*.- 1988.- Vol. 27.- P. 663-671.
11. Bergmeyer H.U., Bernt E., Mollering H., Pfeleiderer G. L-Aspartate and L-Asparagine. // *Methods of enzymatic analysis*.- 1974.- Vol.4.- P.1696-1700.
12. Sodek L., Lea P.J., Mifflin B.J. Distribution and properties of a potassium dependent asparaginase EC 3.5.1.1 isolated from developing seeds of *Pisum sativum* cultivar Feltham – First and other plants. // *Plant Physiol*. 1980. – Vol.65. - P. 22-26.
13. Credali A., Diaz-Quintana A., Garcia-Calderon M., Miguel A. De la Rosa, Marquez A.J., Vega J.M., Structural analysis of K⁺ dependent in L-Asparaginases from *Lotus japonicus*. // *Planta*.- 2010.- P. 1393-1400. DOI 10. 1007/s00425-011-1393-1400.
14. Romagni J.G., Dayan F.E. Measuring Asparagine Synthetase Activity in Crude Plant Extracts. // *J. Agric. Food Chem.* - 2000.- Vol.48.- P.1692-1696.
15. Lima, J.D., Sodek, L. N-stress alters aspartate and asparagine levels of xylem sap in soybean. // *Plant science*.- 2003.- Vol.165.- P.649-656.
16. 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.- Vol.72.- P. 248-254.
17. Sheng S., Kraft J.J., Schuster S.M. “A Specific Quantitative Colorimetric Assay for L-Asparagine”. // *Analytical Biochemistry*.- 1993.- Vol. 211.- P.242-249.
18. Sodek L., Lea J.P. Asparaginase from the testa of developing Lupin and Pea testa seeds. // *Phytochemistry*.- 1993.- Vol.34.- P.51-56.
19. Luanne, Bruneau., Ralph, Chapman., Frederic, Marsolais. Co-occurrence of both L-asparaginase subtypes in *Arabidopsis*: At3g16150 encodes a K⁺-dependent L-asparaginase. // *Planta*.- 2006. Vol.224. P.668-679.
20. Lanvers C., Pinheiro J.P.V., Hempel G., Wuerthwein, Boos G.J. Analytical validation of a microplate reader-based method for the therapeutic drug monitoring of L- asparaginase in human serum. // *Anal. Biochem*.- 2002.- Vol.309.- P.117-126.
21. Sodek L., Lea J.P. Asparaginase from the testa of developing Lupin and Pea testa seeds. // *Phytochemistry* 1993.- Vol.34.- P.51-56.
22. Oaks A., Ross D.W. Asparagine synthetase in *Zea mays*. // *Canadian Journal of Botany*.- 1984.- Vol.62.- P.68-73.