

ЭКСПРЕССИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ОКСИДОРЕДУКТАЗ И ЭСТЕРАЗ В ТКАНЯХ СЕМЯН И ЛИСТЬЕВ *GINKGO BILOBA*

Л.Ф. Дьяченко, Т.Г. Алексеева, В.Н. Тоцкий, В.А. Топиков

Каф. генетики і молекулярної біології, біологічний факультет,
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова
65026, Одеса, вул. Дворянська, 2

Для листування: 65059, Одеса, вул. Краснова, 11а, Дьяченко Л.Ф.

Моб. Дьяченко – 0964209125, моб. Алексеевой – 0661337852

E-mail: diachenkolf@mail.ru, tatyana_501_80@mail.ru

*Изучены электрофоретические спектры множественных молекулярных форм пероксидазы (КФ 1.11.1.7), супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) и эстераз (КФ 3.1.1) эндосперма (мегагаметофит) семян и листьев Ginkgo biloba L. Установлены достоверные различия в соотношении (долях) и экспрессивности отдельных изоформ исследованных ферментов в гаплоидной и диплоидной тканях гинкго. Сложность спектра, оцениваемая по показателю внутреннего разнообразия (K_D), для пероксидазы тканей эндосперма в несколько раз ниже, чем для тканей листьев. K_D эстераз эндоспермов семян и листьев растений закрытого грунта практически не различаются. В листьях растений открытого грунта данный показатель вдвое больше, что свидетельствует о разной значимости генетических и паратипических факторов для экспрессии исследуемых эстераз растений при разных условиях обитания. Кратковременное воздействие на листья гинкго *in vitro* повышенной или пониженной температуры не сопровождается видимыми изменениями экспрессивности пероксидазы или супероксиддисмутазы.*

Ключевые слова: Ginkgo biloba, множественные формы ферментов, гаплоидная и диплоидная ткани

В последнее время наблюдается повышение интереса исследователей разных специальностей к *Ginkgo biloba* L. – современнику динозавров, реликтовому растению и единственному представителю своего семейства Ginkgoaceae Engl. Главной причиной повышенного внимания к гинкго следует считать наличие в листьях и плодах гинкго биологически активных веществ, нашедших практическое применение в фармакотерапии некоторых сосудистых заболеваний (Singh et al., 2008). Листья гинкго обладают высокой инсектицидной активностью (Gertz et al., 2004). Кроме того, гинкго является великолепным озеленителем для жилых массивов и желанным компонентом парков – он практически не поражается вирусными и грибными заболеваниями, устойчив к засухе и загрязнению воздуха (Івченко и др., 2006; Wang et al., 2006; Шлапак и др., 2008).

Высокая адаптивность гинкго, позволившая этому растению пережить катастрофические изменения климата Земли за многие миллионы лет существования, объясняет большой интерес исследователей к этому виду. В недавней статье В. Ф. Семихатова и др. (2006) изложены предполагаемые причины выживаемости гинкго в меняющихся климатических условиях – относительно высокая эволюционная продвинутость гинкго, оптимизация соотношения аминокислотного состава зародыша и эндосперма и высокое содержание пролина как фонда быстрого реагирования на стрессовые условия. Среди других

предполагаемых механизмов стрессоустойчивости гинкго – наличие эффективных белков защиты, в частности противобактериальных и противогрибных, исследованию которых уделяют большое внимание (Huang et al., 2000; Selitrennikoff, 2001).

Должен существовать и генетический механизм адаптации, опосредованный через экспрессивность ферментов, выполняющих в клетке анаболические, энергетические и защитные функции. Существует мнение, что сохранность семян гинкго при низкой температуре (+4 °C) в определенной степени зависит от активности аскорбатпероксидазы и глутатионпероксидазы [Sawano et al., 2007]. Установлено, что эти антиоксидантные ферменты гинкго сами по себе не способны противостоять оксидативному стрессу в тканях семян при их длительном хранении. Повидимому, в тканях растений существует сложная генетически детерминированная система белковой защиты от оксидативного стресса. Недавно было сообщено о выделении нового антиоксидантного белка из альбумина семян гинкго (Tommasi et al., 2006). Появляются сообщения об идентификации и клонировании все новых генов, продукты которых играют роль в успешной адаптации гинкго к внешним условиям (Shen et al., 2005, 2008; Huang et al., 2010).

В защитную ферментативную антиоксидантную систему клетки входит ряд ферментных систем, в том числе пероксидаз (Prx), супероксиддисмутаз (Sod) и других (Андреева, 1988; Grene,

2002). На действие факторов внешней среды ген-энзимные системы клетки реагируют либо изменением набора экспрессирующихся изоформ ферментов, либо изменением уровня их экспрессивности (Андреева, 1988; Breda et al., 1993; Dowd et al., 2000). Пероксидаза – широко распространенный фермент, участвующий в механизмах адаптации растений к физическим и биологическим воздействиям. Супероксиддисмутаза вместе с другими компонентами антиоксидантной системы позволяет клетке избежать тяжелых последствий токсического действия свободных супероксидных радикалов – разрывов цепей ДНК, повреждения мембран клеток, инактивации ферментов и т.п. (Поберезкина и др., 1989). Эстеразы (Est) – высокополиморфная группа ферментов, контролирующихся большим числом генов и проявляющих широкую субстратную специфичность (Кудрякова, 1982; Глазко и др., 1993). Несмотря на важное значение упомянутых ген-энзимных систем в адаптации растений и тот очевидный факт, что гинкго как вид в этом отношении привлекает большое внимание, в доступной литературе недостаточно информации о содержании и экспрессивности ряда ферментов, в том числе оксидоредуктаз и эстераз в тканях гинкго, а также их реакции на температурный стресс. Особо внимание привлекает наличие в гинкго мегагаметофитов, состоящих из гаплоидной ткани. В связи с этим целью данной работы явилось изучение электрофоретических спектров пероксидаз, супероксиддисмутаз и эстераз в гаплоидной и диплоидной тканях гинкго - в семенах и листьях растений.

Материал и методы исследования. В данной работе использовали семена четырех женских деревьев (по 10 семян с каждого). Деревья обозначили как I, II, III и IV, их возраст примерно 50 лет. Опавшие семена собрали в конце февраля 2010 г., для анализа брали гаплоидный эндосперм. Часть семян в условиях лаборатории поместили в грунт, из них выросли деревца высотой 10 – 12 см с 5 – 6 листьями. Листья для анализа ферментов брали с этих растений, а также с вышеупомянутых деревьев. Для определения реакции ферментов на температурный стресс лист разрезали на три части, каждую из которых помещали на влажную фильтровальную бумагу в чашках Петри: одну чашку оставляли при комнатной температуре (контроль), вторую при +2 °С на 3 часа, третью – при +40 °С на такой же срок, по истечении которого из тканей листьев проводили экстракцию ферментов.

Из тканей эндосперма ферменты экстрагировали буфером (0,05 М трис-НСl, рН 6,8, 0,01 % дитиотреитол, 0,1 % аскорбиновая кислота, 0,1 % ЭДТА, 1 % Тритон X-100, 15 % сахароза) в соот-

ношении ткань: буфер 1 : 1, из тканей листьев - в соотношении 1:2 (Топтиков и др., 2002). Электрофоретическое разделение изоформ ферментов проводили в 7,5 % полиакриламидном геле [Davis, 1964]. При разделении пероксидаз на гель наносили по 10 мкл экстракта (10 мкг общего белка), для супероксиддисмутаза и эстераз – по 20 мкл (20 мкг белка). Пероксидазы визуализировали с помощью бензидина (Гааль и др., 1982), супероксиддисмутаза – с нитротетразолием синим (Бернстон, 1965), эстеразы – в присутствии α - и β -нафтилацетата с помощью диазолия синего С (Корочкин и др., 1977). Анализ электрофограмм осуществляли в соответствии с компьютерной программой АнаИС, с помощью которой для каждой изоформы определяли ее удельный вес в общем спектре данного фермента (%), а также площадь и интенсивность окрашивания (в условных единицах - пикселях) соответствующих полос. Статистическую обработку данных проводили с помощью компьютерного пакета математического анализа данных Excel. Оценку внутреннего разнообразия спектров проводили по формуле (Топтиков и др., 2010):

$$K_D = \frac{\log_2 N}{\sum p_i^2},$$

где K_D – показатель разнообразия спектра, N – количество фракций в спектре, p_i – удельный вес (относительная доля в спектре, %) каждой исследуемой фракции.

Результаты исследований и их обсуждение.

В тканях гаплоидного эндосперма семян гинкго из трех исследованных ферментов наиболее активной оказалась супероксиддисмутаза. Электрофоретически выявлено 12 изоформ этого фермента (табл. 1). Из них изоформа Sod 9 имеет наибольший удельный вес в спектре и варьирует в пределах 11 – 16 %. Хотя электрофоретические спектры Sod семян визуально почти идентичны, математический анализ показал, что в общем спектре процентное содержание отдельных изоформ фермента (их относительная доля или удельный вес) достоверно различается при анализе образцов, взятых от разных деревьев. Удельный вес отдельных изоформ супероксиддисмутаза в эндосперме растения I отличается от такового остальных растений по содержанию Sod 3, 8, 10, 11 от дерева II; относительными долями Sod 1, 3, 6, 10, 11 от дерева III и удельным весом фракций Sod 1, 3, 8, 9 от дерева IV.

Анализ уровней экспрессивности изоформ супероксиддисмутаза показал, что наибольший полиморфизм по этому признаку наблюдается в эндосперме семян, собранных с дерева IV (табл. 1). В целом экспрессивность восьми из двенадцати форм супероксиддисмутаза в эндосперме семян этого дерева достоверно отличается от экспрессивности тех же форм в эндосперме семян дерева I. Суммар-

ная экспрессивность фермента в семенах деревьев I и II практически одинакова, а в семенах деревьев

III и IV соответственно на 10 % и 18 % меньше, чем у предыдущих.

Таблица 1

Характеристика изоформ супероксиддисмутазы эндосперма семян разных деревьев гинкго

Эндосперм растения, №	Изоформы												K _D
	Sod 1	Sod 2	Sod 3	Sod 4	Sod 5	Sod 6	Sod 7	Sod 8	Sod 9	Sod 10	Sod 11	Sod 12	
	Средние величины долей (%)												
I	3,5±0,2	6,3±0,2	7,5±0,2	7,1±0,21	6,7±0,1	7,1±0,1	8,3±0,2	10,2±0,4	14,8±0,6	10,7±0,2	9,8±0,4	8,0±0,8	38,5±0,3
II	4,1±0,3	6,3±0,2	8,6**±0,2	6,8±0,1	6,9±0,2	7,0±0,3	7,9±0,2	8,3**±0,3	13,9±0,8	9,8*±0,3	10,7*±0,2	9,8±0,5	39,2±0,5
III	4,2*±0,2	6,0±0,2	8,9**±0,2	7,5±0,3	7,0±0,2	6,5*±0,2	8,5±0,3	9,8±0,2	16,4±0,4	9,8*±0,3	8,2*±0,2	7,2±0,4	38,1±0,3
IV	4,9*±0,2	6,8±0,4	9,6*±0,6	7,4±0,3	7,2±0,3	6,8±0,3	8,0±0,3	8,6*±0,3	11,6*±0,7	10,3±0,5	9,4±0,7	9,3±1,7	39,2±0,6
	Экспрессивность изоформ (пиксели)												Сумма
I	32,5±2,4	58,7±3,1	69,4±2,6	65,3±2,3	62,3±2,4	65,2±2,5	76,9±3,58	93,4±2,8	136,8±6,4	98,9±3,5	90,6±3,7	73,9±7,8	940,8±18,1
II	39,2±2,6	60,7±2,9	84,3*±4,3	66,1±2,4	66,5±2,9	67,5±3,5	76,7±3,2	81,8±5,8	136,5±10,5	95,1±3,1	104,6±5,3	96,1±7,18	957,3±42,7
III	35,9±2,1	50,6*±1,7	75,8±2,7	62,8±2,4	59,4±1,2	54,7*±1,3	72,2±2,6	83,2*±1,9	139,1±4,3	83,2*±3,3	69,2**±2,5	61,2±4,2	852,1*±15,7
IV	37,5±1,6	51,8±2,9	73,0±3,8	56,8*±1,3	55,7**±1,9	52,4**±1,9	61,4**±3,1	66,3**±3,3	88,3**±4,3	79,0**±3,6	73,7*±6,8	74,4±16,2	777,7**±21,8

Примечание здесь и далее: * - : n = 10 семян каждого дерева, * - P ≤ 0,05, ** - P ≤ 0,005 при сравнении с объектом I

В спектре эстераз эндосперма семян гинкго в условиях наших опытов выявлялось 7 изоформ с Rf 0,08 – 0,50. По процентному содержанию этих изоформ семена разных деревьев гинкго довольно схожи, однако имеют место достоверные различия между средними величинами долей отдельных изоформ (табл. 2). Сказанное касается изоформ Est 3 и 5 из семян дерева II; - Est 1, 4, 5, 7 (дерево III) и Est 1, 6, 7 из семян дерева IV при

сравнении их долей с долями эстераз эндосперма семян, собранных с дерева I.

Экспрессивность отдельных изоформ эстераз семян разных деревьев различается меньше, чем их удельный вес в спектре (табл. 2). Достоверные различия экспрессивности наблюдаются для одной – двух изоформ и существенно не влияют на суммарную экспрессивность этого фермента в семенах.

Таблица 2

Характеристика изоформ эстераз эндосперма семян разных деревьев гинкго

Эндосперм растения, №	Изоформы							K _D
	Est 1	Est 2	Est 3	Est 4	Est 5	Est 6	Est 7	
	Средние величины долей (%)							
I	9,2 ± 0,5	14,6 ± 0,7	16,7 ± 1,0	12,9 ± 0,6	17,9 ± 1,8	12,7 ± 0,7	15,9 ± 1,5	18,1 ± 0,3
II	9,9 ± 0,7	15,6 ± 0,9	19,7* ± 1,1	13,2 ± 0,6	10,6** ± 0,8	13,9 ± 1,5	17,6 ± 1,2	17,9 ± 0,7
III	12,0** ± 0,5	13,4 ± 0,7	18,9 ± 0,9	15,2* ± 0,6	15,6* ± 0,8	13,7 ± 0,2	11,2* ± 0,9	18, ± 0,1
IV	10,8** ± 0,9	13,9 ± 0,9	16,2 ± 0,7	13,0 ± 0,7	20,3 ± 2,4	15,0* ± 0,6	10,0* ± 0,9	18,1 ± 0,7
	Экспрессивность изоформ (пиксели)							Сумма
I	29,2 ± 4,7	46,0 ± 6,7	51,1 ± 6,1	41,9 ± 7,8	56,9 ± 10,2	40,8 ± 7,4	50,4 ± 8,3	316,4 ± 47,7
II	28,1 ± 1,9	44,4 ± 2,4	56,3 ± 3,3	38,0 ± 2,5	30,6* ± 3,0	38,1 ± 4,3	50,7 ± 3,9	286,3 ± 11,1
III	45,5* ± 3,6	51,4 ± 4,9	71,9* ± 6,0	56,5 ± 3,0	57,7 ± 2,6	51,8 ± 3,1	41,6 ± 2,6	376,5 ± 19,6
IV	44,8* ± 4,0	57,9 ± 4,1	67,4 ± 4,3	54,0 ± 4,1	83,4 ± 9,9	62,1* ± 3,1	44,9 ± 3,2	414,4 ± 15,0

Спектр пероксидазы (P_{гх}) тканей эндосперма гинкго состоит из двух изоформ в случае семян деревьев II и III и трех изоформ в случае остальных растений (табл. 3). В связи с этим процентное содержание отдельных изоформ в спектре P_{гх} семян деревьев II и III достоверно отличается от аналогичных показателей семян деревьев I и IV. Суммарная экспрессивность пероксидазы семян у трех исследованных растений практически одинакова, в эндосперме семян дерева I - на 70 - 75 % выше. Сказанное касается и экспрессивности отдельных изоформ фермента.

Пероксидаза из тканей листьев гинкго разделяется на 7 фракций с относительной подвижностью Rf 0,25 – 0,76 (табл. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что удельный вес отдельных изоформ в общем спектре пероксидазы листьев зависит от условий выращивания растений. Так, процентное содержание четырех изоформ (P_{гх} 4 – 7) разное в листьях растений, вы-

ращенных в лабораторных и природных условиях обитания. В листьях гинкго открытого грунта значительно выше доля электрофоретически медленно движущейся изоформы P_{гх} 7 (Rf 0,25) – более, чем в 4 раза. Доли быстроподвижных форм пероксидазы (P_{гх} 1 – 3) одинаковы в тканях листьев обоих исследованных вариантов.

Таблица 3

Характеристика изоформ пероксидазы эндосперма семян разных деревьев гинкго

Растения	Изоформы			K _D
	P _{гх} 1	P _{гх} 2	P _{гх} 3	
	Средние величины долей			
I	39,1 ± 4,8	24,7 ± 4,1	36,2 ± 2,3	4,0 ± 0, 2
II	0	54,5** ± 2,1	45,4** ± 2,1	2,0 ± 0,0
III	0	54,0** ± 0,9	46,0** ± 0,9	2,0 ± 0,0
IV	28,8 ± 6,4	33,8 ± 4,5	37,3 ± 2,6	3,7 ± 0,4
	Экспрессивность изоформ (пиксели)			Сумма
I	183,9 ± 22,8	101,8 ± 5,3	162,6 ± 15,9	448,4 ± 26,9
II	0	141,2** ± 7,4	118,6* ± 7,7	259,8** ± 11,5
III	0	132,7* ± 4,9	113,6** ± 5,7	246,3** ± 9,9
IV	78,1** ± 18,6	81,6 ± 8,8	92,5** ± 7,4	252,2** ± 19,8

Характеристика изоформ пероксидазы листьев растений гинкго в норме и после температурного стресса

Грунт, температура	Изоформы							K _D
	Pgx 1	Pgx 2	Pgx 3	Pgx 4	Pgx 5	Pgx 6	Pgx 7	
	Средние величины долей (%)							
З-К +20 °С	16,5 ± 1,9	22,1 ± 1,3	13,1 ± 0,9	12,5 ± 0,5	16,1 ± 0,7	15,2 ± 0,9	4,4 ± 2,0	16,4 ± 0,8
З-Х +2 °С	15,1 ± 2,1	22,3 ± 1,7	14,5 ± 1,0	11,9 ± 0,7	17,9 ± 1,1	13,6 ± 0,9	4,6 ± 2,1	16,2 ± 1,0
З-Т +40 °С	16,1 ± 2,3	22,0 ± 0,9	13,2 ± 1,3	11,6 ± 0,3	17,9 ± 1,4	14,6 ± 1,2	4,6 ± 2,1	16,2 ± 1,0
О-К +20 °С	19,4 ± 0,5	19,0 ± 0,6	12,4 ± 0,4	8,5** ± 0,4	12,9** ± 0,7	8,6** ± 0,7	18,7** ± 1,0	17,9 ± 0,2
О-Х +2 °С	19,1 ± 0,8	19,2 ± 0,5	11,7* ± 0,8	8,4** ± 0,6	12,9** ± 0,8	9,3** ± 0,9	19,4** ± 1,4	17,5 ± 0,3
О-Т +40 °С	19,2 ± 1,0	19,8 ± 0,7	13,3 ± 0,8	9,4* ± 0,6	12,7* ± 1,3	8,6** ± 0,4	17,1** ± 1,5	17,7 ± 0,3
	Средние величины экспрессивности							Сумма
З-К +20 °С	97,2 ± 7,3	108,0 ± 8,4	64,5 ± 5,8	61,2 ± 3,2	79,2 ± 5,6	74,2 ± 4,7	22,5 ± 10,1	489,0 ± 19,4
З-Х +2 °С	77,2 ± 7,0	118,3 ± 13,1	78,5 ± 11,4	62,9 ± 5,6	94,5 ± 8,6	71,0 ± 5,1	25,5 ± 11,5	528,0 ± 39,6
З-Т +40 °С	79,7 ± 8,3	111,9 ± 7,2	67,6 ± 7,7	59,3 ± 3,4	92,2 ± 11,0	73,2 ± 4,7	23,9 ± 10,9	507,8 ± 21,2
О-К +20 °С	118,4** ± 9,6	117,4 ± 12,0	76,0 ± 7,6	53,3 ± 6,5	80,26 ± 9,9	55,5** ± 3,2	112,4** ± 7,1	613,3* ± 51,5
О-Х +2 °С	114,9** ± 9,6	114,9 ± 8,9	70,1 ± 7,4	50,63 ± 5,6	78,8 ± 10,4	54,5* ± 3,7	115,3** ± 10,6	599,3 ± 44,7
О-Т +40 °С	115,3* ± 13,0	117,1 ± 9,2	79,6 ± 9,0	57,1 ± 7,3	77,4 ± 12,7	50,8** ± 4,5	98,9** ± 6,9	596,3 ± 49,2

Примечание: З-К- закрытый грунт-контроль, Т- тепловой стресс, Х- холодовой стресс, О- открытый грунт, n = 10 в каждом варианте, * - P ≤ 0,05, ** - P ≤ 0,005 при сравнении соответствующих вариантов открытого и закрытого грунта

Экспрессивность отдельных изоформ пероксидазы в листьях растений закрытого и открытого грунта тоже разная – достоверные различия этих показателей наблюдаются у трех из семи изоформ фермента (табл. 4). В листьях растений открытого грунта существенно повышена экспрессивность Pgx 1 и 7, в результате чего суммарная экспрессивность этого фермента в листьях растений открытого грунта по сравнению с листьями комнатных растений увеличена на 16 %.

При электрофорезе эстераз тканей листьев гинкго (рис. 1г) выявлено семь изоформ, процентное содержание которых в тканях растений открытого и закрытого грунта не отличается. В то же время интенсивность экспрессии отдельных изоформ у этих растений не одинакова. В диплоидной ткани листьев растений открытого

грунта во всех образцах наиболее активно экспрессируются Est 3 и 4. Достоверного различия между суммарной экспрессивностью эстераз у исследуемых растений не наблюдается (183 и 246 усл. ед. в листьях растений закрытого и открытого грунта соответственно (при P ≥ 0,05).

Различия между исследуемыми характеристиками ферментов в листьях растений закрытого и открытого грунта может быть вызвано разной степенью варибельности факторов внешней среды в этих случаях. В лаборатории условия произрастания растений были более стабильными и благоприятными, что способствовало более полному проявлению генотипического потенциала растений и уменьшению неблагоприятных паратипических влияний

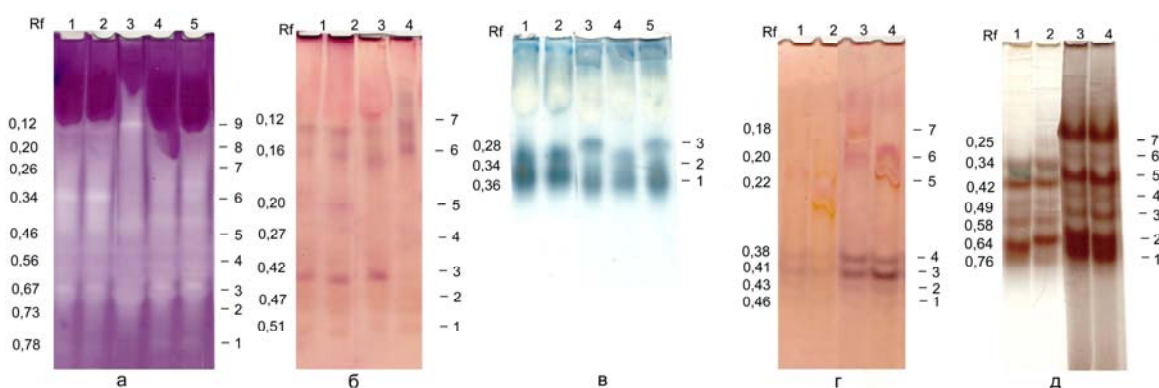


Рис. 1. Электрофореграммы ферментов тканей гинкго. Эндосперм семян: а – супероксиддисмутаза; б – эстераза; в – пероксидаза; 1, 2 – дерево III, 3 – 5 – дерево IV. Листья: г – эстераза; д – пероксидаза; 1, 2 – закрытый грунт, 3 – 4 – открытый грунт

электрофореграммы исследуемых ферментов из тканей гаплоидного эндосперма и диплоидных листьев свидетельствуют о неоднозначных изменениях состава изоформ и их экспрессивности (рис. 1). В листьях гинкго (диплоидная ткань) экспрессивность супероксиддисмутазы

оказалась настолько низкой, что ее не удалось определить электрофоретически. В противовес этому пероксидаза более сильно (примерно вдвое) экспрессируется в листовой ткани по сравнению с тканью гаплоидного эндосперма. Кроме того, в тканях некоторых листьев расте-

ний закрытого грунта отсутствует высокомолекулярная форма Prx 7, тогда как в тканях исследованных листьев открытого грунта эта форма всегда присутствовала (рис. 1д).

О существенном различии экспрессии ферментов в исследуемых тканях свидетельствует и сложность спектра ферментов, оцениваемая по показателю внутреннего разнообразия K_D . Упомянутый показатель отражает уровень контроля клетки над экспрессией исследуемого фермента. Значения K_D для пероксидазы в тканях эндосперма (4,0 – 2,0) в несколько раз ниже, чем в тканях листьев (16,2 – 17,9), что можно связать с усложнением генетического аппарата при переходе клеток в диплоидное состояние. При этом можно отметить существенное варьирование значений показателя K_D пероксидазы эндосперма семян от разных деревьев (табл. 3).

При сравнении K_D спектров эстераз следует отметить, что этот показатель одинаков в эндоспермах семян исследованных растений и в листьях растений закрытого грунта. В листьях растений открытого грунта данный показатель вдвое больше ($K_D = 35,1$), что свидетельствует о различиях систем генетического и эпигенетического контроля экспрессии исследуемых эстераз у растений при разных условиях их обитания.

Из представленных на рис 1б и 1г электрофореграмм видно, что хотя в гаплоидной ткани эндосперма и в диплоидной ткани листьев гинкго имеется по 7 изоформ эстеразы, в подавляющем большинстве они являются разными по электрофоретической подвижности формами. В листовой ткани отсутствуют некоторые медленно- и быстроподвижные формы эстераз, присутствующие в тканях эндосперма, т.е. четко прослеживается экспрессия разных изоформ фермента в гаплоидной и диплоидной тканях. Существенные различия по количеству и относительной подвижности наблюдаются также при сравнении в тех же тканях изоформ пероксидазы (рис. 1в, 1д). В листовой ткани дополнительно обнаруживаются 4-5 быстроподвижных форм этого фермента, что, вероятнее всего, обусловлено хлоропластами и содержащейся в них пероксидазы.

Наблюдаемые различия могут быть обусловлены спецификой ткани и связанной с нею дифференциальной активностью генов, так и различиями в плоидности исследуемых тканей. Так, анализ экспрессии 33 пероксидазных генов *A. thaliana* показал, что только часть из них активно экспрессируется во всех органах растения, тогда как некоторые «работают» только в определенных органах (Welinder et al., 2002). Показано также, что нет прямой связи между уровнем экспрессии генов пероксидазы и количеством белка в тканях (Dunand et al., 2002). Однозначного от-

вета об интенсивности синтеза белков в тканях разной плоидности нет. Так, имеются данные о различной интенсивности метаболизма и разной экспрессивности белков в гаплоидной и диплоидной тканях растений (Gomez et al., 2009). По данным других авторов, гаплоидные и аутодиплоидные ткани кукурузы мало отличаются количественным или качественным составом белков, хотя в ряде случаев при диплоидизации появляются новые белки, в том числе и новые изоформы эстеразы (Язловицкая и др., 1993; Jazlovys'tka et al., 1997).

Учитывая высокую адаптивную способность гинкго и то, что пероксидаза является одним из основных антистрессовых ферментов, интересно было проверить реакцию пероксидазы листьев этого растения на температурный стресс. На рис. 2 представлены электрофореграммы множественных форм пероксидазы из тканей листьев после кратковременного воздействия (3 часа) на них *in vitro* низкой (+2 °C) и высокой (+40 °C) температуры. Видно, что температурный стресс не вызывает качественных изменений спектра пероксидазы листьев, т.е. появления новых или исчезновения старых изоформ. Данные, представленные в табл. 4, свидетельствуют, что кратковременный температурный стресс не приводит и к количественным изменениям спектра этого фермента в листьях гинкго. Супероксиддисмутаза листьев при понижении или повышении температуры остается такой же малоактивной, как и в контроле.

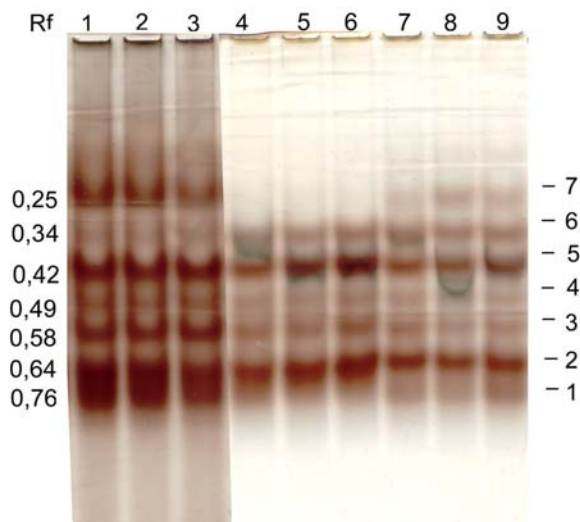


Рис. 2. Электрофореграммы пероксидазы листьев гинкго после температурного стресса. 1 - 3 – открытый грунт, 4 – 9 – закрытый грунт, 1, 4, 7 – контроль, 2, 5, 8 - +2 °C, 3, 6, 9 - +40 °C

По данным литературы стрессовые белки растений начинают активно синтезироваться уже через 3 – 5 мин. после начала воздействия пониженной или повышенной температуры. Хотя Prx

и Sod включены в состав стрессовых белков (Савич, 1989; Колесниченко и др., 2003; Косаковская, 2008), мы не склонны отводить им существенную роль при действии экстремальных факторов *in vitro* на изолированные органы растений. В то же время наблюдается значительное различие величин долей и экспрессивности Prx и эстераз в листьях растений открытого и закрытого грунта, что говорит о зависимости экспрессивности этих ферментов листьев от условий произрастания растений.

Таким образом, проведенные исследования показали, что имеются достоверные различия в соотношении и экспрессивности отдельных изоформ пероксидазы, супероксиддисмутазы и эстераз в гаплоидной ткани мегагаметофита и диплоидной ткани листьев гинкго. У гаплоидов проявляются как доминантные, так и рецессивные гены соответствующих диплоидных форм вследствие отсутствия альтернативных аллелей. Супероксиддисмутазы проявляет довольно слабую экспрессивность в тканях листьев по сравнению с тканями эндосперма. К подобному заключению пришли и другие авторы, выявившие в экстрактах листьев гинкго высокую пероксидазную активность по сравнению с другими ферментами (Park, 2006). Кратковременное воздействие на листья гинкго *in vitro* повышенной или пониженной температуры не сопровождается видимыми изменениями экспрессивности пероксидазы или супероксиддисмутазы, что, как правило, характерно для покрытосеменных растений. Значительно большие различия исследуемых показателей выявлены в листьях растений открытого и закрытого грунта.

Список литературы:

1. Андреева В. А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений. — М.: Наука, 1988. — 128 с.
2. Бернстон М. Гистохимия ферментов. — М.: Мир, 1965. — 455 с.
3. Гааль Э., Медьеша Г., Верецкеи Л. Э. Электрофорез в разделении биологических молекул. — М.: Мир, 1982. — 448 с.
4. Глазко В. И., Созинов И. А. Генетика изоферментов животных и растений. — Киев : Урожай, 1993. — 528 с.
5. Івченко А. І., Пацура І. М., Мельник А. С. Акліматизація деревних інтродуцентів та можливість впровадження їх в озеленення та лісове господарство // Лісове госп., лісова, паперова і деревообробна пром-вість. — 2006. — Вып. 32. — С. 38–44.
6. Колесниченко А. В., Войников В. К. Белки низкотемпературного стресса растений. — Иркутск : Арт-Пресс, 2003. — 196 с.
7. Корочкин Л. П., Серов О. Л., Пудовкин А. И. и др. Генетика изоферментов. — М.: Наука, 1977. —

275 с.

8. Косаковская И.В. Стрессовые белки растений - Киев : Видавництво Українського фітосоц. Центру. — 2008. — 153 с.
9. Кудрякова Н. В. Генетический контроль эстеразы у ржи: Автореф. дис. канд. биол. наук. — Л., 1982. — 18 с.
10. Поберезкина Н. Б., Осинская Л. Ф. Биологическая роль супероксиддисмутазы // Укр. биохим. журн. — 1989. — Т. 61, № 2. — С. 14–27.
11. Савич И. М. Пероксидазы — стрессовые белки растений // Усп. соврем. биол. — 1989. — Т. 107, вып. 3. — С. 406–417.
12. Семихатов В.Ф., Арефьева Л.П., Новожилова О.А., Прусаков А.Н. и др. Ginkgo biloba: биохимическая характеристика белков семян и оценка филогенетических отношений с голосеменными // Ботанический журнал. — 2006. — Т. 91, № 7. — С. 1001–1014.
13. Топтиков В. А., Дьяченко Л. Ф., Тоцкий В. Н. Оценка спектров множественных форм ферментов с помощью показателя уровня внутреннего разнообразия // Цитология и генетика. — 2010. — Т. 44, № 1. — С. 46–53.
14. Топтиков В. А., Мирось С. Л., Дьяченко Л. Ф., Тоцкий В. Н., Залогина М. А. Сопряженность устойчивости озимых мягких пшениц к *Fusarium graminearum* Schwabe и множественных молекулярных форм некоторых ферментов // Цитология и генетика. — 2002. — Т. 36, № 3. — С. 3–11.
15. Шлапак В. П., Музика Г. І, Терещенко Ю. А. Коніферетум як основа композиції хвойних рослин у національному дендрологічному парку "Софіївка" // Науковий вісник НЛТУ України. — 2008. — Вип. 18(12). — С. 214–218.
16. Язловицкая Л.С., Завалишина А.Н., Костышин С.С., Волков З.А. Полиморфизм белков при изменении уровня ploidy кукурузы // Физиол. и биохим. культ. раст. — 1993. — Т. 25, № 5. — С. 472–478.
17. Breda C., Huystee R. B., Esnault R. Differential expression of two peanut peroxidase cDNA clones in peanut plants and cells in suspension culture in response to stress. // Plant Cell Rep. — 1993. — Vol. 12. — P. 268–272.
18. Davis B. J. Disk electrophoresis. 2. Method and application to human serum proteins // Ann. N. Y. Acad. Sci. — 1964. — Vol. 121. — P. 404–427.
19. Dowd P. F., Hermis D. A., Berhow M. A., Lagrimini L. M., Mechanism of insect resistance in transgenic plants (over) expressing a tobacco anionic peroxidase // Plant perox. newsl. — 2000. — Vol. 14. — P. 93–101.
20. Gertz H. J., Kiefer M. Review about Ginkgo biloba Special Extract EGb761 // Curr. Pharm. Des. 2004. — Vol. 10, N. 3. — P. 261–264.
21. Gomez A., Lopez J. A., Pintos B., Camafeita E., Bueno M.A. Proteomic analysis from haploid and diploid embryos of *Quercus suber* L. identifies qualitative and quantitative differential expression patterns // Proteomic. — 2009. - N 9 (18). — P. 4355–4367.
22. Grene R. Oxidative stress and acclimation mechanisms in plants // The Arabidopsis Book. — 2002. - P.

- 3 – 20.
23. Huang W., Deng Q., Xie B., Shi J. et al. Purification and characterization of an antioxidant protein from *Ginkgo biloba* seeds // *Food Res. International*. – 2010. – Vol. 43, I. 1. – P. 86–94.
 24. Huang X., Xie W., Gong Z. Characteristics and antifungal activity of a chitin binding protein from *Ginkgo biloba* // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 478. – P. 123 – 126.
 25. Park S. Study of an Enzyme Activity in Extracts of *Ginkgo biloba* Leaves // *Bull. Korean Chem. Soc.* – 2006. – Vol. 27. – N 11. – P. 1885 – 1887.
 26. Sawano Y., Miyakawa T., Yamazaki H., Tanokura M. et al. Purification, characterization, and molecular gene cloning of an antifungal protein from *Ginkgo biloba* seeds // *Biological Chemistry*. – 2007. – Vol. 388, I.3. – P. 273 – 280.
 27. Selitrennikoff C. P. Antifungal Proteins // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67, N 7. – P. 2883 – 2894.
 28. Shen G., Pang Y., Wu W., Miao Z. et al. Molecular cloning, characterization and expression of a novel jasmonate-dependent defensin gene from *Ginkgo biloba* // *J. Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 162, I.10. – P. 1160 – 1168.
 29. Singh B., Gopichand Kaur P., Singh R. D., Ahuja P. S. Biology and chemistry of *Ginkgo biloba* // *Fitoterapia*. – 2008. – Vol. 79, I. 6. – P. 401 – 418.
 30. Tommasi F., Paciolla C., Concetta de Pinto M., De Gara L. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in *Ginkgo biloba* L. seeds // *Plant Physiol. and Biochem.* – 2006. – Vol. 44, I. 5-6. – P. 359 – 368.
 31. Wang L., Xing S.-Y., Yang K.-Q., Wang Z.-H. et al. Genetic relationships of ornamental cultivars of *Ginkgo biloba* analyzed by AFLP techniques // *Acta Genetica Sinica*. – 2006. – Vol.33, I. 11. – P. 1020 – 1026.
 32. Welinder R.G., Justesen A.F., Kjaersgard I.V., Jensen R.B et al. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *A. thaliana* // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – Vol. 269, N 24. – P. 585 – 609.
 33. Jazlovyska L.S., Oplachko L.T., Tyrnov V.S., Volkov R.A. Protein synthesis in maize haploids and diploids during cultivation under normal condition and in the presence of phenol // *Ukr. Biochim. Zh.* – 1997. – Vol. 69, N 5-6. – P. 152 – 158.

THE EXPRESSION OF SOME OXIDOREDUCTASES AND ESTERASES OF *GINKGO BILOBA* SEEDS AND LEAVES

L. F. DIACHENKO, T. G. ALYEKSYEYeva, V. N. TOTSKY, V.A. TOPTIKOV

The electrophoretical spectra of multiple molecular forms of peroxidase (KФ 1.11.1.7), superoxiddismutase (KФ 1.15.1.1) and esterase (KФ 3.1.1) for the endosperm (megagametophyte) and leaves of Ginkgo biloba L. were investigated. The reliable differences in the ratio (fractions) and expressivity of investigated enzymes isoforms for diploid and haploid Ginkgo tissues were shown. The spectrum complexity have been estimated by the index of internal variety (K_D). Peroxidase K_D-index for the leaves tissues was significantly higher then one for endosperm tissues. There were no essential differences between esterase K_D for endosperm and leaves from the indoor Ginkgo plants. This index for the outdoor plants leaves was twice as high; it was the evidence of different vital importance of genetic and paratypical factors for the investigated esterase expression under various conditions. The brief impact of high and low temperatures in vitro haven't caused the apparent changes of peroxidase and superoxiddismutase expression.

Key words: Ginkgo biloba, multiple forms of enzymes, haploid and diploid tissues

Одержано редколегією 28.10.2010