

## БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ИЗОФЕРМЕНТНОГО СОСТАВА ПЕРОКСИДАЗЫ ХВОИ *PINUS SYLVESTRIS* L.

И.М. Романова<sup>1</sup>, М.А. Живетьев<sup>1,2</sup>, И.А. Граскова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Россия, [irinal70885@mail.ru](mailto:irinal70885@mail.ru)

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский национальный исследовательский технический университет», Иркутск, Россия

**Аннотация.** Применение нативного электрофореза при разделении растительных белков в хвое *Pinus sylvestris* позволило получить и сравнить данные о влиянии изменений факторов окружающей среды на изоферментный состав пероксидазы в растении. Установлен ряд зависимостей изоферментного состава пероксидазы хвои *Pinus sylvestris* от условий окружающей среды, используя средства языка программирования R.

**Ключевые слова:** пероксидаза, *Pinus sylvestris*, R-программирование

**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-674-677

Объектом исследования служила хвоя первого, второго, третьего годов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) и хвои текущего вегетационного периода («новая»). Пробы хвои отбирались ежемесячно с 21 по 23 число в течение 2011-2012 гг. на участках «Олха» и «Мельничная Падь».

Для получения препаратов пероксидаз навеску растительной ткани (1 г) помещали в 10 мл холодного цитратно-фосфатного буфера, растирали в фарфоровой ступке при 4 °С. Выделение общих пероксидаз для электрофоретического разделения производили с использованием 2 мл холодного Sample-буфера, содержащего трис, глицерин и меркаптоэтанол. Для выявления молекулярных форм фермента экстракты разделяли нативным электрофорезом в блоках 8%-ного полиакриламидного геля, с последующим окрашиванием диаминобензидином с добавлением перекиси водорода. Затем гели сканировали и выявляли изоформы по относительной электрофоретической подвижности молекул фермента в ПААГ – Rf.

Использование кластерного анализа позволяет визуально представить достаточно большой объем информации. Основная функция такого анализа – разбиение множества исследуемых объектов на однородные группы, удовлетворяющие некоторому критерию оптимальности. Метод древовидной кластеризации используется при формировании кластеров сходства или расстояния между объектами (в одномерном или многомерном пространстве). В начале работы все объекты являются отдельными кластерами. На первом шаге два наиболее похожих объекта объединяются в кластер. На последующих шагах объединение продолжается до тех пор, пока все объекты не будут составлять один кластер.

Для определения сходства исследуемых проб использовали метод древовидной кластеризации (индекс сходства Брея-Кертиса). Суть такого вида кластеризации состоит в последовательном объединении меньших кластеров в большие кластеры.

Было выделено 11 кластеров (уровень устойчивости кластеров:  $p < 0,07$  и ниже).

Первый кластер содержит изоформу с изoeлектрической точкой 0,32; второй кластер содержит пробы, в состав которых входят изоформы 0,32 и 0,37; третий кластер – 0,27 и 0,32; четвертый – 0,27, 0,32 и 0,37. Кластеры 1, 2, 3 и 4 содержат пробы хвои разных лет, собранных в марте в точках сбора проб Олха и Мельничная Падь.

Пятый кластер состоит из проб с одной изоформой 0,22. Подавляющее большинство проб пятого кластера состоит из изоформ пероксидазы, выделенных из проб, собранных в период высоких и низких положительных температур окружающей среды (весенне-летний период). Обнаружение одной изоформы в кластере, объединяющем практически все пробы хвои, которая выросла весной (молодая хвоя) может свидетельствовать о том, что пероксидаза активно функционирует и как компонент антиоксидантной системы, и как катализатор химических реакций, необходимых для осуществления основных физиологических процессов.

Шестой кластер объединяет пробы разных лет хвои, собранных в обеих точках исследования, но только в ноябре и декабре, состоит из изоформ с изоэлектрической точкой Rf 0,22, 0,27, 0,32 и 0,47.

Седьмой кластер также содержит пробы разных лет хвои, но собранных в период самых низких и высоких температур (июль, ноябрь, февраль). Данный набор изоформ (0,22, 0,27, 0,32) отвечает за осуществление физиологических процессов в данный период.

Восьмой кластер состоит из набора изоформ с Rf 0,22, 0,27, 0,58, девятый кластер состоит из такого же набора изоформ (0,22, 0,27, 0,58), и появляется изоформа с Rf 0,32, обнаруженных в основном в летний период (июнь-сентябрь).

Десятый кластер состоит из одной пробы, собранной в точке отбора проб Олха, в декабре, содержит изоформы с Rf 0,22, 0,27 и 0,47. Молекулярная форма пероксидазы с Rf 0,47, которая находится также в шестом кластере, присутствует в хвое только в период вынужденного и глубокого покоя (ноябрь, декабрь).

Одиннадцатый кластер содержит изоформы 0,22 и 0,27. Изоформы с данной изоэлектрической точкой встречаются практически во всех кластерах в разные периоды онтогенетического развития растительного организма, что свидетельствует о широком спектре действия фермента.

Сам процесс кластерного анализа предполагает объединение полученных кластеров в более крупные группы, наиболее сходных между собой (чем ниже уровень объединения кластеров, тем выше уровень сходства). Так, на первом шаге объединения происходит объединение на высоте 0,25 кластеров 6 и 7, 8 и 9. На втором шаге (высота 0,31) – кластеры 3 и 4, 10 и 11. На высоте 0,39, на третьем шаге, происходит укрупнение кластеров 8, 9, 10, 11 в одну группу. На высоте 0,45 – объединение группы кластеров 6 и 7 с более крупной группой кластеров 8, 9, 10, 11. На пятом шаге (высота 0,51) кластер 2 входит в группу кластеров 3, 4 и на высоте 0,54 происходит объединение кластеров 1, 2, 3, 4. На высоте 0,61 кластер 5 объединяется со всеми последующими кластерами, включая 11 кластер. Окончательное объединение всех кластеров происходит на высоте 0,89.

Объединение кластеров 1, 2, 3, 4 в одну группу осуществлялось по наличию изоформы 3 (Rf 0,32) и по месяцу отбора проб (март). Данная изоформа прослеживается весь период глубокого и вынужденного покоя и выхода из состояния покоя; изоформа отвечает за основные физиологические процессы, такие, как дыхание, в самый неблагоприятный период и принимает активное участие в выходе растения из состояния вынужденного покоя.

Место произрастания в данном исследовании не влияет на состав молекулярных форм фермента: почти в каждом кластере обнаружено одинаковое количество проб как из Олхи, так и из Мельничной Пади.

Одним из методов снижения размерности полученных данных является анализ главных компонент (PCA, Principal Components Analysis), который широко используется в различных областях науки и техники и детально описан в многочисленных руководствах.

При дальнейшем анализе методом главных компонент для удобства все изоформы пероксидазы были пронумерованы: изоформа с  $R_f$  0,22 – № 1; с  $R_f$  0,27 – № 2; с  $R_f$  0,32 – № 3; 0,37 – 4; 0,47 – 5; 0,58 – 6.

Главные компоненты – это прямые (оси факторов), проходящие через облако точек (переменных) в векторном пространстве, проложенные по критерию наименьших квадратов, которые максимизируют суммы квадратов ортогональных проекций (дисперсий), причем первая компонента имеет наибольший вклад в характеристику особенностей объекта, вторая меньший, третья еще меньший и т. д.

Был проведен анализ влияния изоформ, количества осадков, температур (среднесуточной и среднемесячной) на изоферментный состав хвои сосны обыкновенной.

Расположение полученных векторов показало практическое совпадение направленности влияния температуры, как среднемесячной, так и среднесуточной. Вектора, вне зависимости от результатов кластеризации, позволяют наглядно проследить взаимозависимость всех объектов, использованных при расчете данных. Направление векторов в одну сторону говорит о наличии прямой зависимости, в противоположные – об обратной. Перпендикулярное расположение векторов свидетельствует об отсутствии зависимости между объектами изучения.

На изменение изоферментного состава хвои большее влияние оказывают условия окружающей среды, особенно сильно влияние среднемесячной температуры.

При этом на изменение морфометрических данных хвои более заметное влияние оказывает количество осадков, в отличие от температуры окружающей среды.

Молекулярные формы пероксидазы зависят от оптимальных условий, необходимых для проявления каталитической активности. Разные условия окружающей среды в периоды роста и покоя обуславливают проявление активности различных изоформ пероксидазы.

Сильнее всего меняются изоформы 1, 3 и 6, которые больше задействованы в адаптационных механизмах хвои за весь период наблюдений.

В это же время изоформа 2 меньше всех подвержена изменению и присутствует практически во всех пробах. Об этом свидетельствует и квадрат коэффициента корреляции, и вектор, перпендикулярный сумме осадков и температурам.

Судя по направлению векторов, синтез изоформы 6 сопровождается прекращением синтеза изоформ 5 и 4. Также разнонаправлены вектора, отражающие синтез изоформ под номерами 1 и 3.

Изоформы 3, 4 и 5 могут экспрессироваться при более засушливых условиях и повышенных температурах относительно других изоформ.

Влияние каждой из изоформ на изменение их состава было статистически достоверно.

Применение нативного электрофореза при разделении растительных белков в хвое сосны обыкновенной позволило получить и сравнить данные о влиянии изменений факторов окружающей среды на изоферментный состав пероксидазы в растении.

Наличие разнообразного спектра кислых и щелочных изоформ пероксидазы, позволяющего ферменту своевременно и эффективно реагировать на стрессовые воздействия биотического и абиотического происхождения, указывает на связь фермента с адаптационными способностями растительного организма в целом.

Являясь одним из компонентов антиоксидантной системы, пероксидаза обеспечивает жизнедеятельность организма при вынужденном покое в период низких отрицательных температур и активирует выход организма из покоя, что происходит благодаря процессам перекисного окисления липидов, активирующим основные физиологические процессы.

*Работа выполнена на оборудовании Центра коллективного пользования «Биоаналитика» Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (г. Иркутск).*

## **BIO-INFORMATION ANALYSIS OF PEROXIDASE ISOENZYME COMPOSITION OF *PINUS SYLVESTRIS* L. NEEDLES**

I.M. Romanova<sup>1</sup>, M.A. Zhivetyev<sup>1,2</sup>, I.A. Graskova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russia, [irina170885@mail.ru](mailto:irina170885@mail.ru)

<sup>2</sup>Federal State Budget Educational Institution of Higher Education «Irkutsk National Research Technical University», Irkutsk, Russia

**Abstract.** Use native electrophoresis in separating plant proteins in the needles of *Pinus sylvestris* has allowed to obtain and compare data on the impact of environmental factors changes Wednesday on isoenzyme composition of peroxidase in the plant. A number of isoenzyme peroxidase composition dependency of needles of *Pinus sylvestris* from ambient conditions of environmental, using the R programming language.

**Keywords:** *peroxidase, Pinus sylvestris, R-programming*