

ВЛИЯНИЕ ЗАСОЛЕНИЯ И ЭКСТРЕМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ЦИТОЗОЛЬНОЙ НАДФ-ИДГ В ЛИСТЯХ КУКУРУЗЫ

Т. А. Гродецкая, Р. А. Шестаков, С. Н. Ливенцева, А. Т. Епринцев

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 27.01.2020 г.

Аннотация. НАДФ-зависимая изоцитратдегидрогеназа (КФ 1.1.1.42) катализирует реакцию окислительного декарбоксилирования изоцитрата в α -кетоглутарат с одновременным восстановлением НАДФ до НАДФН. Установлено, что данный фермент играет важную роль в защите от окислительного стресса у растений наряду с другими ферментами, поставляющими энергетические эквиваленты НАДФН, такими как ферредоксин-НАДФ-редуктаза, НАДФ-дегидрогеназы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ), 6-фосфоглюконатдегидрогеназа (6ФГДГ) и НАДФ-малик энзим. Нами проведено исследование воздействия 200 мМ NaCl, низких (4°C) и высоких (37°C) температур на активность цитозольной НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в зеленых листьях кукурузы. Активность ИДГ определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Анализ генетической базы данных NCBI позволил обнаружить ген, кодирующий цитозольную форму НАДФ-ИДГ – *cyt-icdh* (NCBI, инв. № NC_024465.2), локализованный на 7 хромосоме кукурузы. Подбор специфических праймеров осуществляли в программе Primer 3, апробацию условий амплификации проводили методом ПЦР с градиентом температур (59-68°C). Было проведено исследование роли экспрессионной регуляции гена *cyt-icdh* в исследуемых растениях в экстремальных условиях. Экспрессию *cyt-icdh* исследовали методом ПЦР-реалтайм, в качестве нормализатора использовали ген 18S рРНК. Установлено, что увеличение экспрессии *cyt-icdh* наблюдается на 16 час при воздействии NaCl и на 26 час воздействия высоких и низких температур на исследуемый образец. Увеличение экспрессии данного гена сопровождается повышением активности НАДФ-ИДГ, что свидетельствует о ее регуляции методом синтеза *de novo*. Следовательно, воздействие 200 мМ NaCl, низких и высоких температур оказывает регулирующее действие на работу генетического аппарата данной ферментной системы. Анализ полученных данных свидетельствует о важной роли регуляции цитозольной НАДФ-ИДГ на генетическом уровне при развитии стрессоустойчивости у растений кукурузы. Увеличение активности НАДФ-ИДГ может свидетельствовать о развитии защиты от окислительного стресса путем поставки НАДФН для работы пероксидазы, восстановления активного центра каталазы, функционирования NO-синтазы и NADP-оксидазы, а также восстановления глутатиона и аскорбата в глутатион-аскорбатном цикле.

Ключевые слова: НАДФ-изоцитратдегидрогеназа, стресс, кукуруза, экспрессия гена.

Засоление является значительным стрессовым фактором, влияющим на метаболизм растительной клетки. Негативное воздействие NaCl на растение обусловлено повышением осмотического давления, токсическим действием ионов натрия и хлора, а также повышением концентрации АФК [1,2]. В настоящее время также установлено, что реакцией растения на стрессовое воздействие может быть генерация оксида азота (NO) или актив-

ных форм азота (АФА), накопление которых провоцирует развитие нитроокислительного стресса.

НАДФН является ключевым кофактором, выполняющим поддержание клеточного окислительно-восстановительного гомеостаза, являясь незаменимым донором электронов во многих ферментативных реакциях, путях биосинтеза и процессах детоксикации [3,4]. НАДФН необходим в метаболизме АФК и АФА; например, является восстановительным эквивалентом для регенерации восстановленного глутатиона (глутатион-SH) глу-

татионредуктазой (компонентом цикла аскорбат-глутатион) и для активности НАДФН-зависимой тиоредоксиновой системы, двух важных клеточных антиоксидантов, защищающих от окислительного повреждения. Кроме того, НАДФН необходим для образования супероксидного радикала НАДФН-оксидазой [5], но также является кофактором для образования оксида азота (NO) под действием L-аргинин-зависимой синтазы оксида азота [6].

Физиологическое состояние растений можно оценить на основании изменения активности ферментов, контролирующих превращения аминокислот. Ферменты и их стрессовые метаболиты могут служить биохимическими показателями физиологического состояния растений в условиях изменения окружающей среды [7].

Наиболее важными ферментами, которые обладают способностью генерировать восстановительные эквиваленты в форме НАДФН у растений, являются ферредоксин-НАДФ-редуктаза как компонент фотосистемы I [8] и группа НАДФ-дегидрогеназ, расположенных в разных субклеточных компартментах, которая включает в себя НАДФ-изоцитратдегидрогеназу (НАДФ-ИДГ), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу (Г6ФДГ) и 6-фосфоглюконатдегидрогеназу (6ФГДГ) (оба относятся к пентозофосфатному пути) и НАДФ-малик энзим (МЭ) [9-11].

В ряде исследований было показано, что активность НАДФ-ИДГ возрастает при различных видах стресса [12-15], в том числе, при воздействии солевого стресса. Так в листьях *Cucumis sativus* (L.) при воздействии 100 мМ NaCl активность ИДГ к третьему дню повышалась в 1,7 раз, что коррелировало с повышением активности других НАДФН синтезирующих ферментов: глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, НАДФ-малик энзима и пр. [16]. В листьях саженцев *Olea europea* (L.) при воздействии 200 мМ NaCl в 3 раза повышалась концентрация пероксида водорода, что коррелировало с повышением активности антиоксидантных ферментов: каталазы, супероксиддисмутазы, глутатионредуктазы, а также ферментов, поставляющих НАДФН: Г6ФД, МЭ, ИДГ. Активность ИДГ при этом повышалась в 2,7, а экспрессия в 2 раза [15]. В листьях *Mesembryanthemum crystallinum* (L.) активность ИДГ при воздействии 400 мМ NaCl повышалась на 140%. Причем, это повышение было вызвано увеличением экспрессии гена цитозольной формы ИДГ [17]. ИДГ – один из ключевых ферментов, участвующих в защите растения от оксидативного стресса: она поставляет НАДФН для нейтрализации H₂O₂ пероксидазами,

восстановления глутатиона и аскорбата в глутатион-аскорбатном цикле, восстановления активного центра каталазы, а также для функционирования NO-синтазы и NADP-оксидазы [1-2, 6, 15-21].

Целью данной работы было исследование механизма регуляции активности НАДФ-изоцитратдегидрогеназы в растениях при осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма к экстремальным факторам.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали листья кукурузы (*Zea mays* L.), сорта Воронежская-76, возрастом 14 дней, выращенной гидропонным методом при 25°C, 10-часовом световом дне с интенсивностью света 25 Вт/м².

Листья кукурузы гомогенизировали в среде выделения, содержащей 100 мМ TrisHCl, pH = 7.8; 0.1 мМ ЭДТА, 1 мМ MgCl₂, 2 мМ ДТТ, в соотношении проба : среда гомогенизации = 1:4. Далее образцы центрифугировали при 11000 об./мин. в течение 20 минут. Надосадок использовали для определения активности.

Активность ИДГ определяли спектрофотометрически на приборе СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия) при длине волны 340 нм. Изменение оптической плотности наблюдалось за счет восстановления НАДФ до НАДФН. Среда фотометрирования была следующего состава: 2.5 мл 100 мМ Tris-HCl буфера (pH 7.8), 2 мМ MgCl₂, 200 мкл 1.4 мМ НАДФ, 200 мкл 8.8 мМ изоцитрат натрия и 100 мкл пробы. Активность фермента рассчитывали по формуле:

$$A = \frac{D \times V_1 \times \varepsilon}{V_2 \times t}$$

где ε – коэффициент микромолярной экстинкции НАДФН (для ИДГ = 6.22); D – прирост оптической плотности при 340 нм за время t; V₁ – полный объем вытяжки, мл; V₂ – объем внесенной для измерения пробы, мл; t – время, мин.

Последовательность гена *cyt-icdh* получили из международной базы данных генетических последовательностей NCBI. Праймеры подбирали в программе Primer 3, их последовательности были следующими: прямой 5'-CAGTGCACCAACAATAGCG-3' и обратный 5'-CACATACAGACACCTGACCG-3'.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). Смесь праймеров и матрицы (1 мкг на реакцию) РНК сначала прогревали при 70°C в течение 2 минут. Реакционную смесь объемом 20 мкл, содержащую РНК матрицу, 1 мкл 20 мкМ праймера, 5 мкл

5х буфера, 2 мкл 10 мМ дНТФ, 2 мкл 20 мМ ДТТ, 1 мкл MMLV ревертазы инкубировали 1 час при 37°C в амплификаторе Терцик (ДНК-Технология, Россия). Далее смесь инкубировали при 70°C последние 10 мин для остановки реакции.

Для оптимизации параметров амплификации праймеров ПЦР проводили с градиентом температур (59-68°C). Оптимальной была выбрана температура 62°C.

Анализ продуктов ПЦР проводили методом электрофореза в 1% агарозном геле, содержащем 0,1% интеркалирующего красителя – бромистого этидия. Визуализацию осуществляли с использованием геля документирующей системы Blue Cube 300 (Serva, Германия).

ПЦР в реальном времени проводили на приборе LightCycler96 (Roche, Швейцария). В качестве нормализатора реакции использовали ген 18S рРНК. Относительную экспрессию гена *cut-icdh* рассчитывали с помощью $\Delta\Delta C_t$ метода.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Активность цитозольной НАДФ-ИДГ была проанализирована в условиях воздействия 200 мМ NaCl. Было выявлено, что на 6 час эксперимента активность фермента увеличивается, достигая максимального значения к 16 часам воздействия стресса, затем начинает снижаться (рис. 1).

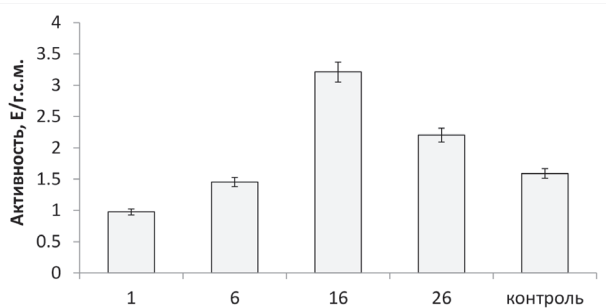


Рис. 1. Активность НАДФ-ИДГ в условиях воздействия 200 мМ NaCl

Воздействие низких температур на растения кукурузы способствовало снижению активности НАДФ-ИДГ в первые часы инкубации, в то время как к 16 часу эксперимента она достигла значений активности у контрольных образцов, а к 26 часу наблюдалось увеличение до 2.5 Е/г.с.м. (рис. 2).

Инкубация растений кукурузы в условиях высоких температур к 26 часу эксперимента вызвала увеличение активности цитозольной формы НАДФ-ИДГ относительно контрольных образцов в 2.3 раза (рис. 3).

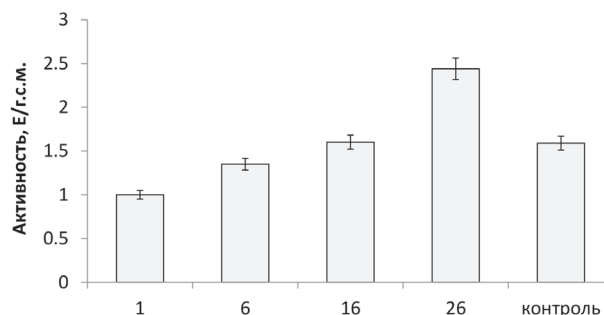


Рис. 2. Активность НАДФ-ИДГ в условиях воздействия низких температур (4°C)

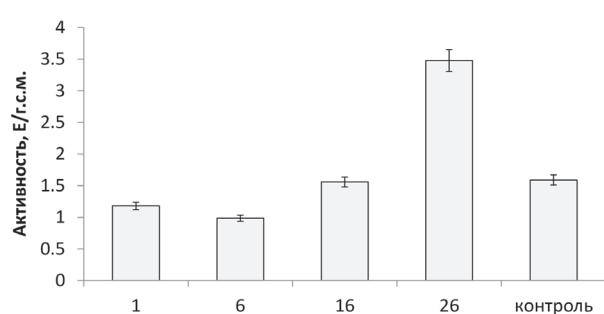


Рис. 3. Активность НАДФ-ИДГ в условиях воздействия высоких температур (37°C)

На основе анализа международной базы данных генетических последовательностей NCBI был выявлен ген *cut-icdh* (NCBI, инв. № NC_024465.2), локализованный на 7 хромосоме кукурузы. Амплификация с подобранными праймерами показала наличие одного специфического продукта (рис. 4).

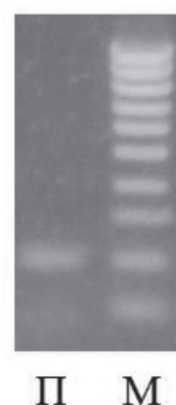


Рис. 4. Электрофореграмма ПЦР-продукта *cut-icdh* цитозольной НАДФ-ИДГ: П-продукт; М-маркер длин ДНК, 100-1000 п.н., шаг 100 п.н.

Анализ экспрессии гена *cut-icdh* при воздействии 200 мМ NaCl показал увеличение данного показателя относительно контрольных вариантов на 6 ч воздействия стрессового фактора и дальнейшее снижение относительного уровня транскриптов в ходе эксперимента (рис. 5).

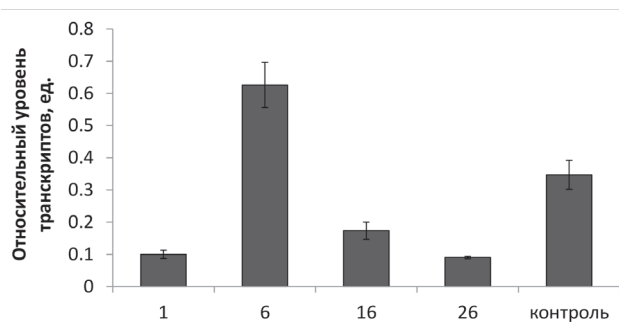


Рис. 5. Экспрессия гена *cyt-icdh* в условиях воздействия 200 мМ NaCl

Воздействие низких температур на растения кукурузы вызвало снижение экспрессии *cyt-icdh* в первые часы эксперимента, однако к 16 ч инкубации значение экспрессии у опытных образцов достигло максимума со значением 0.55 Е/г.с.м. (рис. 6).

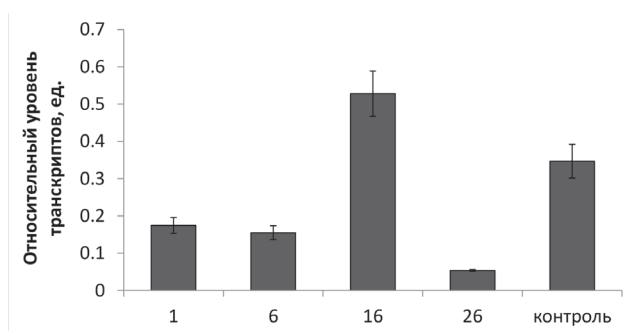


Рис. 6. Экспрессия гена *cyt-icdh* в условиях воздействия низких температур (4°C)

Опытные растения кукурузы, подвергнутые воздействию 37°C, в первый и 6 час эксперимента продемонстрировали сниженный уровень транскриптов гена цитозольной НАДФ-ИДГ. Однако к 26 часу эксперимента экспрессия *cyt-icdh* увеличилась в 2.9 раз относительно контрольных образцов (рис. 7).

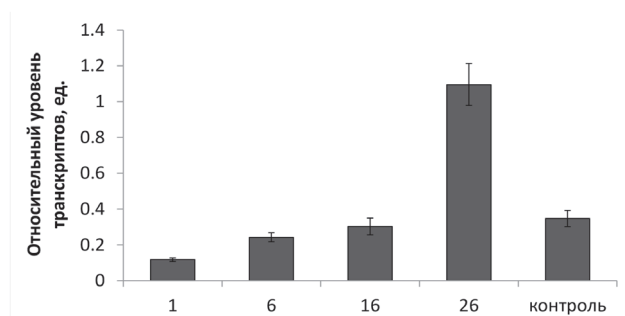


Рис. 7. Экспрессия гена *cyt-icdh* в условиях воздействия высоких температур (37°C)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ полученных данных позволяет сделать следующее заключение. Цитоплазматическая форма ИДГ в листьях кукурузы участвует в

осуществлении адаптивной реакции клеточного метаболизма к стрессовым факторам. Так, наблюдается увеличение активности этого фермента к 16 часу, поскольку повышается необходимость в поставке энергетических эквивалентов НАДФН для восстановления окисленного глутатиона глутатионредуктазой и для активности НАДФН-зависимой тиоредоксиновой системы, обеспечивающей защиту от АФК. Для выяснения механизма изменения ферментативной активности исследовали экспрессионную регуляцию гена *cyt-icdh*. Увеличение экспрессии гена *cyt-icdh* при воздействии NaCl, низких и высоких температур на растения кукурузы, сопровождающееся повышением активности цитозольной НАДФ-ИДГ, свидетельствует об изменении активности ИДГ методом синтеза *de novo*. Следовательно, исследуемые экстремальные факторы оказывали регулирующее действие на работу генетического аппарата данной ферментной системы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Farooq M., Hussain M., Wakeel A., Siddique K.H.M. // *Agronomy for Sustainable Development*. 2015. Vol. 35. no. 2, pp. 461-481.
2. Tang X. Mu H., Shao H., Wang H., Brestic M. *Critical reviews in biotechnology*. 2015. Vol. 35. №. 4. pp. 425-437.
3. Barroso J. B., Peragon J., Contreras-Jurado C. // *American Journal of Physiology*. 1998. Vol. 274. no. 6. pp. R1578-R1587.
4. Noctor G. // *Plant, Cell and Environment*. 2006. Vol. 29. no. 3. pp. 409-425.
5. Sagi M., Fluhr R. // *Plant Physiology*. 2006. Vol. 141. no. 2. pp. 336-340.
6. Corpas F. J., Barroso J. B. *Frontiers in Environmental Science*. 2014. Vol. 2. p. 55.
7. Eprintsev A.T., Selivanova N.V., Igamberdiev A.U. // *Nitrogen Metabolism in Plants*. New York. 2020. pp. 71-78.
8. Arakaki K., Ceccarelli E. A., Carrillo N. *FASEB Journal*. 1997. Vol. 11. no. 2. pp. 133-140.
9. Drincovich M. F., Casati P., and Andreo C. S. *FEBS Letters*, 2001. Vol. 490. no. 1-2. pp. 1-6.
10. Hodges M., Flesch V., Gálvez S., Bismuth E. *Plant Physiology and Biochemistry*. 2003. Vol. 41. no. 6-7. pp. 577-585.
11. Mateos R.M., Bonilla-Valverde D., del Río L.A., Palma J. M., Corpas F.J. *Physiologia Plantarum*. 2009. Vol. 135. no. 2. pp. 130-139.
12. Leterrier M., Barroso J.B., Valderrama R., Begara-Morales J., Sánchez-Calvo B., Chaki M.,

Luque F., Viñegla B., Palma H.M., Corpas F.J. Free Radical Research. 2007. Vol. 41. №. 2. pp. 191-199.

13. Leterrier M., Barroso J.B., Valderrama R., Palma R.M., Corpas F.J. The Scientific World Journal. 2012. Vol. 2012. pp. 1-9.

14. Mhamdi A., Mauve C., Gouia H., Saindrenan P., Hodges M., Noctor G. Plant, cell & environment. 2010. Vol. 33. №. 7. pp. 1112-1123.

15. Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Gómez Rodríguez M. V. Mounira C., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A. Del Río L.A., Barroso J.B. Plant, Cell & Environment. 2006. Vol. 29. №. 7. pp. 1449-1459.

16. Hýsková V., Plisková V., Ryšlavá H. General physiology and biophysics. 2017. Vol. 36. no. 3. pp. 247-258.

17. Popova O. V. Ismailov S.F., Popova T.N., Dietz K.J., Golldack D. // Planta. 2002. Vol. 215. №. 6. pp. 906-913.

18. Corpas F. J., Palma M., del Rio L. A., Barroso J. B. // New Phytologist. 2009. Vol. 184. no. 1, pp. 9-14.

19. Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam Md. M., Roychowdhury R., Fujita M. // International journal of molecular sciences. 2013. Vol. 14. no. 5. pp. 9643-9684.

20. Hasegawa P. M. Bressan R.A., Zhu J.-K., Bohnert H. // Annual review of plant biology. 2000. Vol. 51. no. 1. pp. 463-499.

21. Popova T.N., Rakhmanova T.I., Appenroth K.J. Journal of plant physiology. 2002. Vol. 159. №. 3. pp. 231-237.

*Воронежский государственный университет
Гродецкая Т. А., аспирант кафедры биохимии
и физиологии клетки
E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru*

*Voronezh State University
Grodetskaya T. A., post-graduate student of
biochemistry and cell physiology dept.
E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru*

*Шестаков Р. А., магистр кафедры биохимии и
физиологии клетки
E-mail: sofer82@mail.ru*

*Shestakov R. A., Master of the department of
biochemistry and cell physiology
E-mail: sofer82@mail.ru*

*Ливенцева С. Н., студент кафедры биохимии
и физиологии клетки*

*Liventseva S. N., student of the department of
biochemistry and cell physiology*

*Епринцев А. Т., заведующий кафедрой биохимии
и физиологии клетки
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

*Eprintsev A. T., head of the department of
biochemistry and cell physiology
E-mail: bc366@bio.vsu.ru*

EFFECT OF SALINIZATION AND EXTREME TEMPERATURES ON THE FUNCTIONING OF THE CYTOSOLIC NADP-IDH IN CORN LEAVES

T. A. Grodetskaya, R. A. Shestakov, S. N. Liventseva, A. T. Eprintsev

Voronezh State University

Abstract. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.42) catalyzes the oxidative decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate with the simultaneous reduction of NADP to NADPH. It was found that this enzyme plays an important role in protecting against oxidative stress in plants along with other enzymes that supply energy equivalents of NADPH, such as ferredoxin-NADP-reductase, NADP-dehydrogenase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGDH) and NADP-malate enzyme. We studied the effect of 200 mM NaCl, low (4 °C) and high (37 °C) temperatures on the activity of the cytosolic NADP-isocitrate dehydrogenase in green leaves of corn. IDH activity was determined spectrophotometrically at a wavelength of 340 nm. Analysis of the NCBI genetic database revealed a gene encoding the cytosolic form of NADP-IDH - *cyt-icdh* (NCBI, inv. No. NC_024465.2), located on the 7th chromosome of maize. Specific primers were selected using the Primer 3 program; the amplification conditions were tested by PCR with a temperature gradient (59-68 °C). It was

studied the role of the *cyt-icdh* gene expression regulation in the corn plants under extreme conditions. The expression of *cyt-icdh* was studied by PCR-realtime; the 18S rRNA gene was used as a normalizer. It was found that an increase in *cyt-icdh* expression is observed at 16 hours when exposed to NaCl and at 26 hours when high and low temperatures are exposed to the test sample. An increase in the expression of this gene is accompanied by an increase in the activity of NADP-IDH, which indicates its regulation by de novo synthesis. Therefore, the effect of 200 mM NaCl, low and high temperatures has a regulatory effect on the functioning of the genetic apparatus of this enzyme system. Analysis of the obtained data indicates the important role of the regulation of the cytosolic NADP-IDH at the genetic level in the development of stress resistance in corn plants. An increase in the activity of NADP-IDH may indicate the development of protection against oxidative stress by supplying NADPH for the functioning of peroxidases, restoration of the active center of catalase, functioning of NO synthase and NADP oxidase, as well as restoration of glutathione and ascorbate in the glutathione-ascorbate cycle.

Keywords: NADP-isocitrate dehydrogenase, stress, corn, gene expression.

REFERENCES

1. Farooq M., Hussain M., Wakeel A., Siddique K.H.M. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, Vol. 35, no. 2, pp. 461-481.
2. Tang X. Mu H., Shao H., Wang H., Brestic M. *Critical reviews in biotechnology*, 2015, Vol. 35, № 4, pp. 425-437.
3. Barroso J. B., Peragon J., Contreras-Jurado C. *American Journal of Physiology*, 1998, Vol. 274, no. 6, pp. R1578-R1587.
4. Noctor G. *Plant, Cell and Environment*, 2006, Vol. 29, no. 3, pp. 409-425.
5. Sagi M., Fluhr R. *Plant Physiology*, 2006, Vol. 141, no. 2, pp. 336-340.
6. Corpas F. J., Barroso J. B. *Frontiers in Environmental Science*, 2014, Vol. 2, p. 55.
7. Eprintsev A.T., Selivanova N.V., Igamberdiev A.U. *Nitrogen Metabolism in Plants*, New York, 2020, pp. 71-78.
8. Arakaki K., Ceccarelli E. A., Carrillo N. *FASEB Journal*, 1997, Vol. 11, no. 2, pp. 133-140.
9. Drincovich M. F., Casati P., and Andreo C. S. *FEBS Letters*, 2001, Vol. 490, no. 1-2, pp. 1-6.
10. Hodges M., Flesch V., Gálvez S., Bismuth E. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2003, Vol. 41, no. 6-7, pp. 577-585.
11. Mateos R.M., Bonilla-Valverde D., del Río L.A., Palma J. M., Corpas F.J. *Physiologia Plantarum*, 2009, Vol. 135, no. 2, pp. 130-139.
12. Leterrier M., Barroso J.B., Valderrama R., Begara-Morales J., Sánchez-Calvo B., Chaki M., Luque F., Viñegla B., Palma H.M., Corpas F.J. *Free Radical Research*, 2007, Vol. 41, № 2, pp. 191-199.
13. Leterrier M., Barroso J.B., Valderrama R., Palma R.M., Corpas F.J. *The Scientific World Journal*, 2012, Vol. 2012, pp. 1-9.
14. Mhamdi A., Mauve C., Gouia H., Saindrenan P., Hodges M., Noctor G. *Plant, cell & environment*, 2010, Vol. 33, № 7, pp. 1112-1123.
15. Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Gómez Rodríguez M. V. Mounira C., Pedrajas J.R., Fernández-Ocaña A. Del Río L.A., Barroso J.B. *Plant, Cell & Environment*, 2006, Vol. 29, № 7, pp. 1449-1459.
16. Hýsková V., Plisková V., Ryšlavá H. *General physiology and biophysics*, 2017, Vol. 36, no. 3, pp. 247-258.
17. Popova O. V. Ismailov S.F., Popova T.N., Dietz K.J., Golldack D. *Planta*, 2002, Vol. 215, № 6, pp. 906-913.
18. Corpas F. J., Palma M., del Río L. A., Barroso J. B. *New Phytologist*, 2009, Vol. 184, no. 1, pp. 9-14.
19. Hasanuzzaman M., Nahar K., Alam Md. M., Roychowdhury R., Fujita M. *International journal of molecular sciences*, 2013, Vol. 14, no. 5, pp. 9643-9684.
20. Hasegawa P. M. Bressan R.A., Zhu J.-K., Bohnert H. *Annual review of plant biology*, 2000, Vol. 51, no. 1, pp. 463-499.
21. Popova T.N., Rakhmanova T.I., Appenroth K.J. *Journal of plant physiology*, 2002, Vol. 159, № 3, pp. 231-237.