

АКТИВНОСТЬ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ И СВЯЗАННОЙ С КЛЕТОЧНЫМИ СТЕНКАМИ β -ГЛЮКОЗИДАЗЫ В ОНТОГЕНЕЗЕ РАСТЕНИЙ *PISUM SATIVUM* L.

А. Н. Ершова, Н. В. Винокурова, О. Н. Баркалова

ФБОУ ВО «Воронежский государственный педагогический университет»

Поступила в редакцию 14.03.2020 г.

Аннотация. Определяли активность цитоплазматической и связанной с клеточными стенками молекулярные формы β -глюкозидазы (КФ 3.2.1.21), расщепляющей специфический для растений гороха изосукцинимид- β -гликозид (ИС-гликозид), в процессе прорастания и роста растений *Pisum sativum* L. Растения гороха (Рамонский 77) выращивали методом гидропоники или в условиях мелкоделяночного опыта до стадии созревания семян. Активность β -глюкозидазы определяли, используя в качестве субстрата ИС-гликозид, по количеству образовавшейся глюкозы. Адсорбированную β -глюкозидазу выделяли промыванием осадка клеточных стенок 0.1 М фосфатно-цитратным буфером (рН 6.0), а ионно-связанную форму - раствором 1М NaCl. Одновременно в растениях определяли содержания ИС-гликозида и растворимых сахаров с использованием метода тонкослойной хроматографии. Показано, что в надземной части 5-дневных проростков гороха активность связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы была выше, чем цитоплазматической. Она возрастала в 1.5-3 раза, достигая у 10-дневных проростков для ионно-связанной с клеточной стенкой величины 18.50 ± 0.14 , а адсорбированной - 10.6 ± 0.09 ФЕ мг^{-1} белка. Однако затем начинала резко снижаться. В сухих семенах активность β -глюкозидазы не обнаруживалась, но она присутствовала в семенах на стадии молочной спелости (1.89 ± 0.06 ФЕ мг^{-1} белка). Активность цитоплазматической β -глюкозидазы в листьях 2-недельных проростков составила 4.30 ± 0.14 ФЕ мг^{-1} белка и оставалась достаточно высокой до цветения (фаза бутонизации), при этом в корнях она была на порядок ниже. ИС-гликозид также не обнаруживался в сухих семенах. Содержание ИС-гликозида в листьях 10-дневных проростков составляло 5.76 ± 0.06 $\text{мг} \cdot \text{г}^{-1}$ сыр.массы, что было немногим меньше глюкозы и превышало уровень сахарозы. В корнях содержание ИС-гликозида было всегда более низким, так же как и активность цитоплазматической β -глюкозидазы. Полученные нами результаты позволяют заключить, что цитоплазматическая и связанные с клеточной стенкой молекулярные формы β -глюкозидазы выполняют различные функции в онтогенезе растений гороха. Достаточно высокая активность цитоплазматической β -глюкозидазы в листьях на всех этапах роста позволяет пополнять фонд глюкозы для дыхательного метаболизма клеток растений гороха за счет гидролиза специфического ИС-гликозида, а также участвовать в реакции трансгликозидирования с образованием других гликозидов. Связанные же с клеточной стенкой адсорбированная и ионно-связанная молекулярные формы β -глюкозидазы, активность которых значительно уменьшается с возрастом, обеспечивают участие ИС-гликозида, как поставщика глюкозы, в формировании веществ клеточных стенок у молодых, активно растущих проростков гороха.

Ключевые слова: β -глюкозидаза, цитоплазматическая, связанная с клеточными стенками, активность, изосукцинимид- β -гликозид, онтогенез, растения гороха.

β -глюкозидаза (β -D-глюкозид-глюкогидролазы КФ 3.2.1.21) катализирует гидролитическое расщепление β -гликозидной связи между двумя остатками гликона или связи между глюкозой и алкил- или арилагликоном. [1]. Фермент относится

к группе гликозидгидролаз, которые обнаружены в представителях всех царств живых организмов, включая растения [2]. Физиологические функции растительных β -глюкозидаз разнообразны [3]. Они участвуют в регуляции биологической активности фитогормонов растений, расщепляя транспортные формы в виде β -D-гликозидов [4]

и обеспечивают химическую защиту растений от фитопатогенов, освобождая активные агликоны [5]. β-Глюкозидазы могут локализоваться в различных компартаментах растительной клетки [6,7]. Так, β-глюкозидазы расщепляющие салицины, которые обнаружены в листьях овса, присутствовали в основном во фракции клеточных стенок [8], в тоже время у других растений они могли быть локализованы в цитоплазме или в вакуоле, где находились расщепляемые ими гликозиды [9]. Показано, что активность β-глюкозидаз увеличивается в период роста растений, индуцированного ауксинами [8,10].

В последние годы были получены экспериментальные доказательства того, что в различных видах высших растений присутствуют как арил-β-глюкозидазы с широким спектром расщепляемых субстратов [11], так и высокоспецифичные β-глюкозидазы, действие которых направлено на гликозиды, которые присущи данному виду растений [12]. Так, в листьях и корневищах диоскореи был найден фермент олигофуранозид-специфичная β-глюкозидаза, расщепляющий исключительно стероидные гликозиды фурастанового ряда, присутствующие в корневищах и листьях этого растения [5].

В проростках гороха нами была обнаружена β-глюкозидаза [13], расщепляющая специфический для этого растения изосукцинимид-β-гликозид (ИС-гликозид). Установлено, что предшественником агликона ИС-гликозида является циклическое производное γ-аминомасляной кислоты [14]. В проростках гороха обнаружена как растворимая (цитоплазматическая) β-глюкозидаза, так и связанные с клеточной стенкой адсорбированная и ионно-связанные молекулярные формы фермента [15], расщепляющие ИС-гликозид с большей скоростью, чем другие арил- и алкил-β-D-глюкопиранозиды. Цитоплазматическая β-глюкозидаза гороха проявляла и трансликозидазную активность [16] подобно другим β-глюкозидазам [17] и на ее активность влияли факторы внешней среды (гипоксия). Исследовали активность β-глюкозидазы разной клеточной локализации в процессах прорастания и роста растений гороха. Одновременно анализировали содержание растворимых углеводов и специфического для этого растения ИС-гликозида, как субстрата, расщепляемого β-глюкозидазой.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Растения гороха (Рамонский 77) выращивали методом гидропоники при температуре +25°C и освещенности 1000 люкс/см² (12-час. фотопери-

од) до 27 дней или в условиях мелкоделяночного опыта до созревания семян. Для определения активности β-глюкозидазы навеску листьев или корней гомогенизировали с четырехкратным объемом среды выделения: 0.1 М фосфатно-цитратный буфер (рН 6.0) с 0.4 М сахарозой и 0.01 М фосфатом калия. Экстракт фильтровали и центрифугировали. В гомогенате определяли активность растворимой (цитоплазматической) β-глюкозидазы. Для определения активности связанных с клеточными стенками молекулярных форм β-глюкозидазы, осадок клеточных стенок отмывали буфером и получали адсорбированную форму β-глюкозидазы. После обработке раствором 1 М NaCl в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере в течение 4-х часов при постоянном перемешивании получали фракции ионно-связанной с клеточными стенками форму β-глюкозидазы [13]. Активность β-глюкозидазы определяли с использованием глюкозооксидазного теста [15]. Инкубационная среда для цитоплазматической β-глюкозидазы содержала 0.1 мМ раствор ИС-гликозида в 0.1 М фосфатно-цитратного буфера (рН 5.2) и 0.1 мл ферментативной вытяжки. Для связанных с клеточными стенками молекулярных форм β-глюкозидазы инкубационная среда, содержала 0.1 мМ ИС-гликозида в 0.1 М фосфатно-цитратном буфере (рН 4.6-4.8) и 0.1 мл ферментативной вытяжки. Реакцию останавливали добавлением 0.5 мл 0.2 М Na₂CO₃ [13]. Количество образовавшейся глюкозы определяли с использованием глюкозооксидазного теста («GLUCOSE “E-D”, OLVEX DIAGNOSTICUM, Россия). Активность фермента рассчитывали в ФЕ на мг белка, количество которого определяли методом Lowry. В качестве субстрата использовали ИС-гликозид, который выделяли из спирторастворимой фракции проростков гороха с использованием метода препаративной бумажной хроматографии ранее отработанным методом [18].

Для определения содержания ИС-гликозида и растворимых сахаров навеску растений (0.8–1.0 г) фиксировали десятикратным объемом 96% - этанола, нагретого до +60°C, экстрагировали спиртом и фильтровали. Спиртовой экстракт выпаривали (+60 °C), растворяли в 2 мл 10%-изопропанола и далее проводили разделение методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Silufol" ("Chemapol", Чехия). Локализацию углеводов определяли после проявления свидетелей универсальным проявителем (4% раствор дифениламина в этаноле), по величине R_f и поглощению в УФ. Ко-

личественное определение кетосахаров проводили резорциновым методом, а альдоз после проявления анилинфталатным реактивом. Содержание ИС-гликозида и агликона определяли по поглощению при 212 нм для гликозида и 208 нм для агликона на СФ-56 ("ЛОМО", Россия) [19]. Расчет содержания соединений проводили по калибровочным кривым и выражали в мг на 1 г сырой массы.

Все определения проводили в двух биологических и двух аналитических повторностях. В таблицах представлены данные одного из типичных опытов в виде средних арифметических значений и их стандартных отклонений.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований было показано (табл. 1), что при прорастании семян в надземной части 5-дневных проростков гороха активность всех молекулярных форм связанной с клеточной стенкой β – глюкозидазы была выше, чем цитоплазматической формы. Максимальная активность принадлежала ионно-связанной с клеточной стенкой форме β – глюкозидазы и составляла у 10-дневных растений 18.5 ФЕ мг⁻¹ белка. Для адсорбированной на клеточной стенке молекулярной формы β -глюкозидазы она в этот период достигала величины 10.6 ФЕ мг⁻¹ белка. Для цитоплазматической β -глюкозидазы удельная активность низкой и составляла 2.31 ФЕ мг⁻¹ белка. Активность связанных с клеточной стенкой молекулярных форм β -глюкозидазы при росте проростка возрастала в 1.5-3 раза, но только до 10-дневного возраста, а затем начинала снижаться. К 16 дню роста проростка активность ионно-связанной с клеточной стенкой β -глюкозидазы составила только 32% от исходной и далее оставалась такой же низкой. В тоже время активность цитоплазматической β -глюкозидазы оставалась высокой до конца опыта и составляла 70% от исходной активности.

В процессе вегетационного периода при выращивании растений гороха в условиях мелкоче-

ляночного опыта активность цитоплазматической β -глюкозидазы, начиная с 2-х недельного возраста и до периода формирования семян, значительно изменялась (табл.2). В сухих семенах активность β -глюкозидазы не обнаруживалась, хотя ее можно было определить в семенах на стадии молочной спелости на уровне 1.89±0.06 ФЕ мг⁻¹ белка. Активность фермента в листьях 2-недельных проростков составляла 4.30±0.14 ФЕ мг⁻¹ белка и оставалась достаточно высокой до цветения растений (фаза бутонизации). В то же время в цветах активность β -глюкозидазы отсутствовала. В корнях 2-недельных растений гороха активность β -глюкозидазы была в два раза ниже, чем в листьях проростков.

Одновременно провели изучение содержания специфического для растений гороха ИС - гликозида, расщепляемого β -глюкозидазой, и растворимых углеводов в ходе прорастания и роста растений гороха (табл.3). Как показали наши исследования, в сухих семенах и в семядолях ИС - гликозид и его агликон отсутствовали. Следовые количества их появлялись только на четвертый день, т.е. в момент появления корня. Наибольшее количество гликозида (до 5.76±0.06 мг г⁻¹ сыр. массы) и его агликона (4.76±0.15 мг г⁻¹ сыр. массы) были обнаружены в зеленых частях проростков гороха на 5 день прорастания. Содержание этих соединений было немногим меньше глюкозы и превышало уровень сахарозы. В корнях содержание агликона ИС-гликозида изменялось от 0.84±0.07 до 0.46±0.02 мг г⁻¹ сыр. массы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами исследования показали, что в процессе вегетационного периода растений гороха активность β -глюкозидазы меняется весьма значительно. Ранее уже было показано, что активность растворимой β -глюкозидазы увеличивалась по мере прорастания семян пшеницы и риса [4]. При этом было обнаружено, что максимальная активность β – глюкозидазы клеточных стенок про-

Таблица 1.

Активности цитоплазматической и связанной с клеточными стенками β -глюкозидазы в процессе роста растений гороха *Pisum sativum* (L.) (% от исходной, удельная активность – ФЕ мг⁻¹ белка)

Дни	Молекулярные формы β -глюкозидазы					
	Цитоплазматическая	%	Связанная с клеточными стенками			
			Адсорбированная	%	Ионно-связанная	%
5	0.97±0.02	100	3.08±0.18	100	5.54±0.12	100
7	1.23±0.05	126	3.93±0.10	127	5.55±0.09	101
10	2.31±0.12	238	10.60±0.09	344	18.50±0.14	334
16	2.22±0.16	228	6.89±0.05	223	1.79±0.04	32
27	0.68±0.07	70	0.59±0.03	19	1.85±0.08	33

Таблица 2.
Изменение активности цитоплазматической β -глюкозидазы в онтогенезе растений *Pisum sativum* (L.)

Стадии онтогенеза	β -глюкозидаза ФЕ/мг белка
Листья (2-х недельные проростки)	4.30±0.14
Корни (2-х недельные проростки)	2.54±0.05
Листья в фазу бутонизации	4.00±0.12
Бутоны, цветы	0
Молодые бобы	0
Семена в фазу молочной спелости	1.89±0.06
Сухие семена	0

Таблица 3
Изменение содержания углеводов и специфического ИС-гликозида в листьях проростков гороха в ходе прорастания *Pisum sativum* (L.) (мг. g^{-1} сыр. массы)

Со-единения	Возраст растений (дни)			
	5	6	9	14
Сахароза	2.68±0.09	3.06±0.31	2.56±0.17	1.62±0.17
Глюкоза	7.78±0.64	6.76±0.13	9.54±0.08	10.58±0.82
ИС-гликозид	5.79±0.21	5.04±0.08	5.76±0.06	4.59±0.06
Агликон	3.97±0.35	3.66±0.56	4.76±0.15	1.56±0.04

ростков нута (*Cicer arietinum*) определялась уже на 5 сутки [7]. В нашей работе было установлено, что в сухих семенах гороха активность растворимой β -глюкозидазы не обнаруживалась и начинала появляться при прорастании, достигая максимального значения у 10-дневных проростков. Это совпадает с данными, в которых было показано, что ИС-гликозид не присутствовал в сухих семенах [18,19]. Содержание ИС-гликозида было достаточно высоким с 5 дня роста проростков и сохранялось на таком уровне до 10-14 дней. В корнях содержание ИС-гликозида было всегда более низким, так же как и активность цитоплазматической β -глюкозидазы, расщепляющей данный гликозид. Фермент не обнаруживался также в цветах и бобах, а появлялся лишь в семенах на стадии молочной спелости. Можно говорить о наличии определенной корреляции между содержанием ИС-гликозида и активностью β -глюкозидазы, расщепляющей его, в процессах прорастания и роста растений гороха. Вероятно, важная роль ИС-гликозида заключается в его способности пополнять фонд растворимых углеводов, необходимых для дыхательного метаболизма клеток, под действием цитоплазматической β -глюкозидазы. Кроме этого, как пока-

зали наши исследования [16], цитоплазматическая β -глюкозидаза может проявлять и трансгликозидазную активность, поставляя глюкозу для реакций синтеза других гликозидов в ходе онтогенеза растений гороха. Активность связанных с клеточной стенкой форм β -глюкозидазы в период роста растений гороха была всегда выше, чем цитоплазматической β -глюкозидазы в 5-7 раз, но только у молодых проростков (5-10-дневных), а затем начинала резко падать. По мнению ряда авторов [20], возрастание активности ионно-связанной с клеточными стенками β -глюкозидазы прорастающих семян риса свидетельствует о том, что эта молекулярная форма фермента может участвовать в метаболизме веществ клеточных стенок.

Таким образом, полученные нами результаты позволяют заключить, что цитоплазматическая и связанные с клеточной стенкой молекулярные формы β -глюкозидазы выполняют различные функции в клетках в процессах роста и развития растений гороха. Увеличение и поддержание высокой активности цитоплазматической β -глюкозидазы позволяет пополнять фонд глюкозы для дыхательного метаболизма клеток активно растущих растений гороха в результате гидролиза специфического ИС-гликозида, а также катализировать реакции трансгликозидирования с образованием других гликозидов. В то же время связанные с клеточной стенкой адсорбированная и ионно-связанная молекулярные формы β -глюкозидазы, активность которых резко падает с возрастом растений, обеспечивают участие глюкозы, образующейся при гидролизе специфического ИС-гликозида, в процессах формирования веществ клеточных стенок именно молодых, активно растущих проростков гороха.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hsieh M-C., Graham T.L. // *Phytochemistry*. 2001. Vol. 58. pp. 995-1005.
2. Blomstedt C.K. // *Plant Biotechnology Journal*. 2012. Vol. 10. pp. 54-66.
3. Moshe R., Zohar S., Dalia E., Amots H. // *Plant Sci*. 1999. Vol. 147. № 1. pp. 19-24.
4. Sue M., Yamazaki K. // *Plant Physiology*. 2006. Vol. 141. pp. 1237-1247.
5. Гуриелидзе К.Г., Пасешниченко В.А., Васильева И.С. // *Биохимия*. 1987. Т.52. В.4. С.562-568.
6. Чкаников Д.И., Тарабрин Г.А., Шабанова А.М. // *Физиология растений*. 1969. Т.16. В.2. С.322-325.

Ершова А. Н., Винокурова Н. В., Баркалова О. Н.

7. Dopico B., Gregorio N., Emilia L. // *Plant Physiol.* 1991. Vol. 137. № 4. pp. 477-482.
8. Shah M.A., Mishra C.S. // *New Biotechnology.* 2012. Vol. 29, № 3, pp. 311-320.
9. Пасешниченко В.А. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 1989. Т.25. № 4. С.435-449.
10. Hsieh M-C., Graham T.L. // *Phytochemistry.* 2001. Vol. 58. pp. 995-1005.
11. Verdoucq L., Moriniere J., Bevan D.R., Esen A., Vasella A. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, №30. pp. 31796-31803.
12. Masayuki C., Jshihara A., Jwamura H. // *Planta.* 2000. V. 210. pp. 432-438.
13. Ershova A.N // *Eur. J. Biochemistry.* 2001. Vol. 268. № 1. pp. 250-251.
14. Zemlianukhin A.A., Ershova A.N. // *Biochem. Physiol. Pflanzen.* 1984. Vol. 179. № 8. pp. 679-684.
15. Ершова А.Н., Еремина Н.А. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2006. Т.6. №.3. С. 432-440.
16. Ершова А.Н., Баркалова О.Н., Фатуллаева А.С. // *Вестник Воронежского государственного университета. серия Химия, Биология, Фармация.* 2011. № 2. С. 88-91.
17. Carmen R.S. // *J. Agr. and Food Chem.* 2009. Vol. 57. № 17. pp. 7983-7988.
18. Ершова А.Н. *Метаболическая адаптация растений к гипоксии и повышенному содержанию диоксида углерода.* Воронеж, Из-во Воронеж. Гос. ун-та, 2007, 264с.
19. Ershova A.N., Vinokurova N.V. // *International Journal of Secondary Metabolite (IJSM).* 2018. Vol. 5. № 2. pp. 156-162.
20. Takashi A. // *Plant and Cell Physiol.* 1997. Vol. 38. pp. 128-132.

Воронежский государственный педагогический университет

**Ершова А. Н., доктор биологических наук, профессор, Естественно-географический факультет*

Email: aershova@vspu.ac.ru

Винокурова Н. В., ассистент кафедры биологии растений и животных

Баркалова О. Н., аспирант кафедры биологии растений и животных

Voronezh State Pedagogical University

*Ershova A. N., PhD., DSci., Full Professor, Department of Natural Science and Geography
Email: aershova@vspu.ac.ru*

Vinokurova N. V., assistant of Plant and Animal Biology Chair

Barkalova O. N., post-graduate student of Plant and Animal Biology Chair

CYTOPLASMIC AND CELL WALL-BOUND β -GLUCOSIDASE ACTIVITY DURING ONTOGENESIS IN PLANTS OF *PISUM SATIVUM* L.

A. N. Ershova, N. V. Vinokurova, O. N. Barkalova

Voronezh State Pedagogical University

Abstract. Activity of cytoplasmic and cell wall-bound molecular forms of β -glucosidase (EC 3.2.1.210) which is degrading plant specific isosuccinimide- β -glucoside (IS-glycoside) during germination and growth of *Pisum sativum* L. was determined. Pea plants (Ramonskiy 77) were grown hydroponically or during small plot experiments until ripening stage. β -glucosidase activity was determined with IS-glycoside used as a substrate by the amount of glucose formed. Adsorbed β -glucosidase was extracted by cell wall residue washing with 1 M of phosphate-citric buffer (pH 6.0) and ion-bound form with 1 M of NaCl. Simultaneously in plants the content of IS-glycoside and soluble sugars were measured by thin layer chromatography method. It was shown that in over ground part of 5-day-old pea seedlings the activity of cell wall-bound β -glucosidase was higher than cytoplasmic one. It was 1.5-3-fold increasing and for 10-day-old seedlings for ion-bound with cell wall was 18.50 ± 0.14 and for adsorbed 10.6 ± 0.09 EU mg⁻¹. But later it started sharply decreasing. In dry seeds the activity of β -glucosidase was not detected but it was diagnosed in seeds on milky stage (1.89 ± 0.06 EU mgr⁻¹ of protein). Activity of cytoplasmic β -glucosidase

in leaves of 2-week-old seeds was 4.30 ± 0.14 EU mg⁻¹ of protein and remained relatively high till flowering (bud-formation period) though in roots it was substantially lower. IS-glycoside was also not detected in dry seeds. Amount of IS-glycoside in leaves of 10-day-old seedlings was 5.76 ± 0.06 mg g⁻¹ of wet weight which was little lower of glucose but exceeded the level of saccharose. In roots the content of IS-glycoside was always lower as cytoplasmic β -glucosidase activity. Our results show that cytoplasmic and cell wall-bound molecular forms of β -glucosidase are responsible for different functions in ontogenesis of pea plants. Relatively high activity of cytoplasmic β -glucosidase in leaves during all growth stages allows to refill a fund of glucose for respiratory cell metabolism in pea plants through specific IS-glycoside hydrolysis and be involved in transglycosidation reaction with formation of other glycosides. Cell wall-bound adsorbed and ion-bound molecular forms of β -glucosidase which activity is significantly decreasing with aging, provide participation of IS-glycoside as a glucose supplier in construction of cell wall substances in young and actively growing pea seedlings.

Keywords: β -glucosidase, cytoplasmic, cell wall-bound, activity, isosuccinimide- β -glucoside, ontogenesis, pea plants.

REFERENCES

1. Hsieh M-C., Graham T.L., *Phytochemistry*, 2001, Vol. 58, pp. 995-1005.
2. Blomstedt C.K., *Plant Biotechnology Journal*, 2012, Vol. 10, pp. 54-66.
3. Moshe R., Zohar S., Dalia E., Amots H., *Plant Sci.*, 1999, Vol. 147, No. 1, pp. 19-24.
4. Sue M., Yamazaki K., *Plant Physiology*, 2006, Vol. 141, pp. 1237-1247.
5. Gurielidze K.G., Paseshnichenko, Vasileva I.S., *Biochemistry*, 1987, Vol. 52, No. 4, pp. 562-568.
6. Chkanikov D.I., Tarabrin G.A., Shabanova A.M., *Plant Physiology*, 1969, Vol. 16, No. 2, pp. 322-325.
7. Dopico B., Gregorio N., Emilia L., *Plant Physiol.*, 1991, Vol. 137, No. 4, pp. 477-482.
8. Shah M.A., Mishra C.S., *New Biotechnology*, 2012, Vol. 29, No. 3, pp. 311-320.
9. Paseshnichenko V.A., *Applied biochemistry and microbiology*, 1989, Vol 5, No. 4, pp. 435-449.
10. Hsieh M-C., Graham T.L., *Phytochemistry*, 2001, Vol. 58, pp. 995-1005.
11. Verdoucq L., Moriniere J., Bevan D.R., Esen A., Vasella A., *J. Biol. Chem.*, 2004, Vol. 279, No. 30, pp. 31796-31803.
12. Masayuki C., Jshihara A., Jwamura H., *Planta*, 2000, Vol. 210, pp. 432-438.
13. Ershova A.N., *Eur. J. Biochemistry*, 2001, Vol. 268, No.1, pp. 250-251.
14. Zemlianukhin A.A., Ershova A.N., *Biochem. Physiol. Pflanzen*, 1984, Vol. 179, No 8, pp. 679-684.
15. Ershova A.N., Eremina N.A., *Sorbition and chromatographic processes*, 2006, Vol. 6, No. 3, pp. 432-440.
16. Ershova A.N., Barkalova O.N., Fatullaeva A.S., *Herald of Voronezh State University. Serie Chemistry, Biology, Pharmacy*, 2011, No. 2, pp. 88-91.
17. Carmen R.S., *J. Agr. and Food Chem.*, 2009, Vol. 57, No. 17, pp. 7983-7988.
18. Ershova A.N. *Metabolicheskaya adaptatsiya rastenij k gipoksii i povyshennomu soderzhaniyu dioksida ugleroda*. Voronezh, Voronezh State Univ. Publ., 2007, 264 p.
19. Ershova A.N., Vinokurova N.V., *International Journal of Secondary Metabolite (IJSM)*, 2018, Vol. 5, No. 2, pp. 156-162.
20. Takashi A., *Plant and Cell Physiol.*, 1997, Vol. 38, pp. 128-132.