

РЕГУЛЯТОРНЫЕ СВОЙСТВА АСПАРТАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ ИЗ *SPIRODELA* *POLYRHIZA*

Т. И. Рахманова, Т. Н. Попова, О. А. Сафонова

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 11.01.2020 г.

Аннотация. В ходе разработанной процедуры очистки были получены ферментные препараты аспартаминотрансферазы (АсАТ, КФ 2.6.1.1) из цитоплазматической и хлоропластной фракций ряски *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae), клон SJ, которые были использованы в дальнейшем для исследования регуляторных свойств различно локализованных форм фермента. Показано, что на каталитическую активность АсАТ могут оказывать влияние ключевые метаболиты азотного обмена – глутамат, глутамин и аспаргат. Выявлено, что в цитоплазматической фракции глутамин ингибирует каталитическое действие АсАТ в ходе прямой реакции, а при обратном трансаминировании является неконкурентным активатором фермента по отношению к L-глутамату. При этом L-аспартат выступает конкурентным ингибитором цитоплазматической формы АсАТ по отношению к L-глутамату. В хлоропластах *Spirodela polyrhiza* L-глутамат и L-глутамин оказывают сходный ингибирующий эффект на протекание прямой аминотрансферазной реакции, а при обратном трансаминировании L-глутамин может повышать скорость ферментативной реакции.

Установлено, что некоторые интермедиаты цикла трикарбоновых кислот могут влиять на состояние трансаминазного равновесия АсАТ-реакции – цитрат, изоцитрат и сукцинат. Так, цитрат является конкурентным ингибитором фермента по отношению к оксалоацетату в ходе обратного трансаминирования, а изоцитрат и сукцинат – конкурентными ингибиторами АсАТ по отношению к 2-оксоглутарату в ходе прямой реакции в цитоплазматической фракции *Spirodela polyrhiza*. Графическим методом Диксона определены константы ингибирования. Показано, что в хлоропластной фракции сукцинат и изоцитрат оказывают сходное ингибирующее влияние на каталитическое действие фермента как в ходе прямого, так и в ходе обратного трансаминирования. Влияние цис-аконитата, транс-аконитата и фумарата на активность АсАТ как в цитоплазме, так и в хлоропластах клеток не установлено.

Предполагается, что контроль углеродного и азотного метаболизма может осуществляться путем распределения 2-оксоглутарата между различными метаболическими процессами с помощью регуляторных механизмов, воздействующих на активности различно локализованных форм АсАТ в клетках *Spirodela polyrhiza*.

Ключевые слова: *Spirodela polyrhiza*, аспартаминотрансфераза, регуляция.

Аспартаминотрансфераза (АсАТ, КФ 2.6.1.1) катализирует реакцию обратимого переноса аминокислотной группы с L-аспартата или L-глутамата к соответствующим кетокислотам – 2-оксоглутарату и оксалоацетату. Физиологическое значение АсАТ определяется участием этого фермента во многих обменных процессах [1]. Считают, что аспартаминотрансферазная реакция, наряду с изоцитрат-дегидрогеназной, может иметь значение в сопряжении углеродного и азотного метаболизма на уровне ферментативного превращения 2-оксоглутарата – наиболее активного акцептора аминных групп

[2, 3]. В литературе встречается много данных относительно каталитических свойств фермента из клеток животных и микроорганизмов [4 - 10]. Однако исследования особенностей функционирования АсАТ в растительных клетках единичны [11, 12]. Особенно это касается регуляции активности фермента не только в ходе прямого, но и обратного трансаминирования, что может иметь значение для распределения потоков 2-оксоглутарата между различными метаболическими процессами.

В этой связи целью данной работы явилось исследование некоторых регуляторных свойств различно локализованных форм АсАТ, выделенных из ряски *Spirodela polyrhiza*.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В качестве объекта исследования использовали вегетативные талломы *Spirodela polyrhiza* (сем. Lemnaceae), клон SJ, которые культивировали в стерильных условиях при 25° С. Питательные среды стерилизовали 30 мин при 120° С и 0.22 МПа [13]. Активность фермента определяли спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Реакцию начинали внесением ферментного препарата в среду. О скорости прямого трансаминирования под действием АсАТ судили по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДН, протекающего за счет осуществления сопряженных ферментативных реакций: образования оксалоацетата под действием АсАТ и его последующего превращения, взаимосвязанного с окислением НАДН под действием малатдегидрогеназы [14, 15].

Измерение активности АсАТ из *Spirodela polyrhiza* проводили в 0.05 М калий-фосфатном буфере (рН 7.5), содержащем 0.9 мМ (для цитоплазматической АсАТ) и 1.6 мМ (для хлоропластной АсАТ) L-аспартата, 2.7 мМ (для цитоплазматической АсАТ) и 4 мМ (для хлоропластной АсАТ) 2-оксоглутарата, 0.1 мМ НАДН, 1 ед./мл малатдегидрогеназы. Контрольная проба не содержала L-аспартат. О скорости обратного трансаминирования под действием АсАТ судили по уменьшению оптической плотности в результате окисления НАДФН, протекающего за счет осуществления сопряженных ферментативных реакций: образования 2-оксоглутарата под действием АсАТ и его последующего превращения, взаимосвязанного с окислением НАДФН под действием изоцитратдегидрогеназы [16]. Активность АсАТ из *Spirodela polyrhiza* измеряли в 0.05 М калий-фосфатном буфере (рН 7.5), содержащем 1 мМ (для цитоплазматической АсАТ) и 1.2 мМ (для хлоропластной АсАТ) L-глутамата, 5 мМ (для цитоплазматической АсАТ) и 4.2 мМ (для хлоропластной АсАТ) оксалоацетата, 0.4 мМ НАДФН, 0.5 мМ $MnCl_2$, 10 мМ $NaHCO_3$, 1 ед./мл изоцитратдегидрогеназы. Контрольная проба не содержала L-глутамат. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующее образование 1 мкмоль продукта реакции за 1 мин при температуре 25°С. Белок определяли по Лоури [17] и с модификацией Юу и Стика [18] для проб, содержащих Triton X-100.

Для получения очищенных препаратов АсАТ были разработаны процедуры, включающие несколько стадий. После гомогенизации растительного материала выделяли хлоропласты методом

дифференциального центрифугирования [12]; от низкомолекулярных соединений фермент отделяли гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Фермент элюировали 0.05 М калий-фосфатным буфером (рН 7.8), содержащим 1 мМ ЭДТА и 1%-ный β-меркаптоэтанол. Завершающий этап очистки представлял собой колоночную ионообменную хроматографию на ДЭАЭ-тойоперл. Среда элюции, используемая на данной стадии, имела тот же состав, что и буфер, применяемый в ходе предварительной гель-фильтрации через сефадекс G-25. Для очистки фермента применяли ступенчатый градиент KCl в среде элюции: 10–20 мМ – для хлоропластной АсАТ и 30–50 мМ – для цитоплазматической формы фермента. Все операции проводили в холодной камере при 0 ... +4°С.

Опыты проводили в 3–4 - кратной повторяемости, аналитические определения для каждой пробы – в двукратной, результаты опытов сравнивали с контролем. Обсуждаются статистически значимые различия при $p > 0.05$.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе разработанной процедуры очистки были получены ферментные препараты цитоплазматической и хлоропластной АсАТ из *Spirodela polyrhiza* (табл. 1).

Выявлено, что в регуляции активности АсАТ могут принимать интермедиаты азотного обмена – ряд аминокислот. Так, глутамат при концентрациях до 1 мМ повышает активность цитоплазматической формы фермента в ходе прямой аминотрансферазной реакции на 30%, при концентрациях более 1.5 мМ активность АсАТ становится значительно ниже контрольного уровня. Глутамин при концентрациях до 0.5 мМ оказывает несущественный активирующий эффект, а при более высоких концентрациях ингибирует каталитическое действие фермента в ходе прямой реакции. При обратном трансаминировании данный метаболит является неконкурентным активатором фермента по отношению к L-глутамату. Выявлено, что L-аспартат – конкурентный ингибитор цитоплазматической формы АсАТ по отношению к L-глутамату. Определены константы ингибирования и активации, которые представлены в таблице 2. К сожалению, в связи с высокой степенью нестабильности АсАТ из *Spirodela polyrhiza*, что характерно для ферментов из большинства растительных источников, особенно хлоропластной формы, константы ингибирования и активации последней определить не удалось.

Таблица 1.

Очистка аспаратаминотрансферазы из *Spirodela polyrhiza*

Стадия очистки	Объем фракции, мл	Активность, Е	Количество белка, мг	Удельная активность, Е/мг белка	Выход, %	Степень очистки
Цитоплазматическая						
Гомогенат	9.8	1.60 ± 0.750	39.6 ± 1.9	0.040 ± 0.002	(100)	(1)
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	15.0	1.46 ± 0.063	22.8 ± 1.1	0.064 ± 0.003	91.5	1.6
Хроматография на ДЭАЭ-тойоперл	24.3	0.404 ± 0.019	0.287 ± 0.013	1.41 ± 0.007	25.3	35.2
Хлоропластная						
Фракция хлоропластов	4.2	0.173 ± 0.007	11.5 ± 0.5	0.015 ± 0.001	(100)	(1)
Гель-фильтрация на сефадексе G-25	8.0	0.153 ± 0.006	7.29 ± 0.35	0.021 ± 0.001	88.4	1.4
Хроматография на ДЭАЭ-тойоперл	13.4	0.039 ± 0.001	0.085 ± 0.003	0.459 ± 0.021	22.9	30.6

Примечание. Приведены средние арифметические значения показателей и их стандартные ошибки, рJ 0.05 (для табл. 1–2).

В ходе протекания прямой аминотрансферазной реакции в хлоропластах *Spirodela polyrhiza* L-глутамат и L-глутамин оказывают сходный ингибирующий эффект при концентрациях более 1 мМ. При этом установлено, что L-глутамин может повышать скорость обратного трансминирования в данной клеточном компартменте при концентрациях более 0.8 мМ. Аргинин, аланин, валин и лейцин практически не оказывают существенного влияния на протекания АсАТ-реакции в хлоропластах *Spirodela polyrhiza*.

Таблица 2.

Константы ингибирования (K_i) и активации (K_a) цитоплазматической АсАТ из *Spirodela polyrhiza* некоторыми интермедиатами цикла Кребса и аминокислотами

Метаболит	Константы ингибирования (K_i) и активации (K_a), мМ
	АсАТ: прямая аминотрансферазная реакция
Изоцитрат	$K_i = 5.80 \pm 0.04$
Сукцинат	$K_i = 4.60 \pm 0.05$
L-глутамат	$K_i = 3.00 \pm 0.08$
L-глутамин	$K_i = 4.20 \pm 0.14$
	АсАТ: обратная аминотрансферазная реакция
Цитрат	$K_i = 4.50 \pm 0.05$
L-аспарат	$K_i = 2.20 \pm 0.05$
L-глутамин	$K_a = 1.20 \pm 0.03$

Установлено, что некоторые интермедиаты цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) могут влиять на скорость метаболических превращений 2-оксоглутарата в ходе АсАТ-реакции. Так, цитрат при концентрациях до 0.5 мМ незначительно увеличивает активность АсАТ в ходе прямой реакции в цитоплазме *Spirodela polyrhiza*, в то время как при этих же концентрациях оказывает ингибирующий

эффект конкурентного характера по отношению к оксалоацетату в ходе обратного трансминирования. Изоцитрат, сукцинат являются конкурентными ингибиторами фермента по отношению к 2-оксоглутарату. Константы ингибирования, определенные графическим методом Диксона [19], представлены в таблице 2. Фумарат, малат, цис-аконитат и транс-аконитат практически не влияют на скорость АсАТ-реакции в цитоплазме *Spirodela polyrhiza*. В ходе исследования влияния ряда интермедиатов ЦТК на активность хлоропластной АсАТ установлено, что малат при концентрациях 0.1–0.3 мМ повышает скорость протекания обратной трансминазной реакции, при более высоких концентрациях стимулирующий эффект уменьшается. Сукцинат, изоцитрат при концентрациях более 0.5 мМ оказывают сходное ингибирующее влияние на каталитическое действие фермента как в ходе прямой, так и в ходе обратной аминотрансферазной реакции. Влияние цитрата, цис-аконитата, транс-аконитата и фумарата на активность хлоропластной изоформы АсАТ не установлено.

Обнаруженные эффекты ряда аминокислот и интермедиатов ЦТК свидетельствуют о возможной координации функционирования АсАТ в растительной клетке с НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназой (НАДФ-ИДГ, КФ 1.1.1.42), результаты исследования которой нами были опубликованы ранее [20]. Так, установлено, что цитрат повышает скорость образования 2-оксоглутарата в ходе ИДГ-реакции и подавляет его синтез в процессе обратного трансминирования, катализируемого АсАТ. Цис-аконитат и транс-аконитат оказывают разнонаправленное действие на различно локализованные изоформы НАДФ-

ИДГ в клетках *Spirodela polyrhiza*, в то время как на скорость протекания АсАТ-реакции данные метаболиты не влияют. Наибольшее воздействие на метаболические превращения 2-оксоглутарата оказывают изоцитрат и сукцинат. Различно локализованные изоформы ферментов отличаются по чувствительности к концентрациям ряда аминокислот, что также может иметь значение для регуляции ферментативных превращений 2-оксоглутарата, протекающих в цитоплазме и хлоропластах растительной клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы установлено, что на состояние трансаминазного равновесия АсАТ-реакции могут влиять ряд ключевых интермедиатов азотного обмена и некоторые метаболиты ЦТК. Очевидно, контроль углеродного и азотного метаболизма в *Spirodela polyrhiza* может осуществляться путем распределения 2-оксоглутарата между различными метаболическими процессами с помощью регуляторных механизмов, воздействующих на активности различно локализованных форм АсАТ. При этом регуляция активности АсАТ часто имеет множественный и разнонаправленный характер по сравнению с регуляцией активности НАДФ-ИДГ, которая также функционирует в точке сопряжения углеродного и азотного метаболизма на уровне ферментативных превращений 2-оксоглутарата. Вероятно, возможна активация каталитического действия одного фермента при сопутствующем снижении уровня активности другого.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Otto-Ślusarczyk D, Graboń W, Mielczarek-Putna M. // Postepy Hig Med Dosw (Online). 2016. Vol.70, pp. 219–230.
2. Galvez S., Lancien M., Hodges M. // Trends Plant Sci. 1999. Vol. 4, pp. 484–490.
3. Рахманова Т.И., Попова Т.Н. // Биохимия. 2006. Т. 71. Вып. 2. С. 266–274.

Воронежский государственный университет
*Рахманова Т. И., к.б.н., доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии
E-mail: rtyana@mail.ru

Попова Т. Н., д.б.н., профессор кафедры медицинской биохимии и микробиологии

Сафонова О. А., к.б.н., доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии

4. Cascante M., Cortes A., Bozal J. // Int. J. Peptide and Protein Res. 1987. Vol. 30, pp. 668–675.
5. Gil M., Cascante M., Cortes A., Bozal J. // Int. J. Biochem. 1987. Vol. 19, pp. 355–363.
6. McConnell J., Anderson D. // Clin. Chem. 1993. Vol. 39, p. 1158.
7. Vessal M., Taher M. // Compar. Biochem. Physiol. B Biochem Mol Biol. 1995. Vol. 110. №2, pp. 431–437.
8. Ciereszko A., Strezek J. // Int. J. Biochem. 1989. Vol. 21, pp. 1343–1351.
9. Jeong S.Y., Jin H., Chang J.H. // PLoS One. 2019. Vol. 14. № 8, pp. 1–16.
10. Almo S.C., Smith D.L., Danishefsky A.T., Ringe D. // Protein Eng. : journal. 1994. Vol. 7. № 3, pp. 405–412.
11. de la Torre F., Cañas R.A., Pascual M.B., Avila C., Cánovas F.M. // J Exp Bot. 2014. Vol. 65. № 19, pp. 5527–5534.
12. Рахманова Т.И., Попова Т.Н., Семенихина А.В. // Известия РАН. Серия биологическая, 2006. № 4. С. 430–436.
13. Appenroth K.J., Gabrys H. // Photochem Photobiol. 2001. Vol. 73. № 1, pp. 77–82.
14. Северин С.Е. Практикум по биохимии. Москва, Изд-во МГУ, 1989, 509 с.
15. Yamanaka H., Laluece C., Oliveira-Neto G.de. // Anal. Lett. 1995. Vol. 28. № 13, pp. 2305–2316.
16. Попова Т.Н., Землянхин А.А., Игамбердиев А.У., Садохина Е.Ю. // Биохимия. 1990. Т. 55. С. 2011–2018.
17. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 194, pp. 265–275.
18. Yu Y., Steek T.L. // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250, pp. 9170–9175.
19. Dixon M., Webb E.C. Enzymes. Third edition. New York, USA Acad. Press Inc., 1979, pp. 350–354.
20. Popova T.N., Rakhmanova T.I., Appenroth K.-J. // J. Plant Physiology. 2002. Vol.159, pp. 231–237.

Voronezh State University
*Rakhmanova T. I., Ph.D., Associate Professor, Dept. of Medical Biochemistry and Microbiology
E-mail: rtyana@mail.ru

Popova T. N., Ph.D., D.Sci., Full Professor, Dept. of Medical Biochemistry and Microbiology

Safonova O. A., Ph.D., Associate Professor, Dept. of Medical Biochemistry and Microbiology

REGULATORY PROPERTIES OF ASPARTATE AMINOTRANSFERASE FROM *SPIRODELA POLYRHIZA*

T. I. Rakhmanova, T. N. Popova, O. A. Safonova

Voronezh State University

Abstract. Enzyme preparations of aspartataminotransferase (AsAT, EC 2.6.1.1) from the cytoplasmic and chloroplast fractions of *Spirodela polyrhiza* (Lemnaceae), strain SJ, were obtained during the developed purification procedure, which has been used to investigate the regulatory properties of the enzyme. It has been shown that the catalytic activity of AsAT can be influenced by the key metabolites of nitrogen exchange of glutamate, glutamine and aspartate. In the cytoplasmic fraction, glutamine has been shown to inhibit the catalytic action of AsAT during a direct reaction, and in reverse transamination is a non-competitive enzyme activator relative to L-glutamate. L-aspartate is a competitive inhibitor of the cytoplasmic form of AsAT relative to L-glutamate. In chloroplasts of *Spirodela polyrhiza* L-glutamate and L-glutamine have a similar inhibiting effect on the direct aminotransferase reaction, and in reverse transamination L-glutamine can increase the speed of the enzymatic reaction.

It has been found that some intermediates of tricarboxylic acid cycle can affect the transaminase equilibrium of the AsAT reaction (citrate, isocitrate and succinate). For example, citrate is a competitive inhibitor of the enzyme relative to oxaloacetate during reverse transamination, and isocitrate and succinate are competitive inhibitors of AsAT relative to 2 oxoglutarate in a direct reaction in the cytoplasmic fraction of *Spirodela polyrhiza*. The Dixon graphical method defines the inhibition constants. In the chloroplast fraction succinate and isocitrate have been shown to have a similar inhibitory effect on the catalytic action of the enzyme during both direct and reverse transamination. The effects of cis-aconitate, trans-aconitate and fumarate on AsAT activity in both cytoplasm and chloroplasts of cells are unknown.

It is assumed that the control of carbon and nitrogen metabolism can be controlled by distributing 2-oxoglutarate between different metabolic processes using regulatory mechanisms. In *Spirodela polyrhiza* cells, a number of localized forms of AsAT affect activity.

Keywords: *Spirodela polyrhiza*, aspartate aminotransferase, regulation.

REFERENCES

1. Otto-Ślusarczyk D., Graboń W., Mielczarek-Putka M., Postepy Hig Med Dosw (Online), 2016, Vol.70, pp. 219-230. DOI: Available at: 10.5604/17322693.1197373 (accessed 27.09.2020).
2. Galvez S., Lancien M., Hodges M., Trends Plant Sci., 1999, Vol. 4, pp. 484–490. DOI: Available at: [https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385\(99\)01500-9](https://www.cell.com/trends/plant-science/fulltext/S1360-1385(99)01500-9) (accessed 27.09.2019).
3. Rakhmanova T.I., Popova T.N., Biokhimiya, 2006, Vol. 71, Vyp. 2, pp. 266-274.
4. Cascante M., Cortes A., Bozal J., Int. J. Peptide and Protein Res., 1987, Vol. 30, pp. 668–675. DOI: Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1987.tb03378.x> (accessed 23.05.2018).
5. Gil M., Cascante M., Cortes A., Bozal J., Int. J. Biochem., 1987, Vol. 19, pp. 355–363. DOI: Available at: 10.1016/0020-711x(87)90009-7 (accessed 23.05.2018).
6. McConnell J., Anderson D., Clin. Chem., 1993, Vol. 39, p. 1158. DOI: Available at: <https://doi.org/10.1093/clinchem/39.6.1120> (accessed 15.05.2019).
7. Vessal M., Taher M., Compar. Biochem. Physiol. B Biochem Mol Biol., 1995, Vol. 110, No 2, pp. 431–437. DOI: Available at: 10.1016/0305-0491(94)00143-i (accessed 15.05.2020).
8. Ciereszko A., Strezek J., Int. J. Biochem., 1989, Vol. 21, pp. 1343–1351. DOI: Available at: 10.1016/0020-711x(89)90154-7 (accessed 25.04.2020).
9. Jeong S.Y., Jin H., Chang J.H., PLoS One, 2019, Vol. 14, No 8, pp. 1–16. DOI: Available at: 10.1371/journal.pone.0221975 (accessed 19.04.2020).
10. Almo S.C., Smith D.L., Danishefsky A.T., Ringe D., Protein Eng. : journal, 1994, Vol. 7, No 3, pp. 405–412. DOI: Available at: 10.1093/protein/7.3.405 (accessed 19.04.2020).
11. de la Torre F., Cañas R.A., Pascual M.B., Avila C., Cánovas F.M., J Exp Bot., 2014, Vol. 65, No 19, pp. 5527-5534. DOI: Available at: 10.1093/jxb/eru240 (accessed 15.07.2019).
12. Rakhmanova T.I., Popova T.N., Semenikhina A.V., Izvestiya RAN. Seriya biologicheskaya, 2006, No 4, pp. 430–436.
13. Appenroth K.J., Gabrys H., Photochem Photobiol., 2001, Vol.73, No 1, pp. 77–82. DOI:

Available at: [10.1562/0031-8655\(2001\)073<0077:lisdin>2.0.co;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)073<0077:lisdin>2.0.co;2). (accessed 16.07.2019).

14. Severin S.E. Praktikum po biokhimii. Moskva, MGU Publ, 1989, 509 p.

15. Yamanaka H., Laluec C., Oliveira-Neto G.de., Anal. Lett., 1995, Vol. 28, No 13, pp. 2305–2316. DOI: Available at: <https://doi.org/10.1080/00032719508000374> (accessed 23.07.2019).

16. Popova T.N., Zemlyanukhin A.A., Igamberdiev A.U., Sadokhina E.Yu., Biokhimiya, 1990, Vol. 55, pp. 2011–2018.

17. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R., J. Biol. Chem., 1951, Vol. 194, pp. 265–275.

DOI: Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14907713/> PMID: 14907713 (accessed 23.09.2015).

18. Yu Y., Steek T.L., J. Biol. Chem., 1975, Vol. 250, pp. 9170–9175. DOI: Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1194279/> PMID: 1194279 (accessed 23.09.2015).

19. Dixon M., Webb E.C. Enzymes. Third edition. New York, USA Acad. Press Inc., 1979, pp. 350–354.

20. Popova T.N., Rakhmanova T.I., Appenroth K.-J., J. Plant Physiology, 2002, Vol. 159, No 3, pp. 231–237. DOI: Available at: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00630> (accessed 16.09.2017).