

ИНСТИТУТ ЛЕСА – ОБОСОБЛЕННОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО
ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ
ФЕДЕРАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ЦЕНТРА
«КАРЕЛЬСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



Никерова Ксения Михайловна

АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ АНТИОКСИДАНТНОЙ СИСТЕМЫ
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ СЦЕНАРИЕВ КСИЛОГЕНЕЗА
У *BETULA PENDULA* ROTH И *PINUS SYLVESTRIS* L.

03.01.05 – «Физиология и биохимия растений»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук
Галибина Наталия Алексеевна

Петрозаводск 2020

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Причины формирования структурных аномалий у древесных растений	14
1.1.1. Формирование узорчатой древесины у <i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i>	17
1.1.2. Формирование косослойной древесины у <i>P. sylvestris</i>	20
1.1.3. Роль ауксина при формировании узорчатой и косослойной древесины	23
1.1.4. Ауксин и антиоксидантная система	24
1.2. Активные формы кислорода и ферменты антиоксидантной системы – активные участники метаболизма растения	27
1.2.1. Супероксиддисмуза	34
1.2.2. Каталаза	38
1.2.3. Пероксидаза	40
1.2.4. Полифенолоксидаза	44
1.2.5. Взаимодействие компонентов АОС	47
1.3. Активность ферментов антиоксидантной системы в жизни растения	48
1.3.1. Участие в процессах роста, дифференциации и старения	48
1.3.2. Участие в процессах образования различных по составу клеточных стенок	50
1.3.3. Антиоксидантная система растений и фенольный метаболизм	55
1.3.4. Антиоксидантная система растений и углеводный метаболизм	57
1.4. Поиск маркеров процессов ксилогенеза	62
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	65
2.1. Растительный материал	65
2.1.1. <i>B. pendula</i>	65
2.1.2. <i>P. sylvestris</i>	66
2.2. Отбор растительного материала	68
2.3. Биохимические исследования	69
2.3.1. Определение активности ферментов	69

2.3.1.1. <i>Определение активности апопластной инвертазы</i>	70
2.3.1.2. <i>Определение активности сахарозосинтазы</i>	70
2.3.1.3. <i>Определение активности пероксидазы</i>	70
2.3.1.4. <i>Модификация способа определения активности супероксиддисмутазы</i>	71
2.3.1.5. <i>Модификация способа определения активности каталазы</i>	73
2.3.1.6. <i>Модификация способа определения активности полифенолоксидазы</i>	76
2.3.1.7. <i>Определение оптимумов pH для пероксидазы и полифенолоксидазы</i>	78
2.3.2. <i>Определение содержания целлюлозы</i>	79
2.3.3. <i>Определение содержания лигнина</i>	80
2.3.4. <i>Определение содержания фенолов</i>	80
2.4. <i>Статистическая обработка данных</i>	80
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	82
3.1. <i>Годичная динамика активности пероксидазы и каталазы в тканях ствола у двух форм <i>V. pendula</i>, различающихся по структуре древесины</i>	82
3.1.1. <i>Активность каталазы у двух форм <i>V. pendula</i>, отличающихся по структуре древесины</i>	83
3.1.2. <i>Активность пероксидазы у двух форм <i>V. pendula</i>, отличающихся по структуре древесины</i>	86
3.2. <i>Распределение активности ферментов АОС в камбиальной зоне растений <i>V. pendula</i> при разных сценариях ксилогенеза</i>	90
3.2.1. <i>Закономерности изменения активности исследуемых ферментов в ксилеме⁹²</i>	
3.2.2. <i>Закономерности изменения активности исследуемых ферментов во флоэме⁹³</i>	
3.3. <i>Участие ферментов антиоксидантной системы в формировании древесины <i>V. pendula</i> var. <i>carelica</i> с разной степенью развития структурных аномалий</i>	96
3.3.1. <i>Период активного вторичного утолщения клеточных стенок</i>	97
3.3.2. <i>Период активного формирования ранней тонкостенной древесины</i>	100
3.3.3. <i>Ферменты антиоксидантной системы – возможные биохимические маркеры аномальной древесины</i>	102

3.4. Соотношение активностей ферментов антиоксидантной системы у сеянцев двух форм <i>V. pendula</i>	113
3.4.1. Морфометрические показатели сеянцев	113
3.4.2. Активность ферментов АОС у сеянцев в стебле и листовом аппарате	115
3.5. Активность ферментов АОС в листовом аппарате как возможный индикатор ранней диагностики образования узорчатой древесины	120
3.5.1. Активность ферментов АОС в листовом аппарате у сеянцев двух форм <i>V. pendula</i>	120
3.5.2. Активность АОС в листовом аппарате у взрослых безузорчатых и узорчатых растений <i>V. pendula</i> var. <i>carelica</i>	126
3.6. Участие ферментов АОС в формировании косослойной древесины у <i>P. sylvestris</i>	128
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	138
ВЫВОДЫ	140
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	141
ПРИЛОЖЕНИЕ	199

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АО – антиоксиданты

АОС – антиоксидантная система

АпИINV – апопластная инвертаза

АПО – аскорбатпероксидаза

АсО – аскорбатоксидаза

АФК – активные формы кислорода

Г6ФД – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа

ГвПО – гваякол-пероксидаза

ГК – гексокиназа

ГО – гликолатоксидаза

ГПО – глутатионпероксидаза

ГР – глутатионредуктаза

ГТ – глутатионтрансфераза

ДАБ – донорно-акцепторный баланс

ДАО – донорно-акцепторные отношения

ДГАР – дегидроаскорбатредуктаза

ИINV – инвертаза

ИУК – индолилуксусная кислота (ауксин)

КАТ – каталаза

МАП-киназа – митоген активируемая протеинкиназа

МАП-киназный каскад – митоген активируемый протеинкиназный каскад

МДГАР – монодегидроаскорбатредуктаза

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДФН – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НАДФН-оксидаза – восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза

НСТ – нитросиний тетразолий

ОВР – окислительно-восстановительные реакции

ОС – окислительный стресс

ПКС – программируемая клеточная смерть

ПО – фенольные пероксидазы
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПТА – полярный транспорт ауксина
ПФО – полифенолоксидаза
ПФЦ – пентозофосфатный цикл
СОД – супероксиддисмутаза
СС - сахарозосинтаза
ТГ – тетрагваякол
УДФГТ – УДФ-глюкозотрансфераза
ФАЛ – фенилаланин-аммиак-лиаза
ХС – халконсинтаза
ЦитИнв – цитоплазматическая инвертаза
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь
Cif – ген, кодирующий белковый ингибитор апопластной инвертазы
CWIN – гены, кодирующие апопластную инвертазу
GSH – восстановленный глутатион
GSSG – окисленный глутатион
PIN – гены, кодирующие белковые транспортеры ауксина
PR-белки – pathogenesis-related proteins
Sus – гены, кодирующие сахарозосинтазу

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Процесс формирования древесины, или ксилогенез, в жизни древесного растения имеет огромное значение. В основе ксилогенеза лежит фиксация углерода в составе структурных полимеров углеводной и фенольной природы клеточных стенок одревесневающих тканей растений. По активности основных ферментов углеводного и фенольного обмена можно судить о преобладании тех или иных метаболических путей и, как следствие, о возможном сценарии ксилогенеза (Kubler, 1991; Robertson et al., 1995; Sudachkova et al., 2004; Foucart et al., 2006; Nomura et al., 2013; Галибина и др., 2015а, 2015б; Галибина и др., 2016а, 2016б; Novitskaya et al., 2016, 2020; Мощенская и др., 2017; Iakimova, Woltering, 2017). Структурные элементы древесины отличаются между собой по составу компонентов их клеточных стенок (целлюлоза, гемицеллюлозы, пектины, лигнин, белки). Соотношение структурных элементов в древесине, состав их клеточных стенок определяют ее физико-механические, технологические, топливные и декоративные свойства. Образование ксилемы – лабильный процесс, который, с одной стороны, находится под контролем генома, а с другой – зависит от действия экологических факторов, кроме того, в пределах одного дерева сценарии ксилогенеза могут отличаться (Paiva et al., 2008; Галибина и др., 2015а, 2015б, 2016а, 2016б; 2019а, 2019б; Dharanishanthi, Dasgupta, 2016; Novitskaya et al., 2016, 2020; Мощенская и др., 2017, 2019). В этой связи, поиск цитологических, биохимических и молекулярных маркеров, которые могли бы определять тот или иной путь ксилогенеза, представляется актуальным.

С этой точки зрения, ценным объектом является карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* (Mercl.) Hämet-Ahti) – форма березы повислой (*B. pendula* Roth), в древесине которой нарушены соотношение и пространственная ориентация структурных элементов (Барильская, 1978; Коровин и др., 2003; Novitskaya, Kushnir, 2006; Новицкая, 2008). Деревья карельской березы (*B. pendula* var. *carelica*) различаются между собой по времени начала и моделям развития узорчатой древесины в онтогенезе, у некоторых деревьев узорчатая древесина формируется только в отдельных частях ствола (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000; Novitskaya et al., 2016, 2020). Все вышеперечисленное делает *B. pendula* var. *carelica* уникальным объектом для изучения механизмов

ксилогенеза, поскольку в рамках одного ствола есть возможность исследовать «нормальные и аномальные» сценарии роста и развития проводящих тканей, нивелируя, тем самым, влияние факторов среды (Novitskaya et al., 2016).

Исследования, выполненные ранее в Институте леса КарНЦ РАН, выявили физиолого-биохимические и молекулярно-генетические закономерности, связанные со структурными особенностями и декоративными качествами узорчатой древесины (Галибина и др., 2016а, 2016б, 2018, 2019а, 2019б; Мощенская и др., 2016, 2017, 2019; Novitskaya et al., 2016, 2020). Помимо изменений в углеводном обмене, в тканях ствола *B. pendula* var. *carelica*, по сравнению с обычной березой повислой (*B. pendula* var. *pendula*), была отмечена высокая активность пероксидазы (ПО) – фермента антиоксидантной системы (АОС) (Галибина и др., 2013). ПО, наряду с другими ферментами, супероксиддисмутазой (СОД), каталазой (КАТ), полифенолоксидазой (ПФО), входит в единую сеть ферментов АОС, согласованное функционирование которой определяется локальными и обще клеточными каскадными взаимодействиями (Прадедова и др., 2011). На сегодняшний день в литературе имеются обширные и разнообразные данные, описывающие состав, строение и функции компонентов АОС в растительном организме; сезонную динамику их активности в различных органах и тканях; метаболические пути, в которых они, в той или иной степени, принимают участие (Mittler et al., 2002; Blokhina et al., 2003; Halliwell, 2006; Mittler, 2017 и др.). Между тем, роль ферментов АОС в процессе ксилогенеза у древесных растений изучена гораздо хуже. Известно, что они принимают непосредственное участие в образовании лигнина и формировании древесины (Olson, Vagner, 1993; Polle et al., 1994; Fernández-García et al., 2004; Passardi et al., 2004; Gapper, Dolan, 2006; Ros-Barceló et al., 2006; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009, Gill et al., 2010). Однако до сих пор остается невыясненным вопрос о том, существуют ли особенности функционирования ферментов АОС у древесных растений с признаками структурных аномалий.

Узорчатость – это лишь частный случай нарушения ксилогенеза у древесных растений. Среди нарушений камбиальной деятельности можно отметить довольно широко распространенное явление – формирование косослойной древесины у сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) (Hartig, 1895; Preston, 1949; Jones, 1963;

Savidge, Farrar, 1984; Philipson et al., 1972; Kubler, 1991; Harris, 2012; Larson, 2012). Исходя из данных литературы об особенностях метаболических процессов при формировании косослоя (Harris, 1973; Zagórska-Marek, Little, 1986; Kubler, 1991, Kozłowski, Pallardy, 1996), можно предположить, что результаты, полученные в ходе изучения *B. pendula* var. *carelica*, могут быть использованы в качестве фундаментальной основы для выявления механизмов развития структурных аномалий и у *P. sylvestris*.

С целью выявления роли ферментов АОС в формировании узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* и косослойной древесины у *P. sylvestris* были поставлены следующие **задачи**:

1. изучить годовичную динамику активности перекись-утилизирующих ферментов (КАТ, ПО) в тканях ствола двух форм березы повислой (*B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*), различающихся по структуре древесины;
2. исследовать активность ферментов АОС (СОД, КАТ, ПО и ПФО) в тканях ствола у *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*, различающихся по степени узорчатости древесины;
3. изучить активность ферментов АОС в стебле и листе у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*;
4. исследовать изменение активности ферментов АОС у *B. pendula* в листовом аппарате;
5. сравнить активность ферментов АОС в тканях ствола у деревьев *P. sylvestris* с прямослойной и косослойной древесиной.

Научная новизна и практическая значимость работы. Впервые проведено комплексное изучение активности ферментов АОС в проводящих тканях ствола у двух форм *B. pendula* при разных сценариях ксилогенеза. Впервые продемонстрирована возможность использовать ферменты АОС для выявления нарушения ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica*, в том числе, и на начальных этапах онтогенеза. Впервые у сеянцев двух форм *B. pendula* изучено изменение активности ферментов АОС в зависимости от размеров листа. Впервые выявлены

различия в активности ферментов АОС у *P. sylvestris* при формировании прямослойной и косослойной древесины.

Выявленные закономерности могут лечь в основу диагностики качества древесины *B. pendula* var. *carelica* и *P. sylvestris* на лесосеменных плантациях и в местах их естественного произрастания, что необходимо как для целей фундаментальной науки, так и в различных областях промышленности при заготовке высококачественного материала, обладающего наибольшей ценностью.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. У *B. pendula* разные сценарии ксилогенеза, связанные с формированием (1) прямослойной и (2) узорчатой древесины, отличаются по распределению активности комплекса ферментов АОС. Повышение активности ПО и ПФО при образовании узорчатой древесины является следствием преобладания апопластного пути метаболизации сахарозы и включением образующихся моносахаров преимущественно в биохимические пути вторичного метаболизма. Формирование узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* может быть диагностировано на разных стадиях онтогенеза по количественным значениям активности ферментов АОС.
2. Результаты, полученные в ходе изучения *B. pendula* var. *carelica*, можно использовать в качестве фундаментальной основы для выявления механизмов развития структурных аномалий осевых органов у *P. sylvestris*. Возрастание активности ПО и ПФО в камбиальной зоне у *P. sylvestris* при образовании косослойной древесины происходит на фоне увеличения метаболизации сахарозы в апопласте.

Личное участие автора. Автор принимал личное участие в планировании работы, постановке целей и задач исследования, модификации и совершенствовании методов исследования. Автор лично принимал участие в планировании и проведении экспедиционной и экспериментальной работы, в обработке полученных данных, в том числе, статистически, и в обсуждении полученных результатов. Автор лично участвовал в написании статей и подготовке

устных и стендовых докладов по материалам исследования. Диссертация написана автором самостоятельно.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на Международных и Всероссийских научных конференциях и симпозиумах, таких как 18 Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых «Биология – наука XXI века (Пущино, 21-25 апреля 2014 г.); Годичное собрание 2014 г. Международная научная конференция и школа молодых ученых «Физиология растений – теоретическая основа инновационных агро- и фитобиотехнологий» (Калининград, 19-25 мая 2014 г.); IX Международный Симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 20-25 апреля 2015 г.); VIII Съезд ОФР Всероссийская научная конференция с международным участием «Растения в условиях глобальных и локальных природно-климатических и антропогенных воздействий» (Петрозаводск, 21-26 сентября 2015 г.); Fourth International Symposium «Plant Signaling and Behavior» (Санкт-Петербург, 19-24 июня 2016 г.); Годичное собрание 2016 г. Научная конференция с международным участием и школа молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма» (Санкт-Петербург, 21–24 июня 2016 г.); IV Российский симпозиум с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, 20-23 сентября 2016 г.); II Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и международная научная школа «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, 26 июня – 1 июля 2017 г.); Всероссийская научная конференция с международным участием «Бореальные леса: состояние, динамика, экосистемные услуги» (Петрозаводск, 11-15 сентября 2017 г.); VII Всероссийская научная конференция с международным участием «Теоретические и прикладные аспекты лесного почвоведения» (Петрозаводск, 13–17 сентября 2017 г.); Годичное собрание 2017 г. Научная конференция и школа для молодых ученых «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, 18-24 сентября 2017 г.); Международная конференция «Young biologists science Week-2017» (Петрозаводск, 20-25 ноября 2017 г.); X Международный Симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 14-19

мая 2018 г.); Годичное собрание 2018 г. Научная конференция и школа для молодых ученых «Механизмы устойчивости растений и микроорганизмов к неблагоприятным условиям среды» (Иркутск, 10-15 июля 2018 г.); 10th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability (Saint Petersburg, June 23-28 2019); IX Съезд ОФР Всероссийская научная конференция с международным участием «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, 18-24 сентября 2019 г.).

Степень достоверности. Достоверность результатов обеспечена проведением исследований с использованием многочисленных современных методик на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук» в многократной биологической и аналитической повторности. Результаты исследований воспроизводимы.

Связь работы с научными программами. Исследования проводились с 2014 по 2019 гг. в соответствии с планами НИР Института леса КарНЦ РАН по темам «Рост и развитие карельской березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica*) при разных уровнях азотного питания» (2013-2016 г.г., рук. Новицкая Л. Л., РАН, 151, ФАНО России, 0220-2014-0001) и «Роль абиотических факторов среды в регуляции продуктивности древесных растений» (2017-2019 г.г., рук. Новицкая Л. Л., ФАНО России, 0220-2017-0002). Большая часть исследований была выполнена при поддержке грантов РФФИ «Инактивация фитогормонов как возможный механизм аномального камбиального роста карельской березы» (2016-2018 г.г., рук. Новицкая Л. Л., РФФИ, 16-04-01191-а); «Изучение механизмов эндогенной регуляции аномального ксилогенеза у карельской березы» (2016-2018 г.г., рук. Галибина Н. А., РФФИ, 16-04-100639-р_а); «Развитие структурных аномалий древесины на примере карельской березы: особенности синтеза, транспорта и инактивации ауксина» (2019-2021 г.г., рук. Новицкая Л. Л., РФФИ, 19-04-00622_а) и гранта за победу в конкурсе «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» («УМНИК») по теме «Разработка технологии диагностики аномальной (декоративной, дефективной) древесины у растений различных древесных пород» (2016-2017 г.г., рук. Никерова К. М.).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 48 работ, из них 16 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных ВАК (7 – Web of Science и Scopus).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, результатов экспериментальной работы и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложения. Список литературы включает 604 наименования, из них 501 на иностранном языке. Диссертация изложена на 201 странице машинописного текста, содержит 6 таблиц и 46 рисунков.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, доктору биологических наук Н. А. Галибиной за неоценимую научную и человеческую помощь, искреннюю поддержку на всех этапах проведенного исследования; за любовь, привитую к объекту исследования и биохимии растений в целом; за доверие и понимание. Особая благодарность д.б.н. Л. Л. Новицкой и д.б.н. Е. Ф. Марковской за необходимые интереснейшие консультации на всех этапах работы. Теплые слова благодарности И. Н. Софроновой за помощь в освоении большого спектра биохимических методов и, совместно с М. Н. Бородиной, их совершенствовании, получении большого массива экспериментальных данных. Автор искренне благодарен научным сотрудникам ИЛ КарНЦ РАН к.б.н. Ю. Л. Мощенской, к.б.н. С. М. Синькевичу, к.б.н. Е. В. Новичонок, к.б.н. Н. Н. Николаевой, к.б.н. Т. В. Тарелкиной, совместно с которыми были получены данные для настоящего исследования при проведении экспедиционных и лабораторных этапов, а также за их грамотную помощь в интерпретации результатов. Отдельная благодарность сотруднику Карельской лесосеменной станции М. Л. Щуровой за помощь при подборе объектов исследования. Огромная признательность сотрудникам лаборатории аналитической КарНЦ РАН за помощь на всех этапах работы, ценные советы по методической части работы. Отдельное спасибо моей Маме, Е. Ю. Никеровой, за веру и всестороннюю моральную поддержку.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Причины формирования структурных аномалий у древесных растений

Некоторые древесные растения, такие как ольха черная, яблоня, клен, карельская береза, сосна обыкновенная, отличаются необычной текстурной древесиной, часто её называют аномальной. Аномальная древесина возникает по причине структурных изменений стебля – специфических и неспецифических. Классификация структурных аномалий представлена на рисунке 1.



Рис. 1. Структурные изменения стебля древесных растений (по Коровину и др., 2003).

Специфические изменения часто вызваны вмешательством паразитарных агентов, поэтому область изучения таких изменений сводится к виду паразита и характеру внешнего проявления на дереве.

Неспецифические изменения закреплены генетически, отражаются в изменении метаболизма растения в онтогенезе, и, кроме того, имеют внешне разную степень проявления. Такие изменения закладываются в апикальной и

латеральной (камбий) меристемах. К апикальным нарушениям относят «ведьмины метлы», фасциации, появление карликовых и стелящихся форм. Среди аномалий в камбиальной деятельности можно выделить две группы нарушений: (1) упорядоченности направления антиклинальных делений, приводящих к формированию косослоя, волнистой древесины, узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica* и (2) частоты и направления антиклинальных делений, сопровождающихся возникновением придаточных органов, наростов на стволах и ветвях (капы и сувели). Рассмотрим некоторые из упомянутых явлений более подробно.

Волнистое расположение волокон, еще называемое свилеватостью, чаще наблюдается у лиственных пород. Свилеватость может встречаться локально по стволу растения или занимать весь его периметр. Причиной ее возникновения может быть наличие спящих почек или ран в дереве в виде полостей, а также сильное механическое давление на древесину. Свилеватость значительно снижает прочность древесины, усложняет ее обработку. При этом подобная древесина, в частности, волнистая древесина клёна, ореха, ясеня, осины, берёзы, ценится в качестве поделочного материала (Вакин и др., 1980; Самусева, 2019).

Капы – это наплывы, развитие которых сопровождается образованием большого числа спящих почек. Капы могут быть одиночными или располагаться группами на разной высоте по стволу. Способность к капообразованию часто встречается у покрытосеменных (ильма, клен, орех, граб, дуб), реже у хвойных растений. В природе встречаются капы, достигающие сотен килограмм по массе и нескольких метров по длине окружности. Считается, что начало капу дает наплыв, образующийся в результате делений клеток листового прорыва, что сопровождается образованием многочисленных очагов меристематической ткани. Сначала клетки не дифференцированы, затем на поверхности формируется непрерывный слой камбия, который образует древесину и луб, обеспечивая дальнейший рост и развитие капа. На поверхности капов образуются почки, которые могут быть пазушными или ветвящимися. Многочисленные данные указывают на связь процесса капообразования с процессами апикального доминирования и накоплением ростовых веществ. Капы и спящие почки на деревьях могут образовываться при повышении концентрации ауксина

(индолилуксусная кислота, ИУК), который вызывают активность камбия. Одновременно нарушается ритм и частота антиклинальных делений лучевых инициалей (Коровин, Курносов, 2000).

Сувель представляет собой наплыв на стволе, в отличие от капа, его формирование не связано с деятельностью почек. Формируются и на лиственных, и на хвойных деревьях. Сувели часто расположены ниже первых крупных ветвей. Их называют опухолями, состоящими из дифференцированных структурных элементов. Макроструктурной особенностью древесины сувелей является свилеватое расположение волокнистых элементов. Годичные приросты в сувелях значительно больше, чем в нормальной части ствола. В микроструктуре можно заметить обилие лучевой паренхимы. Лучи неправильной формы, прозенхимные клетки короткие (Коровин и др., 2003).

Процессы формирования узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* и косослойной древесины у *P. sylvestris* будут подробно рассмотрены в последующих подразделах.

Наличие аномальной древесины имеет как положительные, так и отрицательные стороны. Так, стоимость продукции, получаемой из аномального древесного материала, может как возрасти, благодаря наличию высокодекоративных свойств, так снизиться из-за непригодности древесины для производства качественных изделий. Проблема состоит в том, что аномальную древесину часто сложно обнаружить по внешним признакам. Так, узорчатая древесина *B. pendula* var. *carelica* или косослойность *P. sylvestris* становятся видимыми лишь при обнажении большого участка коры, что травматично для дерева и затратно для производства.

К возникновению аномальной древесины приводит действие разных факторов, среди которых изменение температурного режима, воздействие химических веществ, радиация, избыток или недостаток каких-либо элементов в почве и другие факторы (Коровин и др., 2003). Степень проявления аномалии может изменяться в зависимости от интенсивности воздействия фактора.

Понимание процессов аномального морфогенеза у древесных растений несомненно представляет интерес. Изучение отклонений от нормы позволяет глубже и всестороннее постигнуть механизмы регуляции нормального процесса.

Выявление физиолого-биохимических и молекулярно-генетических особенностей аномального ксилогенеза может дать дополнительную информацию для практического управления программой развития камбиальных производных.

1.1.1. Формирование узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica*

Betula pendula Roth var. *carelica* (Merckl.) Hamet-Ahti – форма *B. pendula*, у которой в результате отклонений в деятельности камбия формируется узорчатая древесина (Hintikka, 1941; Барильская, 1978; Щетинкин, 1988; Velling et al., 2000; Коровин и др., 2003; Любавская, 2006; Novitskaya, Kushnir, 2006) (рис. 2).

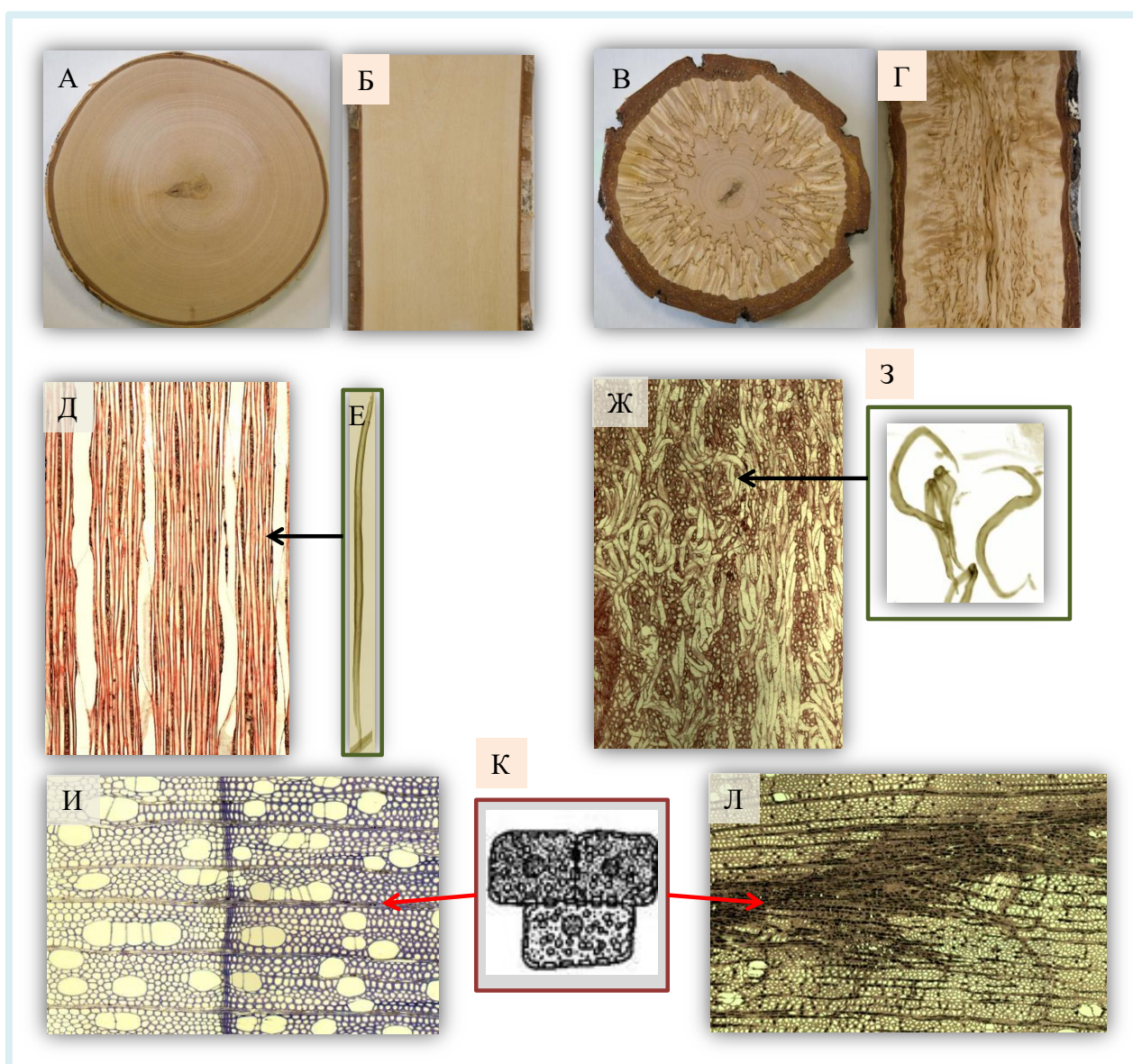


Рис. 2. Поперечные (А, В) и тангентальные (Б, Г) спилы, демонстрирующие макроструктуру древесины *B. pendula* var. *pendula* (А, Б) и *B. pendula* var. *carelica*

(В, Г). На тангентальных (Д, Ж) и поперечных (И, Л) срезах видно нарушение соотношения и пространственной ориентации структурных элементов у *B. pendula* var. *carelica* (Ж, Л) по сравнению с *B. pendula* var. *pendula* (Д, И). У *B. pendula* var. *pendula* волокна (Е) расположены параллельно оси ствола, благодаря чему у нее формируется типичная для вида прямослойная древесина. У *B. pendula* var. *carelica* в местах аномалий возрастает количество паренхимных клеток (К), а образующиеся волокна (З) имеют свилеватую форму, благодаря чему формируется узорчатая древесина.

В зонах развития структурных аномалий не запускается программа гибели клеток, приводящая к формированию сосудов и волокон ксилемы и ситовидных элементов флоэмы, дифференцирующиеся камбиальные производные сохраняют протопласт и превращаются в клетки запасяющей паренхимы, которые накапливают большие количества запасных веществ. Крупные скопления паренхимных клеток образуют на спилах древесины темноокрашенные включения (рис. 2 В, Г). Образующиеся в местах аномалий волокна и сосуды имеют неправильную форму (рис. 2 Ж, З), благодаря чему древесина *B. pendula* var. *carelica* приобретает свилеватое строение (Любавская, 2006; Novitskaya, Kushnir, 2006; Novitskaya et al., 2016, 2020).

Узорчатая древесина наследуется генетически, однако, даже при контролируемом опылении, не все особи оказываются узорчатыми. Процент проявления узорчатых особей в потомстве может достигать 60 % (Ермаков, 1986; Любавская, 2006).

По сравнению с другими древесными породами, структурные аномалии тканей ствола у *B. pendula* var. *carelica* выражены наиболее ярко, характеризуются большим разнообразием проявления в онтогенезе и высоким уровнем эндогенной изменчивости (Новицкая, 2008; Novitskaya et al., 2016), благодаря чему она представляет собой уникальный объект исследования для познания механизмов морфогенеза древесных растений (Галибина, 2018).

Исследование функционирования камбиальной деятельности на примере двух форм *B. pendula* позволило выявить физиолого-биохимические и молекулярно-генетические маркеры разных сценариев ксилогенеза. Формирование

нормальной по строению древесины *B. pendula* var. *pendula*, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой активности сахарозосинтазы (СС) под контролем генов *Sus1* и *Sus2* и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок (Галибина и др., 2015а; Мощенская и др., 2017).

Включение сахарозы через СС-путь в синтез целлюлозы, приводит к необратимому выводу ее из обмена веществ. Дифференциация производных камбия в паренхимные клетки, являющиеся основными анатомическими элементами в зонах структурных аномалий узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica*, происходит на фоне низкой активности СС в связи со снижением экспрессии генов *Sus1* и *Sus2* и сопровождается уменьшением содержания целлюлозы на единицу массы ксилемы (Галибина и др., 2015а; Мощенская и др., 2017). В этом случае высокая акцепторная сила тканей ствола поддерживается за счет метаболизации притекающей сахарозы с участием апопластной инвертазы (АпИInv) (Галибина и др., 2015б).

Установлено, что в период камбиального роста регуляция активности АпИInv происходит не только на уровне экспрессии кодирующих ее генов, но и на посттрансляционном уровне через белковые ингибиторы (CIF, cell-wall inhibitor of β -fructosidase). CIF – это низкомолекулярные белки (меньше 20 кДа), которые связываются непосредственно с активным сайтом инвертазы (вакуолярная инвертаза (ВакИInv) или АпИInv), конкурируя, тем самым, с сахарозой (Rausch, Greiner, 2004; Восock et al., 2008; Hothorn et al., 2010; Ruan, 2014; Wang et al., 2014). У *B. pendula* var. *carelica* уровень экспрессии генов, кодирующих АпИInv (*CWIN*), примерно такой же как у *B. pendula* var. *pendula*, но снижено количество транскриптов мРНК гена *Cif*, экспрессия которого уменьшается при возрастании концентрации сахарозы в апопласте.

Высказано предположение, что возрастание активности АпИInv в аномальных по строению тканях ствола *B. pendula* var. *carelica* можно рассматривать, как компенсаторный механизм для поддержания донорно-акцепторных отношений (ДАО), направленный на устранение избыточного содержания дисахарида во флоэме (Галибина и др., 2019а, 2019б). При метаболизации сахарозы АпИInv смещается соотношение сахара/гексозы в

сторону последних, что может способствовать индукции клеточных делений и, через экспрессию ряда генов, приводить к изменению программы развития производных камбия (Koch, 1996; 2004; Cheng et al., 1999; Sturm, Tang, 1999; Smeekens, 2000; Roitsch, Gonzalez, 2004). В результате, усиливается синтез запасных метаболитов, способствуя превращению камбиальных производных в клетки запасной паренхимы. В основе разнообразия растений *B. pendula* var. *carelica* лежит изменение соотношения активностей СС и АпИнв в камбиальной зоне (Галибина, 2018).

1.1.2. Формирование косослойной древесины у *P. sylvestris*

Косослойная древесина у хвойных и, в частности, у растений рода *Pinus* характеризуется наклоном веретенообразных клеток, который может достигать до 90° по отношению к оси ствола (Hartig, 1895; Kubler, 1991; Harris, 2012). Быстрое изменение наклона и расположения клеток вдоль оси ствола часто связано с укорочением веретенообразных клеток, что объясняется преобладанием косых антиклинальных делений над интенсивностью интрузивного роста (Jones, 1963; Kubler, 1991) (рис. 3 А).

Во время периода активного камбиального роста эти деления очень часты, затем их интенсивность снижается (Philipson et al., 1972; Larson, 2012). Некоторые авторы предполагают, что быстрые изменения в ориентации камбиальных клеток могут быть результатом интрузивно растущих концов клеток, которые скручиваются в одном направлении (Preston, 1950), или неполноценных периклинальных делений (Savidge, Farrar, 1984).

Бывают случаи вынужденного образования косослойной древесины, например, в случае поранения. При этом возрастает интенсивность косых антиклинальных делений, окружающих место поранения. Камбиальные веретеновидные клетки укорачиваются, они делятся достаточно быстро и беспорядочно. Укороченные клетки легко изменяют направление своего роста (Savidge, Farrar, 1984; Hejnowicz, 1990). В этих случаях ориентация делений и направление интрузивного роста сопряжены с потоками ауксина (Harris, 1973; Zagórska-Marek, Little, 1986).

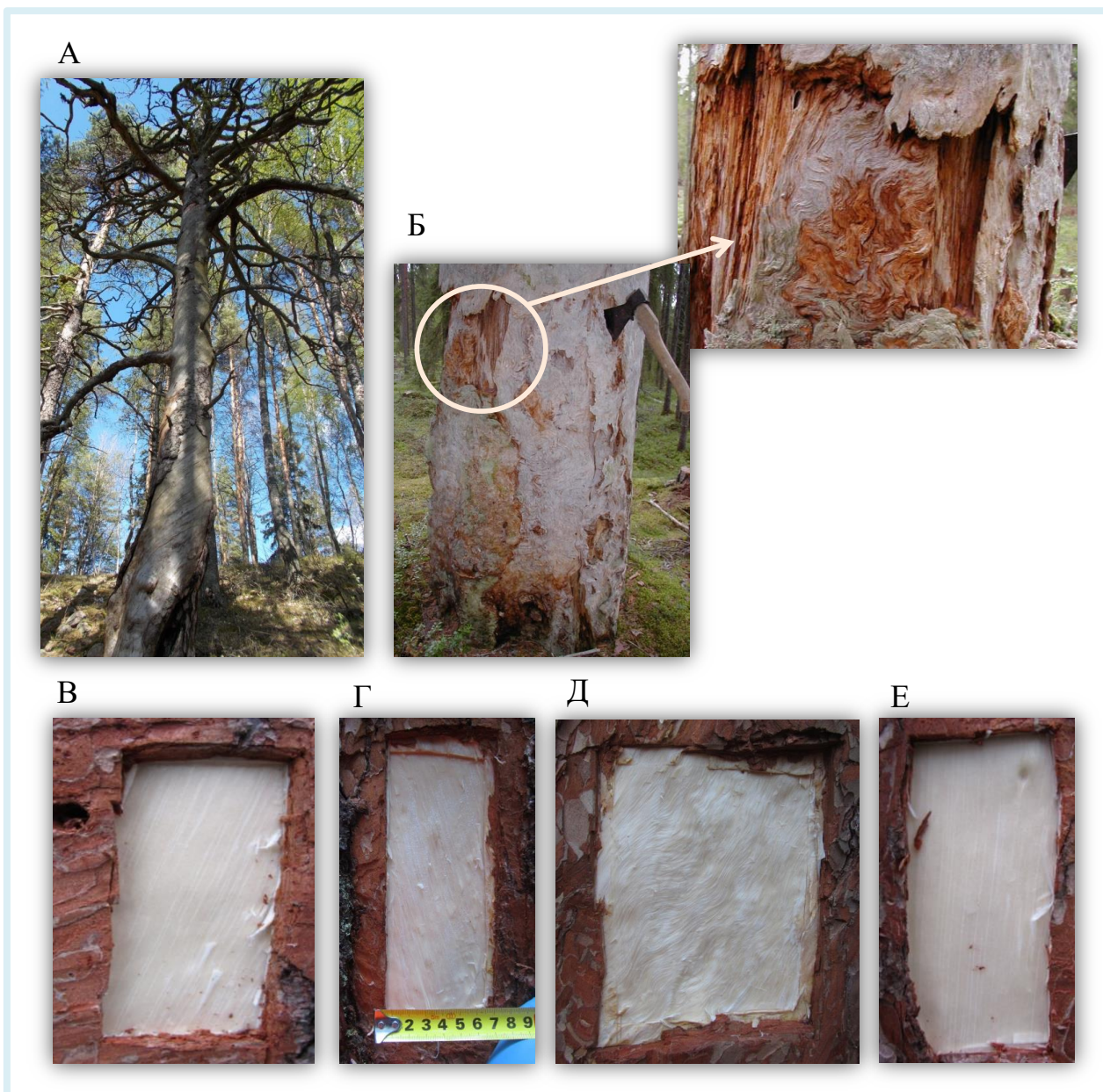


Рис. 3. Внешний вид ствола окоренных сухих деревьев, демонстрирующий формирование косослойной (А) и свилеватой (узорчатой) (Б) древесины у *P. sylvestris*. На увеличенном фрагменте (отмечено кругом на Б) видно, что узорчатая древесина начинает формироваться с возрастом, более ранние годовичные кольца имеют прямослойную древесину. Окоренная поверхность ствола у *P. sylvestris* с правозакрученной (В), левозакрученной (Г) косослойной древесиной, свилеватой древесиной (Д) и прямослойной древесиной (Е).

Среди причин возникновения косослойной древесины ученые называют действие генетических факторов, так как косослой встречается только у определенных пород деревьев и наследуется в потомстве. Нет единой

разработанной теории, которая бы объясняла происхождение косослоя, так как в одном и том же насаждении могут встречаться деревья разные по углу и направлению наклона волокон. Древесина может иметь направление при закручивании либо вправо (рис. 3 В), либо влево (рис 3 Г). Считается, что большинство хвойных древесных растений сначала развивают левую спираль, которая затем к 10-30 годам изменяется на правую и остается таковой до конца жизни (Mayer-Wegelin, 1956; Vité, Rudinsky, 1959; Northcott, 1965; Kozłowski et al., 1967).

Косослойная древесина имеет функциональное значение для растений. Гипотетически она может оказывать влияние на поставку воды и минеральных веществ от корней к кроне и, напротив, влиять на равномерность оттока ассимилятов от кроны к тканям ствола (Kubler, 1991; Kozłowski, Pallardy, 1996). Еще в ранних работах упоминалось, что возникновение косослойной древесины инициируется потоками фотоассимилятов в соответствующем направлении (Harris, 1967). Высказывается предположение, что в неблагоприятных условиях, когда затруднен поток веществ, у древесных растений может формироваться косослойная древесина. На степень проявления косослоя могут влиять почвенные условия. Отмечено, что уменьшение влажности почвы и увеличение размера ее фракций ведут к увеличению степени косослойности. Растения с косослоем часто встречаются на каменистых почвах. Однако нельзя говорить о строгой причинно-следственной связи между условиями произрастания и направлениями волокон, поскольку формирование косослойной древесины находится под генетическим контролем (Harris, 2012).

Большое распространение получила гипотеза о влиянии ветра на образование косослоя (Pyszyński, 1980). При этом образующаяся скрученная древесина делает дерево более устойчивым к воздействию сильных ветров (Skatter, Kusera, 1998). Еще одна причина – это изменение освещения, которое может изменять направление потока ассимилятов, при этом с одной стороны ствола рост клеток превосходит рост последних с другой стороны (Kubler, 1988). Возможно, что появление косослойной древесины – это просто результат случайных процессов в камбиальной зоне, которые приводят к развитию такого «стресс»-роста (Schulgasser, Witzum, 2007).

Изучение причин формирования косослойной древесины важно с практической точки зрения. Наличие косослоя изменяет свойства древесины: значительно ухудшается ее качество, затрудняется обработка. Чем больше волокна отклоняются от продольного направления, тем меньшую прочность будет иметь древесина. Появления угла даже в 10° может сделать древесину совершенно непригодной для дальнейшего использования (Pope et al., 2005).

1.1.3. Роль ауксина при формировании узорчатой и косослойной древесины

Важную роль в дифференциации структурных элементов древесины играет гормон ауксин, который оказывает влияние на процессы удлинения клеток (Sundberg et al., 2000; Sorce et al., 2013). Полярный транспорт ауксина (ПТА) влияет на вертикальную ориентацию элементов в древесине (Sachs, 2000; Kramer, 2002, 2006). ПТА зависит от экспрессии генов семейства *PIN*, кодирующих белковые транспортеры ауксина – *PIN*-белки (Liu et al., 2014).

Считается, что свободный (физиологически активный) ауксин – это сигнал, необходимый для дифференциации сосудов (Junghans et al., 2004; Aloni, 2010, 2015). У сосудистых растений ауксин образует конъюгат с глюкозой (Sztein et al., 1995) – ИУК-глюкозу. Этот процесс катализируется ферментом ИУК-глюкоза синтазой (УДФГ-трансферазой, КФ 2.4.1.121) (Michalczuk, Bandurski, 1982). Гены, кодирующие данный фермент, найдены у многих растений и могут регулировать рост растений (Szerszen et al., 1994) и, в особенности, влиять на развитие проводящих тканей (Jackson et al., 2002; Ludwig-Müller et al., 2005).

Для образования узорчатой древесины этот факт имеет особое значение, так как *B. pendula* var. *carelica* содержит меньше сосудов по сравнению с прямослойной древесиной *B. pendula* var. *pendula* (Novitskaya et al., 2016). Так, по данным литературы содержание свободного ауксина в коре составляет 55.0 и 67.5 мг/г сухого веса, а связанного – 104.1 и 23.3 мг/г сухого веса у *B. pendula* var. *carelica* и *B. pendula* var. *pendula* соответственно (Щетинкин, 1988). Поскольку связанный гормон не вовлекается в ПТА (Bajguz, Piotrowska, 2009; Ludwig-Müller, 2011), было высказано предположение, что нарушение ориентации структурных элементов древесины у *B. pendula* var. *carelica* происходит в результате инактивации ауксина (Novitskaya et al., 2020). В местах формирования структурных

аномалий наблюдается сверхэкспрессия ИУК-глюкоза синтазы. Гексозы, образующиеся в апопласте в результате преимущественного расщепления сахарозы АПИИВ, через цепь биохимических реакций могут служить субстратом для синтеза ИУК-глюкозы (Novitskaya et al., 2020). В узорчатых тканях *B. pendula* var. *carelica* также отмечается повышенный уровень транскриптов генов *PIN 3*, которые вовлечены в латеральный транспорт ауксина (Novitskaya et al., 2020).

Показано, что введение экзогенного ауксина может снизить или предотвратить переориентацию элементов древесины и способствовать образованию косослойной древесины. Исследователи разрабатывают математические модели, которые связывают концентрации ауксина, направление его потоков (за счет транспорта с участием *PIN*-белков) и ориентацию элементов древесины при образовании косослоя (Zagórska-Marek, Little, 1986; Kramer, 2002, 2004, 2006)

1.1.4. Ауксин и антиоксидантная система

В последнее время широко распространено мнение, что ауксин в совокупности с активными формами кислорода (АФК) являются основными регуляторами развития растений при различных стрессах (Potters et al., 2007, 2009; Tognetti et al., 2011). Концентрация ауксина может уменьшаться в связи с сокращением биосинтеза гормона при увеличении содержания АФК, конъюгации гормона, либо за счет его прямого окисления при возникновении окислительного стресса (ОС) (Normanly, 2010). На растениях *Zea mays* L., *Cucumis sativus* L., *Glycine max* (L.) Merr., *Helianthus annuus* L. и *P. sylvestris* показано, что ауксин может быть сигналом для синтеза АФК, которые участвуют в процессах ослабления клеточных стенок или, напротив, в удлинении клеток (Schopfer, 2001).

Индукцируемое стрессом накопление АФК у растений рода *Arabidopsis* влияет на метаболизм ауксина за счет воздействия на гены, ответственные за сигналинг гормона и ПТА (Blomster et al., 2011; Peer et al., 2013). Специфические митоген активируемые протеинкиназные (МАП-киназные) каскады (ANP1–MPK3/6; MEKK1–MPK4) у *Nicotiana benthamiana* Domin, работа которых опосредованно находится под контролем АФК (Yoshioka et al., 2003), участвуют в подавлении сигналинга ауксина (Kovtun et al., 2000; Nakagami et al., 2006). Кроме

того, на регуляцию гормона влияет изменение гомеостаза глутатиона – одного из важнейших низкомолекулярных антиоксидантов (АО) (Bashandy et al., 2010), что было показано на растениях рода *Arabidopsis*. Взаимосвязь ауксина и компонентов АОС представлена на рисунке 4.

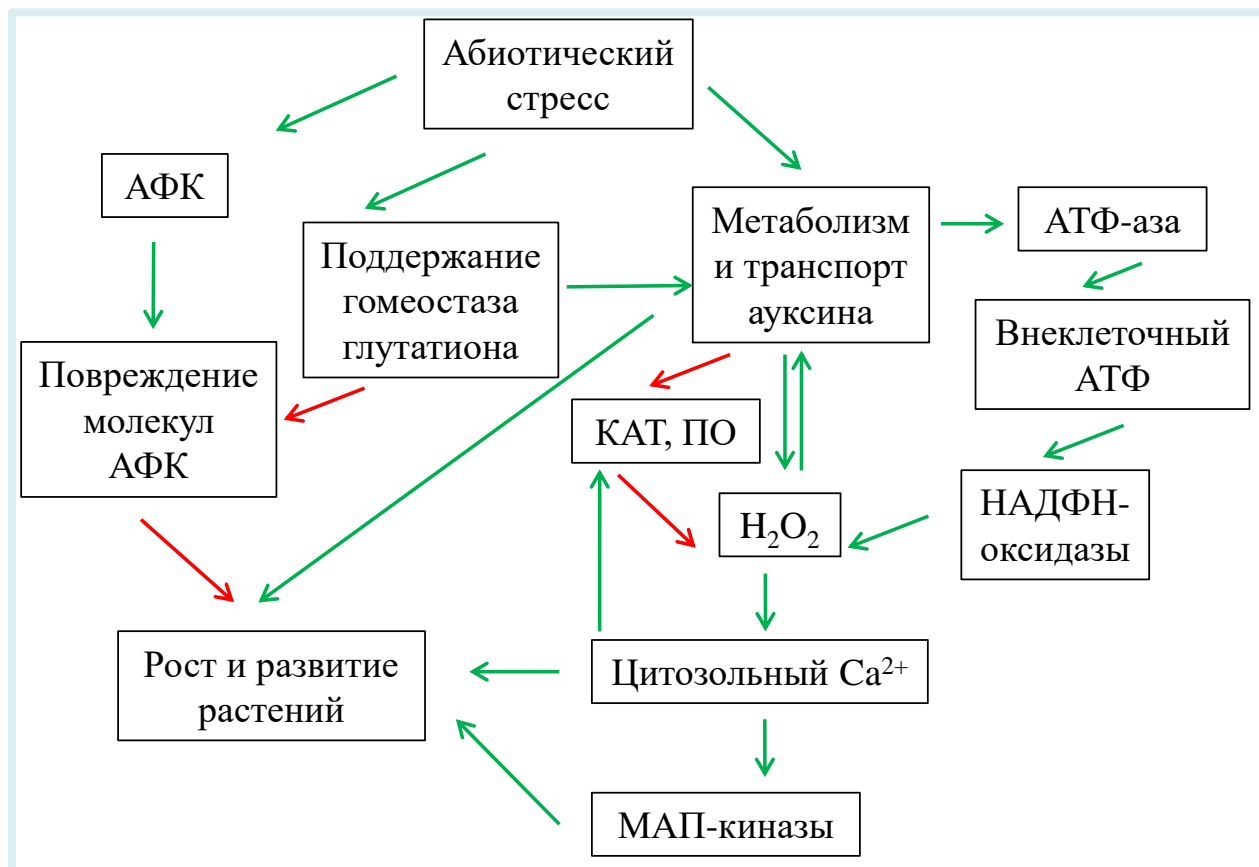


Рис. 4. Схема, демонстрирующая взаимодействие между ауксином и АОС для контроля роста, развития и стрессоустойчивости растений. Зеленые стрелки указывают на положительные эффекты, красные – на отрицательные эффекты (по Krishnamurthy, Rathinasabapathi, 2013 с изменениями). АФК – активные формы кислорода, НАДФН-оксидазы – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидазы, КАТ – каталаза, ПО – пероксидаза, АТФ-аза – аденозинтрифосфатаза, МАП-киназы – митоген активируемая протеинкиназы.

Ауксин может связываться с ПО клеточных стенок. Затем этот комплекс может участвовать в генерации АФК или, в случае присутствия различных химических регуляторов, в деградации гормона (Kawano, 2003). Считается, что ПО могут быть вовлечены в метаболизм ауксина за счет его окисления двумя путями:

(1) путь, зависимый от присутствия перекиси водорода; (2) путь, зависимый от присутствия молекулярного кислорода (Savitsky et al., 1999).

Многочисленные исследования, проведенные на растениях рода *Arabidopsis* указывают на тесную взаимосвязь гормональных путей ауксина и АОС. Так, растения-мутанты с подавленными антиоксидантными способностями тиоредоксина и глутатиона имели высокие уровни ауксина и поддерживали стабильный гомеостаз гормона (Bashandy et al., 2010). Ослабление рецепции ауксина и его сигналинга усиливает толерантность к перекиси водорода – одной из основных АФК (Iglesias et al., 2010). Экспрессия ауксин-зависимых генов подавляется обработкой перекисью водорода через активацию МАП-киназы (Kovtun et al., 2000).

Отмечают, что длительное воздействие стресса приводит к изменениям механизмов роста, сокращениям клеточных делений и усилению латерального роста (Potters et al., 2007, 2009). Эти процессы осуществляются за счет взаимодействий между АФК и ауксином (Potters et al., 2009). Напротив, обнаружено, что при обработке ауксином удлинение колеоптелей происходит быстрее, чем без обработки, при этом это сопровождается образованием большого количества АФК (Rodriguez et al., 2002; Schopfer et al., 2002). Кроме того, взаимодействия между ПО и ауксином влияют на процессы биосинтеза лигнина у *Picea abies* (L.) Karst. (Kärkönen, Koutaniemi, 2010).

Таким образом, имеющиеся в литературе сведения дают основание полагать, что ферменты АОС и АФК, через взаимосвязь с гормонами, сигнальными системами, транскрипционными факторами, также могут принимать участие в формировании разных типов древесины у растений. Поэтому в следующих разделах литературного обзора будут представлены основные сведения о ферментах АОС и АФК, их роли в жизни растения.

1.2. Активные формы кислорода и ферменты антиоксидантной системы – активные участники метаболизма растения

Высшие растения живут в постоянно изменяющихся условиях среды, что сопровождается эволюцией метаболических процессов, необходимых для роста и развития при неподвижном, сидячем образе жизни (Chinnusamy et al., 2004; Liu, Bush, 2006; Pitzschke, Hirt, 2006 и др.). Метаболизм растения должен быть хорошо отрегулирован для достижения эффективной интеграции широкого спектра биосинтетических путей, которые, по своей природе, являются восстановительными или редукционными (Van Breusegem et al., 2001; Delledonne et al., 2003; Rouhier et al., 2003; Crawford, 2005; Grün et al., 2006 и др.).

Среди идущих в биологических системах реакций наиболее распространенными являются окислительно-восстановительные реакции (ОВР). Так, многие важные реакции энергетического обмена и биологического окисления являются взаимосвязанными обратимыми ОВР (Жолнин, 2012), в ходе которых электроны обратимо переносятся специализированными редокс-парами на различные соединения и элементы, среди которых кислород, азот, сера (Колупаев, Карпец, 2010). Редокс-пары представлены коферментами оксидоредуктаз, которые регулируют степени окисления органических и неорганических соединений (Ксенжек, Петрова, 1986). Таким образом, реакции, катализируемые оксидоредуктазами, можно считать редокс-процессами, акцептором восстановительных эквивалентов чаще всего выступает кислород. Он сам и АФК принимают активное участие в биологических ОВР (Coupe et al., 2005; Geigenberger et al., 2005; Scheibe et al., 2005; Мартинович, Черенкевич, 2008).

Образование АФК генетически запрограммировано, они возникают в процессе роста и развития организма в связи с участием во многих физиологических процессах, кроме того, организм может генерировать их в ответ на изменения условий окружающей среды. В обычных условиях АФК образуются и взаимопревращаются в реакциях основного метаболизма, а в условиях их накопления происходит переориентация растения на более интенсивный вторичный метаболизм (Barnes, Mayfield, 2003; Link, 2003; Rouhier et al., 2003; Schürmann, 2003; Колупаев, 2007; Черенкевич и др., 2014 и др.). При этом АФК могут передавать стрессовые сигналы в геном и обеспечивать адаптивный ответ

(Dat et al., 2000; Mittler, 2002). Поэтому, в рамках существующей свободнорадикальной теории, АФК можно рассматривать в качестве регуляторных сигнальных молекул (Allen, Balin, 1989; Hitchler, Domann, 2007; Мартинович, Черенкевич, 2008) или сигнальных медиаторов, которые несут функцию контроля важнейших биологических процессов (Гамалей и др., 1999; Skulachev, 2006).

Физиологические сигнальные функции АФК сводятся к следующим: (1) сигнал, отвечающий за запуск защитных реакций; (2) сигнал, запускающий программируемую клеточную смерть (ПКС); (3) сигнал неконтролируемых клеткой деструктивных изменений. Выбор типа сигнала определяется особенностями функционирования АФК и их взаимоотношениями с АОС (Scandalios, 2005; Suzuki, Mittler, 2006), представляющей совокупность ферментов и АО (Michalak, 2006). Часто различные компоненты АОС и АФК не связаны напрямую с процессами окисления-восстановления, поэтому при изменении антиоксидантного статуса возникает многостадийная цепь реакций. Управление адаптивными процессами с целью повышения устойчивости растительных организмов требует подробного изучения этих сложных реакций (Колупаев и др., 2011).

Эволюция представлений о физиологическом действии АФК влечет за собой постоянный пересмотр и расширение функций компонентов АОС, большую долю из которых составляют сигнальные процессы (Foyer, Noctor, 2009). Безусловно АФК «вызывают не только плохие изменения» (Гольдштейн, 2002). Однако, необходим их постоянный контроль, как на уровне образования, так и на уровне потребления (Lamb, Dixon, 1997; Van Breusegem et al., 2001). Крайне важно поддержание «деликатного баланса между сигнализацией и уничтожением» (Suzuki, Mittler, 2006). Как недостаток, так и чрезмерная генерация АФК может приводить к гибели клеток. Гомеостаз должен поддерживаться за счет установления равновесия между окислительными и восстановительными процессами (Зенков и др., 2001).

Нарушение равновесия между образованием и нейтрализацией АФК при изменении внешних факторов приводит к накоплению АФК (Кордюм и др., 2003; Хавинсон и др., 2003). Следствием этих изменений является развитие ОС (Moran et al., 1994, Prasad, 1996; Torres, Dangl, 2005). Однако эффективная работа АОС по контролю АФК способствует нормализации работы клеток (Apel, Hirt, 2004;

Колупаев, 2007). Если избыток АФК запускает сигнальную функцию, то активируются многочисленные ответы на повреждение (Lamb, Dixon, 1997; Desikan et al., 2001; Knight, Knight, 2001). В случае если АФК усугубляют имеющиеся повреждения, окисляя важнейшие биологические молекулы (ДНК, белки, липиды), – запускается ПКС (Hammond-Kosack, Jones, 1996; Asada, 1999; Mitsuhashi et al., 1999; Dat et al., 2000).

Образование АФК в стрессовых условиях часто вызвано нарушением деятельности дыхательной цепи. Основные места образования АФК в клетке растений при абиотическом стрессе – органеллы с высокими скоростями окислительных реакций ввиду постоянного потока электронов: хлоропласты, митохондрии, пероксисомы и глиоксисомы (Dat et al., 2000).

В хлоропластах основной источник образования перекиси водорода – это реакция Мелера, которая работает для освобождения фотосистемы I от избыточного количества образовавшихся электронов. Долгое время хлоропласты считались основным источником образования АФК в клетках. Однако и другие органеллы могут иметь не менее важную роль в продукции АФК (Karpinska et al., 2000). Фотодыхание в глиоксисомах благодаря работе гликолатоксидазы (ГО, КФ 1.1.3.15) – другой ресурс образования перекиси водорода. АФК постоянно образуются при митохондриальном дыхании (Møller, 2001; Doudican et al., 2005). Кроме того, именно в митохондриях перекись водорода образуется при наступлении стрессовых условий (Maxwell et al., 1999; Pellinen et al., 1999). Митохондрии могут быть регуляторами процессов ПКС, и повышенные уровни АФК здесь могут быть причиной запуска ПКС (Lam et al., 2001). Известно, что в ядрах клеток могут содержаться чувствительные редокс-транскрипционные факторы, вовлеченные в активацию ПКС, что свидетельствует о возможном образовании здесь АФК. Предполагают, что митохондриальные и ядерные механизмы задействованы в запуске ПКС, поэтому уровень АФК в митохондриях и ядрах клеток должен строго контролироваться (Lam et al., 2001). Благодаря тому, что перекись водорода диффундирует через аквапорины, АФК, образованные в одном месте, могут повлиять на другие органеллы, уменьшая их защитные способности. Именно поэтому стресс, приводящий к увеличению образования АФК в хлоропластах, может запустить не только хлоропластные, но и цитозольные

защитные механизмы. Пероксисомы – это не только орган детоксификации АФК под действием ферментов, но и место образования перекиси водорода за счет работы ГО и также процесса β -окисления жирных кислот (Henzler, Steudle, 2000).

Полифункциональность АФК обуславливает наличие для них множества потенциальных внутриклеточных мишеней. Кроме того, тип клеточного ответа АФК может различаться при разной концентрации. Низким концентрациям АФК присущи процессы сигналинга, а высокие должны подвергаться детоксификации при ОС (Черенкевич и др., 2014).

Многофункциональность АФК отражается в выполнении регуляторной функции (в рамках редокс-контроля) и функции вторичных мессенджеров (в рамках редокс-сигналинга). Кроме того, АФК относят к особому типу редокс-мессенджеров, переносящих электроны (Мартинович, Черенкевич, 2008, Черенкевич и др., 2014).

ОС – не единственная угроза растительному организму, возникающая при избытке АФК. Избыток восстановленных форм приводит к восстановительному стрессу. При восстановительном стрессе, как и при окислительном, имеет место метаболический дисбаланс. При этом избыток восстановителей (например, перевосстановление электрон-транспортных цепей (ЭТЦ)) также может привести к последующему ОС (Лушак, 2010). Таким образом, АФК можно считать индикаторами клеточного стресса и вторичными мессенджерами, вовлеченными в сигнальные пути.

В клетках высших растений молекула кислорода расщепляется последовательностью реакций, образуя различные АФК. Главным образом, из кислорода образуются перекись водорода и супероксидный радикал, которые являются вторичными мессенджерами во многих процессах, ассоциированных с ростом и развитием, за счет участия в передаче внутриклеточных сигналов и регуляции экспрессии генов (Chaves et al., 2003; Delledonne et al., 2003; Link, 2003; Rouhier et al., 2003; Borland et al., 2005; Crawford, 2005; Grün et al., 2006; Shao et al., 2007).

Инициация для образования из кислорода АФК необходима лишь на первом этапе при образовании супероксидного радикала, тогда как последующие реакции относятся к экзотермическим и могут происходить спонтанно, быть

катализированными или нет. В конечном итоге, кислород нейтрализуется до воды, что обеспечивает растительный организм энергией, необходимой для всех сложноорганизованных высших организмов (Hippeli et al., 1999).

Мишенью АФК могут быть нуклеотиды и нуклеиновые кислоты, особенно ДНК. Гидроксильный радикал атакует аденин, гуанин, тимин, цитозин, супероксидный радикал – гуанин. При этом может произойти разрыв цепей ДНК и повреждение хромосом. Следовательно, АФК могут являться ингибиторами синтеза ДНК и деления клеток (Алехина и др., 2005). Кроме того, АФК изменяют структуру белков и их активность, вызывая образование дисульфидных мостиков и сульфогрупп (Delaunay et al., 2002; Van Montfort et al., 2003).

Общее количество АФК в организме определяется скоростями их образования и разрушения и продолжительностью существования. Активность ферментов АОС и содержание низкомолекулярных АО значительно регулируют уровень АФК и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в клетке (Arel, Hirt, 2004).

Выделяют высокомолекулярные (энзиматические) – ферменты и низкомолекулярные (неэнзиматические) компоненты АОС. Ферменты ингибируют запуск цепей окисления, нейтрализуя супероксидный радикал и перекисные продукты. Низкомолекулярные антиоксиданты могут ограничивать развитие цепных реакций (Загоскина, Назаренко, 2016). Энзиматические и неэнзиматические компоненты работают как эндогенные защитные механизмы в комплексной сети по уменьшению влияния цитотоксических эффектов АФК в клетках (Powers, Lennon, 1999; Blokhina et al., 2003; Møller et al., 2007). Наиболее важные низкомолекулярные АО – аскорбиновая кислота, глутатион, тиолы, токоферолы, пигменты (каротиноиды, антоцианы) и др. (Inzé, Van Montagu, 1995; Devi, Prasad, 1998, Tausz et al., 2003) – взаимодействуют с АФК и, тем самым, поддерживают различные функции в растениях, делая его очень гибким организмом (Borland et al., 2005; Shao et al., 2007). Однако неэнзиматические захватчики не могут защищать растения от активных восстанавливающих радикалов, таких как супероксидный радикал и метастабильные гидропероксиды (Chaudière, Ferrari-Pioui, 1999).

Ферменты АОС являются белками по природе и оксидоредуктазами по функциям. Катализ протекает за счет взаимодействия апофермента и кофермента,

последний имеет конформацию «кармана». Особенности переноса электронов определяются пространственной организацией (Saab-Rincon, Valderrama, 2009). Коферменты оксидоредуктаз это редокс-пары, которые переносят восстановительные эквиваленты по реакции обратимого окисления-восстановления (Ксенжек, Петрова, 1986; Крицкий, Телегина, 2004).

Наиболее важные антиоксидантные ферменты, нейтрализующие одни и образующие другие АФК: супероксиддисмутаза (СОД, КФ 1.15.1.1); каталаза (КАТ, КФ 1.11.1.6); различные фенольные пероксидазы (ПО) с неспецифическими субстратами, например, гваяколпероксидаза (ГвПО, КФ 1.11.1.7), субстрат-специфичные пероксидазы, такие как аскорбатпероксидаза (АПО, КФ 1.11.1.11), глутатионпероксидаза (ГПО, КФ 1.11.1.9) и др.; монодегидроаскорбатредуктаза (МДГАР, КФ 1.6.5.4); дегидроаскорбатредуктаза (ДГАР, КФ 1.8.5.1) и глутатионредуктаза (ГР, КФ 1.6.4.2). АПО, МДГАР, ДГАР и ГР повышают способность систем детоксификации, образуя аскорбат-глутатионовый цикл (Knörzer et al., 1996; Rucińska et al., 1999; Mittova et al., 2000; Morabito, Guerrier, 2000; Noctor et al., 2002). Перечисленные ферменты кодируются множеством генов (Willekens et al., 1995; Asada, 1999; Wagner et al., 2002; Dietz, 2003; Mittler et al., 2004; Iqbal et al., 2006). Некоторые исследователи включают полифенолоксидазу (ПФО, КФ 1.10.3.1) в состав ферментов АОС (Vatankhah et al., 2010; Abdalla, 2011). Другие относят ПФО к ключевым ферментам вторичного метаболизма, выделяя данный фермент в отдельную линию защиты с выполнением особых функций в окислительных процессах растения (Cakmak, Römheld, 1997; Polovnikova, Voskresenskaya, 2008; Guo et al., 2014).

Кроме того, пентозофосфатный цикл (ПФЦ) считают основным ресурсом восстановленных никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаз (НАДФН-оксидаз), которые также могут участвовать как в продукции (Hammond-Kosack, Jones, 1996; Cazalé et al., 1999; Orozco-Cardenas, Ryan, 1999; Pei et al., 2000), так и в устранении АФК (Pandolfi et al., 1995; Juhnke et al., 1996). Восстановленный никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) является главным кофактором АФК-нейтрализующих путей, таких как, например, аскорбат-глутатионовый цикл (Gaetani et al., 1989; May et al., 1998).

Биохимическая особенность ферментов АОС – уничтожение строго определенного окислительного субстрата (Полесская, 2007; Прадедова и др., 2011б). Также они обладают специфичностью клеточной и органной локализации, но иногда могут быть комплементарны друг другу (ApeI, Hirt, 2004). Когда возможности АОС находятся на уровень ниже, чем количество образующихся АФК, происходит повреждение растений (Sgherri et al., 2003). Обобщенная схема АФК и АОС в растительном организме, показывающая целостность их взаимодействий, представлена на рисунке 5.

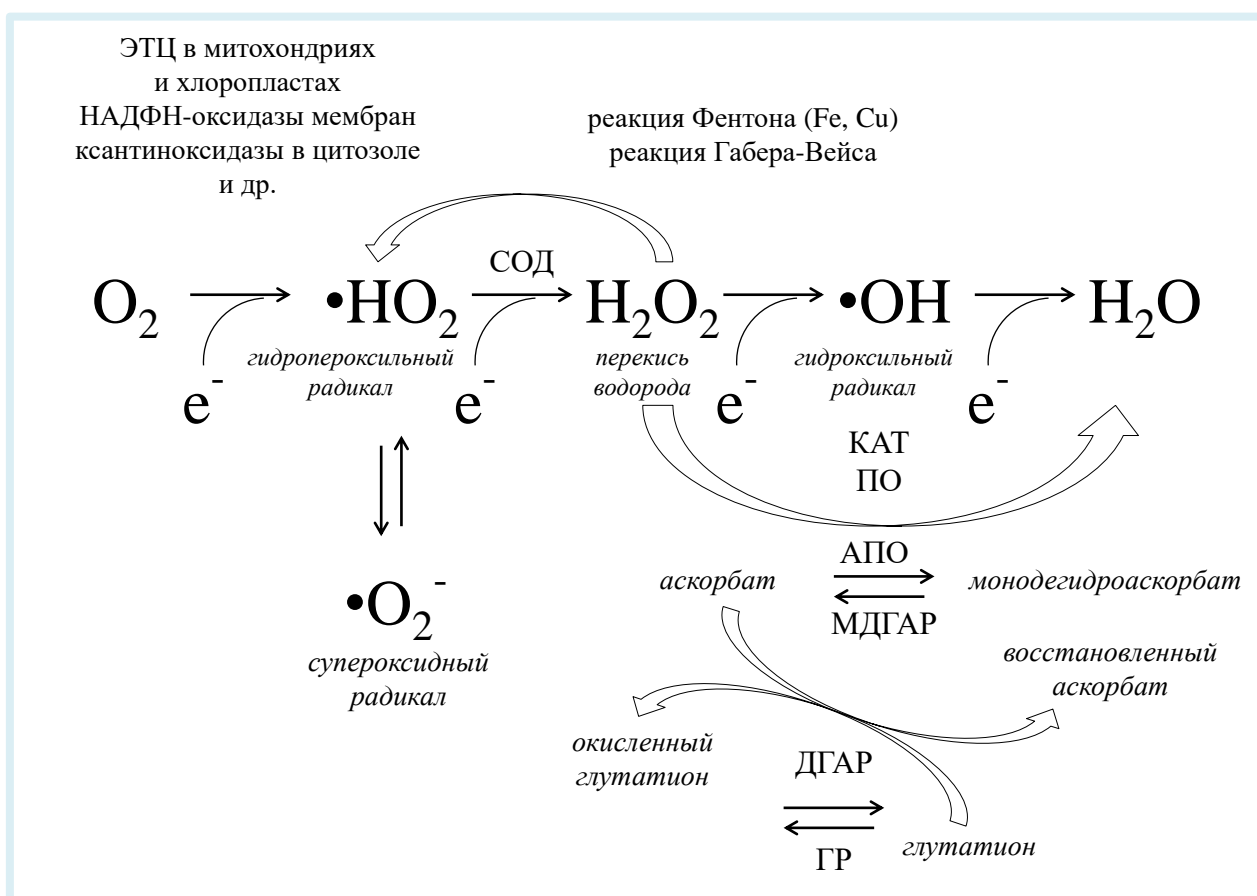


Рис. 5. Метаболические потоки АФК в растениях и ферменты АОС (по Mori, Schraeder, 2004; Zhao et al., 2016; Wang et al., 2018 с изменениями). ЭТЦ – электрон-транспортная цепь, НАДФН-оксидаза – никотинамидадениндинуклеотидфосфат-оксидаза, СОД – супероксиддисмутаза, КАТ – каталаза, ПО – пероксидаза, АПО – аскорбат-пероксидаза, МДГАР – монодегидроаскорбатредуктаза, ДГАР – дегидроаскорбатредуктаза, ГР – глутатионредуктаза.

Таким образом, растительные организмы могут рассматриваться как окислительно-восстановительные (редокс) системы, в которых происходят катаболические – оксидативные процессы – необходимы для производства энергии, и анаболические – в основном, восстановительные процессы – за счет которых расходуется ранее усвоенная энергия (Shao et al., 2008a, 2008b). Для растительных редокс-систем характерно следующее: (1) доноры электронов восстанавливают редокс-пары никотинамидадениндинуклеотида (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфата (НАДФ); (2) терминальным акцептором электронов является кислород, продуцирующий АФК; (3) промежуточные редокс-модули (соединения с сульфгидрильными группами – цистеин, метионин) за счет окисления-восстановления регулируют функции клеток (Чупахина, 1997, Jones, 2006).

Рассмотрим более подробно функции ферментов, активность которых определялась в ходе исследования.

1.2.1. Супероксиддисмуза

СОД (КФ 1.15.1.1) является важным ферментом АОС, осуществляющим первый этап защиты организмов от АФК. Этот фермент переводит супероксидный радикал в перекись водорода и молекулярный кислород согласно приведенному ниже уравнению:



В высших растениях данный фермент играет главную роль в противостоянии токсичным супероксидным радикалам. СОД регулируют клеточную концентрацию супероксидных радикалов и перекиси водорода.

Различные изоформы СОД активно работают внутри клеток и контролируются на различных этапах развития растения, а также со стороны окружающей среды (Van Camp et al., 1997). В ходе супероксиддисмутазной реакции образуется перекись водорода, которая менее активна, по сравнению с супероксидным радикалом, и утилизируется другими ферментами (Кордюм и др., 2003; Apel, Hirt, 2004; Полесская, 2007). Основной ее пул нейтрализуется КАТ, тогда как ПО могут нейтрализовывать перекись, недоступную для КАТ из-за их

высокого сродства к перекиси водорода, и, кроме того, благодаря присутствию ПО в многочисленных клеточных органеллах (Creissen et al., 1994).

Источники супероксидных радикалов в растении могут быть естественными, а именно побочными продуктами метаболической деятельности, так и вызванными внешними воздействиями (Raychaudhuri, Deng, 2000). Показано, что клетка быстро реагирует на ОС повышением активности СОД. Данный фермент рассматривается и как стресс-белок, синтезируемый в ответ на ОС. Благодаря его действию ускоряется распад супероксидного радикала на 4 порядка (Донцов и др., 2006).

Выделяют следующие изоформы СОД согласно наличию определенного переходного металла-кофактора в активном центре фермента, а именно: Cu, Zn, Mn, Fe, Ni (Bannister et al., 1987; Cannon et al., 1987; Perl-Treves et al., 1988; White, Scandalios, 1988; Bowler et al., 1989, 1992).

Так, *Cu/Zn*-СОД (цинк необходим для стабилизации конформации; молекулярная масса 30-33 кДа) (Cannon et al., 1987; Perl-Treves et al., 1988; Bowler et al., 1992) локализуется в хлоропластах (Hernandez et al., 1999), митохондриях (Kuźniak, Skłodowska, 2004), пероксисомах (Alscher et al., 2002) и, вероятно, даже в апопласте (Ogawa et al., 1996). Так, например, апопластные изоформы СОД были обнаружены во внеклеточном содержимом хвои *P. sylvestris* (Strcller, Wingsle, 1994). Значительное количество *Cu/Zn*-СОД выявлено в цитозоле (Perl-Treves et al., 1988; Scioli, Zilinskas, 1988, Strcller et al., 1994). Иммуноэлектронные микроскопические изучения показали, что цитозольные *Cu/Zn*-СОД присутствуют рядом с вакуолями растительных клеток (Ogawa et al., 1996). Интересно, что СОД может защищать ДНК-филаменты от окислительных повреждений в ядре клетки, попадая в него через ядерные поры. Несмотря на высокую специфичность фермента, в определенных условиях *Cu/Zn*-СОД проявляет прооксидантные функции, взаимодействуя с перекисью водорода, и способствует образованию супероксидных радикалов и гидроксильных радикалов (Меньщикова, Зенков, 1993).

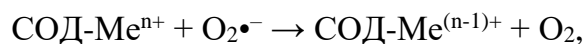
Присутствие *Cu/Zn*-СОД в сосудистых тканях (ксилема и флоэма), благодаря которой здесь образуются супероксидный радикал и перекись водорода, было обнаружено при проведении электронной микроскопии листьев *Spinacia oleracea* L. (Hérouart et al., 1993; Ogawa et al., 1996). Более того, промотер гена, кодирующего

цитозольную *Cu/Zn*-СОД, внедренный в конструкцию гена β -глюкуронидазы, активен в клетках флоэмы листьев и стеблей у *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. (Hérouart et al., 1993). Образуемая за счет деятельности СОД в сосудистых тканях перекись водорода может действовать как сигнал к поранению и развитию системной приобретенной устойчивости у растений рода *Arabidopsis* (Orozco-Cardenas, Ryan, 1999). Локализация СОД также обнаружена в клеточных стенках трахеид и окаймленных пор ксилемы, которые, как известно, обычно высоко лигнифицированы. Не лигнифицированные клетки в ксилеме *P. sylvestris* не показывают наличия СОД (Karpinska et al., 2001).

Mn-СОД (молекулярная масса 75-94 кДа) (White, Scandalios, 1988; Bowler et al., 1989) локализуется в матриксе митохондрий (Ku niak, Sk odowska, 2004) и пероксисомах (Palma et al., 1998). Наблюдается значительная гомология последовательности аминокислот в структуре фермента в этих органеллах (del Río et al., 2003).

Реже встречаются *Fe*-СОД (молекулярная масса 36-48 кДа) (Van Camp et al., 1990) и *Ni*-СОД (молекулярная масса около 80 кДа) (Kim et al., 1996). *Fe*-СОД представляет собой гомодимер с атомом железа в каждой субъединице. Обычно СОД с железом в активном центре локализована в строме и на мембранах тилакоидов хлоропластов клеток растений. Бактериальные клетки отличаются наличием СОД с никелем в активном центре (Alscher et al., 2002; Rizhsky et al., 2003; Бараненко, 2006).

СОД катализирует две последовательные реакции: восстановление и окисление супероксидными радикалами металла (Me) активного центра фермента:



Важной особенностью молекулярных изоформ СОД является их разная чувствительность к основному ингибитору супероксиддисмутазной реакции – перекиси водорода. Так, *Cu/Zn*-СОД и *Fe*-СОД подвержены ингибированию, а *Mn*-СОД – не чувствительна (Alscher et al., 2002; Бараненко, 2006).

Устойчивые и восприимчивые виды растений могут отличаться по активности СОД. Наряду с повышением активности СОД, наблюдается снижение скоростей окислительных повреждений. Так, наблюдали устойчивость к действию

стресс-факторов у трансгенных растений *Solanum lycopersicum* L. с повышенной активностью СОД (Серенко и др., 2011).

Для изоформ СОД характерна разная термостабильность. Митохондриальная СОД травянистых растений чувствительна к нагреву *in vitro*, и ее активность снижается более чем на половину через 1.5 минуты 50°C воздействия. Хлоропластная СОД способна сохранить активность на то же время уже при 70°C (Christov, Bakardjieva, 1999). Стромальная изоформа Cu/Zn-СОД не теряет каталитических свойств даже при длительном (более 10 минут) кипячении (Khanna-Chopra, Sabarinath, 2004).

Роль СОД исследовалась очень многими авторами у разных растений. Было показано, что существует контроль ее активности во время развития растения (White et al., 1990; Perl-Treves, Galun, 1991; Herouart et al., 1993; Zhu, Scandalios, 1993). Так, экспрессия генов СОД у растений *S. lycopersicum* регулируется во время развития в ответ на свет и стресс. Верхушки побегов, бутоны, проростки и молодые листья *S. lycopersicum* содержали высокие уровни транскриптов мРНК СОД (Perl-Treves, Galun, 1991). Уровень транскриптов мРНК Mn-СОД у растений семейства *Lamiaceae* возрастал после прорастания. У растений *Zea mays* L. общая активность СОД увеличивалась в ядерных экстрактах по прошествии 10 дней после опыления (White et al., 1990). Активность Mn- и Cu/Zn-СОД возрастает в течение процессов развития ядра. СОД обнаруживается у растений *Plantago major* L. *in vitro* в многочисленных отростках побегов. Кроме того, СОД участвует в процессах лигнификации у древесных растений (Karpinska et al., 2001).

Изоформы СОД принимают активное участие в развитии растений, их количество может увеличиваться параллельно с процессами новообразования или может претерпевать посттрансляционные изменения кодирующих ее генов. Накопление транскриптов СОД тканеспецифично зависит от стадии развития организма (Zhu, Scandalios, 1993). Супероксиддисмутазная реакция запускает реакции ОС, специфичного для каждой органеллы. Локализация образуемой перекиси водорода, даже более чем ее абсолютная концентрация, может быть ответственна за протекание ОС, и контролируемые количества перекиси водорода необходимы для поддержания нормальных состояний клеточных стенок и последующего деления клеток (de Marco, Roubelakis-Angelakis, 1996).

1.2.2. Каталаза

КАТ (КФ 1.11.1.6) – тетрамерный гемм-содержащий фермент (молекулярная масса около 250 кДа). Реакция заключается в разложении перекиси водорода до воды и молекулярного кислорода. Молекулярная масса мономеров растительных КАТ примерно 55 кДа (Regelsberger et al., 2002).

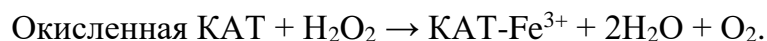
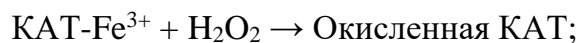
Отличается от других ферментов АОС тем, что не требует восстановителя для протекания реакции. Имеет высокую специфичность к перекиси водорода, но низкую активность в реакциях нейтрализации органических пероксидов. Локализована преимущественно в пероксисомах и глиоксисомах, которые продуцируют перекись водорода, может встречаться и в митохондриях (Меньщикова, Зенков, 1993; Guan, Scandalios, 2000; Полесская, 2007). КАТ была открыта и охарактеризована ранее всех остальных ферментов АОС и встречается практически у всех организмов, даже анаэробных. (Zamocky et al., 2008).

На активность КАТ влияет концентрация перекиси водорода – её основного субстрата (Bakalova et al., 2004; Blackman, Hardham, 2008). КАТ имеет очень высокие скорости реакций, но низкое сродство к перекиси водорода, поэтому требует больших количеств субстрата (Mittler, Zilinskas, 1991; König et al., 2002). Низкое сродство к перекиси водорода обозначает, что почти всегда имеется линейная зависимость между активностью КАТ и концентрацией перекиси, даже когда её концентрации супрафизиологические. Поэтому четко определить константу Михаэлиса для КАТ очень сложно. Считается, что она находится в диапазоне 40-600 ммоль/л (Chelikani et al., 2004). Эти значения намного выше тех, что обнаружены для растительных ПО, для которых константа Михаэлиса ниже 100 мкмоль/л (Mittler, Zilinskas, 1991; König et al., 2002). Таким образом, КАТ работают значительно ниже своей максимальной мощности.

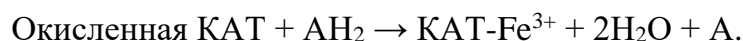
КАТ может долгое время сохранять свою активность. Белок фермента не нуждается в дополнительной энергии активации для работы, поэтому кинетические параметры КАТ определяются скоростью доставки субстрата к активному центру (Донцов и др., 2006). Кроме того, КАТ, не нуждаясь в дополнительных эквивалентах, находится в стабильном состоянии при изменении окислительно-восстановительного статуса клетки, поэтому более устойчива к стрессу по сравнению с другими компонентами АОС. В физиологических условиях каталазная

активность фермента примерно в 10000 раз выше, чем пероксидазная (Зенков и др., 2001; Кордюм и др., 2003).

Разложение пероксида водорода КАТ осуществляется в две стадии (Wendel, 1988):



Перекись кислорода является предшественником очень реакционного гидроксильного радикала. Важна физиологическая роль КАТ в прерывании этого процесса. В окисленном состоянии КАТ может действовать как ПО, катализируя окисление спиртов, фенолов, альдегидов (Кордюм и др., 2003), среди которых могут быть метанол, этанол, формальдегид и муравьиная кислота (Van Breusegem et al., 2001) в соответствии с уравнением:



Иногда КАТ может выполнять прооксидантные функции, участвуя в образовании АФК при разложении перекиси водорода. Имеются сведения о том, что супероксидный радикал может ослаблять КАТ (Семчишин, Лушак, 2004).

Различают три вида КАТ: монофункциональные (Chelikani et al., 2004), бифункциональные (Mutsuda et al., 1996; Regelsberger et al., 2002), которые найдены у некоторых грибов и прокариот, и марганец-КАТ. Эти группы независимо эволюционировали в двух различных семействах белков: гем-содержащие (тип I) КАТ, обладающие железо-порфириновым кофактором, и негемовые (тип II) КАТ (известные как «псевдокаталазы»), имеющие двухъядерный активный центр, содержащий марганец. Последние проявляют более низкую специфическую активность по сравнению с гем-содержащими КАТ. Каталазные структуры состоят из петлевых полипептидных цепей, расположенных в виде димеров или тетрамеров с ядром, несущим ион железа или марганца (Grigoras, 2017). Разделение между моно- и бифункциональными КАТ не абсолютное. Бифункциональные КАТ могут осуществлять перекись-зависимое окисление органических субстратов. Бифункциональные пероксидазы-каталазы больше похожи на гем-содержащие ПО, такие как АПО, их сродство к перекиси водорода выше, чем у монофункциональных (Regelsberger et al., 2001, Zamocky et al., 2008).

У растений присутствуют различные изоформы фермента. Было показано, что растительные КАТ можно разделить на: (1) присутствующие в фотосинтетических тканях, они удаляют перекись водорода во время процесса фотодыхания; (2) представленные в проводящих тканях и участвующие в лигнификации; (3) встречающиеся в семенах и молодых растениях, их активность связана с удалением излишних количеств перекиси водорода во время разрушения жирных кислот и глиоксилатного цикла в глиоксисомах (Yang, Poovaiah, 2002).

Так, у растений *N. plumbaginifolia* гены, кодирующие первую изоформу КАТ, обуславливают 80 % каталазной активности листа и представлены в палисадных клетках паренхимы. Гены, кодирующие вторую изоформу, объясняют 20 % общей активности и найдены, главным образом, во флоэме (Willekens et al., 1995).

Для определения активности КАТ используют концентрации перекиси водорода около 40 мМ (для сравнения у ПО всего лишь 0.2-0.5 мМ перекись водорода). При определении КАТ активности отмечают, что она обнаруживается высокая практически во всех тканях. На модельных растениях рода *Arabidopsis* самые высокие значения КАТ были обнаружены в цветущих органах, листьях – около 200-500 мкмоль на мг белка за мин. Эти активности примерно в 100 раз выше, чем для ПО. Самые невысокие значения активности КАТ были отмечены в семенах и корнях и составили десятки мкмоль на мг белка за мин (Mhamdi et al., 2010).

1.2.3. Пероксидаза

ПО являются гемосодержащими гликопротеидами (Rizhsky et al., 2003) и нейтрализует перекись водорода параллельно с окислением соединений фенольной природы. Среди многочисленных функций ПО, окисление монолигнолов или дегидрирование монолигнолов – одна из самых важных (Harkin, Obst, 1973).

Полифункциональность ПО проявляется в том, что активность фермента подвержена изменениям в как в ходе онтогенеза растений, так при воздействии различных стресс-факторов (Андреева, 1991; Кордюм и др., 2003; Passardi et al., 2005). Это обусловлено конформационными изменениями (Minibayeva et al., 2009), посттрансляционными модификациями (Tekchandani, Guruprasad, 1998), индуцированием синтеза фермента и появлением новых молекулярных форм

(Asada, 1992; Газарян и др., 2006; Максимов и др., 2011). Кроме того, для ПО, наряду с утилизацией, свойственна и генерация АФК, таких как супероксидный и гидроксильный радикалы (Андреева, 1991; Christensen et al., 2001; Passardi et al., 2004). ПО относятся к защитным белкам PR-9 (pathogenesis-related proteins) класса (Kim et al., 2008).

ПО могут быть отнесены к (1) растворимым (содержащимся в вакуолях и цитоплазме), (2) ионно-связанным (локализованным в мембранах и клеточной стенке) и (3) ковалентно-связанным (находящимся, в основном, в клеточной стенке) (Lee, Lin, 1995).

ПО относят к секретируемым ферментам, которые при определенных условиях могут перемещаться из цитозоля в апопласт. Например, секреция ПО в апопласт может быть следствием ответа клеток на патогенные элиситоры у *Allium cepa* L. (McLusky et al., 1999) и раневой стресс у *Triticum aestivum* L. (Часов и др., 2005).

Суперсемейство ПО растений на основе гомологии аминокислотных последовательностей и особенностей посттрансляционной модификации делится на 3 класса: (1) микробиальные ПО, бактериальные каталазы-пероксидазы (КФ 1.11.1.6), дрожжевую цитохром С ПО (КФ 1.11.1.5) и АПО растений (КФ 1.11.1.11); (2) ПО грибов, включающие лигнинпероксидазу, марганецпероксидазу и секреторные ПО растительного типа; (3) классические ПО растений. ПО 2-го и 3-го классов (КФ 1.11.1.7) гликозилированы, содержат 4 дисульфидные связи и 2 катиона кальция на молекулу фермента (Газарян и др., 2006). Классические ПО растений кодируются множеством генов, например, 73 гена у *Arabidopsis thaliana* L. и более сотни у *Oriza sativa* L. (Tognolli et al., 2003).

Растительные ПО характеризуются достаточно стабильной структурой (Welinder, 1992). Однако они могут содержать различные составные части (домены) в зависимости от используемого субстрата. В основном, ПО ассоциируются, как апопластные ферменты клеточных стенок (Welinder, 1992), однако существуют и вакуолярные изоформы (Carter et al., 2004). Апопластные ПО имеют огромное значение в связи с интенсивным образованием АФК в клеточных стенках и их роли во многих физиологических процессах и процессах развития (Lariguet et al., 2013).

Субстраты классических ПО растений можно разделить на 3 группы: (1) двухэлектронные доноры электронов, которые связываются вблизи активного центра (у плоскости гема) или проникают внутрь активного центра (прямой перенос кислорода с феррилла гема) (Harris et al., 1993); (2) простые одноэлектронные ароматические субстраты, которые связываются вблизи активного центра; (3) субстраты, окисляющиеся по ЭТЦ (Rodríguez-López et al., 2000).

Каждая ПО имеет собственный набор субстратов, поэтому активность фермента по отношению к новому субстрату (донору электронов) часто непредсказуема (Газарян и др., 2006). Одна ПО может окислять разные субстраты, разные ПО могут окислять один и тот же субстрат, одиночные ПО могут быть обнаружены в различных тканях с различными потенциальными субстратами пероксидазных реакций. Есть ПО, обладающие строгой субстратспецифичностью. Так, например, АПО использует аскорбиновую кислоту как восстановитель на первой ступени аскорбат-глутатионового цикла. Это наиболее важная ПО в нейтрализации перекиси водорода в цитозоле и хлоропластах (Mittova et al., 2000; Smirnoff, 2000). Таким образом, многогранная роль ПО может быть объяснена разнообразием субстратов и пространственно-временной регуляцией их экспрессии.

Молекулярная масса мономеров изоферментов ПО – 6-60 кДа (Gaspar et al., 1982). Термостабильность щелочных и кислых ПО выше, чем у нейтральных изоформ, которые теряют 80 % при 65°C (McLellan, Robinson, 1983).

ПО участвуют в химических реакциях, в которых перекись водорода выступает окислителем (Савич, 1989; Gaspar, 1991). ПО клеточных стенок могут проявлять оксидазную активность, передавая электроны от восстановителей (например, НАДН) на молекулярный кислород с последующим образованием супероксидного радикала и перекиси водорода (Bestwick et al., 1997; Chen, Schopfer, 1999; Минибаева, Гордон, 2003).

Растворимые ПО 3-го класса характеризуются, в основном, антиоксидантными функциями (Ivanov et al., 2001) и локализованы в цитоплазме и вакуолях. Восстановителями в реакции пероксидазного окисления, в таком случае, могут использоваться различные соединения, в частности, фенолы, тогда как в

вакуолях субстратом неспецифических ПО выступает аскорбат (Mehlhorn et al., 1996). Некоторые исследователи выделяют отдельную вакуолярную систему аскорбат / фенолы / ПО как важную составляющую АОС (Takahama, 2004).

Большинство исследователей связывает активацию АОС с функционированием ПО. Более того, предлагается использование ПО в качестве стрессового маркера (Roitto et al., 1999). Однако функции ПО не ограничиваются лишь элиминированием перекиси водорода. Некоторые апопластные ПО, окисляя пиридиннуклеотиды и полифенолы, проявляют оксидазную функцию, и образуют при этом супероксидный радикал и перекись водорода (Ros Barceló, 2000; Bolwell et al., 2002). ПО могут катализировать реакции образования гидроксильных радикалов, которые часто разрушают ковалентные связи у различных молекул близко к зонам своего образования, в присутствии восстановителей типа НАДФН (реакция Габера-Вейса) (Chen, Schopfer, 1999).

Хотя растительные ПО могут проявлять различную субстрат-специфичную активность *in vitro*, это не значит, что такой же эффект будет *in vivo* (de Marco et al., 1999). У *Solanum tuberosum* L. возникновение и исчезновение активностей ПО в течение конкретных биологических процессов и в специфических органеллах было показано и *in vivo*, и *in vitro* (Loukili et al., 1999; Allison, Schultz, 2004).

Выявлено, что экзогенная перекись водорода может ингибировать ионно-связанную и растворимую формы ПО в колеоптилях растений семейства *Poaceae* (Шарова, 1999; Колупаев, Карпец, 2008). Также активность ПО снижалась в присутствии перекиси водорода *in situ* и *in vitro* у гипокотилей *Lupinus albus* L. (Hernandez-Ruiz et al., 2000). Возможно, в этих случаях активность ПО переключается на активность КАТ для того, чтобы не допустить образование избытка АФК. Так, некоторые формы апопластных ПО проявляли каталазную активность при высоких концентрациях перекиси водорода (Mika et al., 2004).

Некоторые изоформы ПО синтезируются в ответ на стресс *de novo* (Андреева, 1991). Исследователи отмечают, что изоферментный спектр ПО у контрольных растений *T. aestivum* и растений, подвергнутых различным стрессовым воздействиям, отличается (Minibayeva et al., 2009). Часто при стрессовых условиях он расширяется привлечением дополнительных изоформ.

1.2.4. Полифенолоксидаза

ПФО (КФ 1.10.3.1) – группа медь-содержащих ферментов, очень широко распространенных среди многих организмов. Они катализируют окисление фенолов до хинонов, которые имеют коричневую окраску (Mayer, 1986; Núñez-Delicado et al., 2005). ПФО вовлечены в образование пигментов, улавливание АФК и защитные механизмы растений от патогенов и насекомых (Trebst, Derka, 1995; Constabel et al., 2000; Mohammadi, Kazemi, 2002). ПФО участвуют в создании механических полифенольных барьеров, задерживающих проникновение патогенов. ПФО может присутствовать во многих органах и тканях, включая корни, листья, проводящие ткани и другие (Constabel et al., 1996). Присутствие фермента в хлоропластах позволяет предполагать, что ПФО участвует в псевдоциклическом фотофосфорилировании и/или контроле уровня кислорода (Steffens et al., 1994).

Нет доказательств существования прямого механизма, объясняющего связь между ПФО и абиотическим стрессом (Mayer, 2006). В то время как активность ПФО может быть связана с накоплением АФК (Thipyarong et al., 2004; Mayer, 2006) и изменением окислительно-восстановительного статуса (Webb et al., 2014), фермент может участвовать в буферном распределении кислорода (Vaughn, Duke, 1984) и снижении интенсивности фотосинтеза (Trebst, Derka, 1995).

Когда ткань повреждена, происходит повреждение пластид, клеточной органеллы, где, как правило, находится ПФО. Так фермент встречается с фенольными соединениями, которые выходят из поврежденных вакуолей – основной органеллы их запасаения (Mayer, Harel, 1979).

Активный центр фермента состоит из двух атомов меди. Обычно молекулярный вес ПФО находится в пределах 54-62 кДа (Constabel et al., 1996; Van Gelder et al., 1997). Считают, что ПФО могут содержать протеолитический участок вблизи С-терминального конца полипептида (Marusek et al., 2006). Часто фермент может претерпевать различные изменения и только после них переходить в активное состояние (Rathjen, Robinson, 1992).

Растительные ПФО имеют широкую субстрат-специфичность и могут окислять разнообразие моно, ди- и полифенолов (Es-Safi et al., 2003). Фермент обладает монофенолазной и дифенолазной активностью. Последняя запускает

последующую неэнзиматическую полимеризацию хинонов до меланинов, пигментов высокой молекулярной массы темного цвета (Espín et al., 1998; Peñalver et al., 2005).

ПФО способна окислять множество орто-дифенолов, таких как кофейная кислота и ее производные, производные пирокатехина или дигидроксифенилаланина. Однако ПФО разных растений проявляют различные предпочтения (Constabel et al., 1996). Ортодигидроксibenзолы были часто встречены среди субстратов ПФО, например, пирокатехин и мирицетин (Guyot et al., 1996; Jimenez, Garcia-Carmona, 1999). В некоторых источниках описывается окисление тригидроксibenзолов, таких как галловая кислота (Shin et al. 1997), но непонятно, насколько такие реакции распространены. Для некоторых ПФО была описана монофенолазная активность (Wuyts et al., 2006).

Сложные эфиры кофейной кислоты, такие как хлорогеновая кислота, считаются отличными субстратами для ПФО (Li, Steffens, 2002; Melo et al., 2006). Они же являются предшественниками лигнина (Humphreys, Chapple, 2002). Пирокатехин считается одним из наиболее часто встречаемых субстратов ПФО. Так, например, у *Populus tremuloides* Michx. он высвобождается при распаде крупных фенольных гликозидов (Clausen et al., 1989) и затем становится доступным в качестве субстрата в поврежденных тканях (Haruta et al., 2001). В отличие от этого примера, для многих ПФО эндогенные субстраты неизвестны.

Внутриклеточный pH – важный фактор для активности ферментов, работающих с фенолами (Bligny, Douce, 1983; Guyot et al., 1996, Yoruk, Marshall, 2003). Оптимум pH для ПФО лежит в диапазоне 5-7.5, более низкие значения pH понижают активность фермента (Queiroz et al., 2008). Изменение pH может влиять на конформацию активного центра, на взаимодействие с субстратами. Так, окисление пирокатехина может давать разные продукты при разных pH (Guyot et al., 1996; Yoruk, Marshall, 2003).

Температура – другой важный фактор, который может сказываться на активности ПФО. Изменения температуры могут влиять на растворимость кислорода, являющегося одним из субстратов, требуемых для каталитической активности ПФО (Whitaker, 1994).

Существование многочисленных молекулярных форм ПФО обнаружено у многих растений. Эти изоформы отличаются по физическим и химическим свойствам, температурному и рН оптимуму, субстратной специфичности. Наличие множественных изоформ имеет огромное физиологическое значение *in vivo* (Harel et al., 1965; Constantinides, Bedford, 1967; Harel, Mayer, 1968; Shaw et al., 1991). Их состав может отличаться на разных стадиях онтогенетического развития растения, может зависеть от локализации внутри клетки и др. (Harel, Mayer 1968; Lerner et al., 1972; King, Flurkey 1987; Marques et al., 1995; Shin et al., 1997; Mari et al., 1998; Van Leeuwen, Wichers, 1999).

Вовлечение ПФО в окисление фенольных соединений у различных растений отмечают, как самую важную роль. Деятельность ПФО в обычных условиях, не связанных с повреждением, зачастую ограничивается дистанционным отдалением фенольных субстратов от места синтеза фермента (Vaughn et al., 1988; Lopez, Dimick, 1991). Считается, что старение тканей или какие-либо повреждения биологических барьеров между ферментом и полифенолами приводит фермент в активное состояние (Vaughn, Duke 1984; Felton et al., 1989; Lopez, Dimick 1991; Murata et al. 1997).

В основном, действие ПФО можно разделить на три составляющие: (1) окислительная полимеризация хинонов с образованием нерастворимого меланина над поранениями, запечатывание инфицированных тканей (Vámos-Vigyázó, 1981; Vaughn et al., 1988; Zawistowski et al., 1991); (2) бактерицидный и фунгицидный эффект гидроксифенолов и хинонов на атаки микроорганизмов и токсические эффекты полимеризованных фенолов на проникновение вирусов в поврежденные ткани (Mayer, Harel, 1979; Vaughn et al., 1988; Scalbert, 1991; Zawistowski et al., 1991); (3) ковалентная модификация белков хинонами, как механизм защиты от употребления другими организмами (Felton et al., 1989). Хиноны, образованные ПФО-реакцией с фенольными соединениями, могут модифицировать белки, используемые организмами для питания, реагируя с аминами, сульфгидрильными, фенольными и имидазольными группами (Matheis, Whitaker, 1984).

Кроме того, синтез и аккумуляция натуральных природных фенольных компонентов в связи с механическим или биологическим стрессом играют важную роль в защите растений, так как эти соединения действуют как субстраты для ПО и

ПФО (Macheix et al., 1990). ПФО может действовать как сигнальная молекула, которая оповещает растение о присутствии фенолов (Bais et al., 2004).

Обсуждается участие ПФО в фотосинтезе (Mayer, Harel, 1979; Vaughn, Duke, 1984). Обнаруживается корреляция между активностью фермента и высокими уровнями кислорода в хлоропластах (Vaughn, Duke, 1984), кроме того, существует колокализация белка ПФО с белками фотосистем (Lax, Vaughn, 1991; Sheptovitsky, Brudvig, 1996).

1.2.5. Взаимодействие компонентов АОС

Ферменты АОС образуют единую сеть за счет АФК и различных фенольных субстратов, которые в одной ферментативной реакции могут являться продуктами взаимодействия, а для следующей реакции уже быть субстратами.

В основе функционирования АОС лежит сложный многостадийный механизм действия. При этом взаимодействия между антиоксидантными компонентами могут быть различными: аддитивными, синергическими и антагонистическими (Меньщикова, Зенков, 1993), сами АО при этом разнообразны по структуре, природе, функциям, могут функционировать сопряженно или разнонаправленно (Прадедова и др., 2011б).

В целом, функционирование АОС в клетках определяется локальными и обще клеточными циклическими и каскадными взаимодействиями АО. За счет одновременной работы различных компонентов АОС возникают своеобразные антиоксидантные цепи переноса электронов (Меньщикова, Зенков, 1993). Так переключение потока электронов может быть причиной корреляции между активностью КАТ и СОД, которые могут быть локализованы в разных частях клетки (Колупаев, 2007).

Одновременная работа отдельных частей АОС – основа для формирования устойчивости организма к действию АФК. АО должны непрерывно синтезироваться и поступать к месту их потребления, обеспечивая антиоксидантную защиту, которая обусловлена определенным состоянием сопряженных «антиоксидантных структур» (Тиунов, 1995).

Уровень внутриклеточных АО определяется генетически (Меньщикова, Зенков, 1993). Отмечается необходимость исследования АОС, состоящих из

многих компонентов. Однако, такие исследования не распространены широко. Одним из немногих примеров можно назвать изучение определенных редокс-циклов (например, аскорбат-глутатионового) (Gechev et al., 2003; Полесская, 2007).

В литературе встречаются примеры таких каскадных взаимодействий. Так, например, при засухе у древесных растений различных семейств наблюдали положительную корреляцию активности СОД и активностями КАТ и ПО. КАТ, в свою очередь, положительно коррелировала с ПО (Liu et al., 2011). Также во многих работах описывается явление возрастания активности КАТ и ПО как результат высокого запроса на гашение образовавшейся перекиси водорода по супероксиддисмутазной реакции (Türkan et al., 2005; Chen, Cao, 2008).

1.3. Активность ферментов антиоксидантной системы в жизни растения

1.3.1. Участие в процессах роста, дифференциации и старения

Рост растения связан с непосредственным расширением клеток, которое сопровождается разрыхлением и уплотнением их клеточных стенок. Баланс между этими двумя процессами контролируется антагонистическим действием ПО, а именно: (1) формированием жесткой клеточной стенки посредством окисления ароматических компонентов клеточных стенок (монолигнолов, коричных кислот, ароматических аминокислот) в присутствии перекиси водорода; (2) разрушением клеточной стенки посредством регулирования концентраций перекиси водорода и генерирования других АФК, таких как гидроксильный радикал, которые разрушают ковалентные связи в полимерах клеточных стенок (Schopfer, 2001). Кроме того, ПО могут контролировать процессы удлинения клеток (Cosio et al., 2009).

ПО играют важные функции и во время процессов прорастания у растений. На растениях рода *Arabidopsis* была показана локализация АФК в клеточной стенке эндосперма до его разрушения, там же обнаружена ПО активность (Lariguet et al., 2013). Кроме того, АФК, образующиеся при прорастании семян, могут защитить развивающийся эмбрион от патогенов (Schopfer, 2001).

Есть данные, что АФК необходимы для клеточной дифференциации (Takemoto et al. 2007). АФК и АОС участвуют в формировании бобово-ризобиального симбиоза (Vasse et al., 1993; Santos et al., 2001; Hérouart et al., 2002;

Ramu et al., 2002; Васильева и др., 2004), отключая цепочку защитных реакций при проникновении ризобий или запуская их при неблагоприятных условиях для симбиоза (Hérouart et al., 2002). Интенсификация окислительных реакций при формировании бобово-ризобиального симбиоза необходимо для экспрессии у бобовых ранних генов нодулинов и способствует возрастанию экспрессии этих генов ПО (Ramu et al., 2002).

Есть множество фактов, которые свидетельствуют о том, что при изменении условий среды, АОС может играть роль, так называемых, пропускных пунктов в течение клеточного цикла растений, приводя к адекватному ответу растений. Так, например, глутатион-зависимый путь, протекающий при участии ферментов АОС, необходим, чтобы инициировать и поддерживать клеточные деления на протяжении постэмбрионального развития корня у растений рода *Arabidopsis* и *Nicotiana tabacum* L. (Vernoux et al., 2000). В то время как протекание клеточного цикла находится под негативным контролем АОС, соматический эмбриогенез стимулируется перекисью водорода (Cui et al., 1999), кроме того, она необходима для поддержания гравитропизма корня (Joo et al., 2000).

В основе связи ОС и ростовых процессов лежит работа МАП-киназ, которые образуют семейство киназ, играющих необходимую роль в передаче экстраклеточных сигналов от мембраны к ядру через каскад фосфорилирования (Boutros et al., 2008). Разнообразные клеточные функции, от выживания клеток до ПКС, регулируются МАП-киназным сигналингом (Naagenson, Wu, 2010). Перекись водорода специфически активирует МАП-киназы, что далее проявляется в индукции специфических генов стресса (Kovtun et al., 2000).

Обнаружена роль АФК в процессах старения. В 1956 г Д. Харманом была открыта свободнорадикальная теория старения (Harman, 1955), обосновывающая связь между образованием АФК и процессами старения.

Старение, в целом, – это зависящая от возраста медленная форма клеточной смерти, в течение которой происходит перераспределение веществ в растении и направление их в те части, где в данный момент происходит рост (Lim et al., 2007). Увеличенная продукция АФК один из самых ранних ответов растительных клеток на старение. Отмечается, что, в первую очередь, при старении нарушается окислительно-восстановительный баланс (Jing et al., 2008). АФК, являющиеся

продуктами окислительных реакций, оказывают разрушительный эффект на молекулы ДНК, РНК, белки, липиды, что может привести к активации процессов старения. Эта теория прекрасно подтверждается многочисленными практическими фактами (Beckman, Ames, 1998; Landis et al., 2004; Chen et al., 2007). Позднее теория была более сужена до Митохондриальной теории старения, в связи с тем, что митохондрии являются одним из главных ресурсов АФК (Harman, 1972).

Многочисленные работы свидетельствуют о вкладе ферментов АОС в процессы старения. Так, например, процессы старения листа вызывают изменения в метаболизме АФК, характеризующиеся дальнейшим исчезновением каталазной активности и накоплением супероксидного радикала и перекиси водорода в пероксисомах (del Rio et al., 1998). Кроме того, накопленные в пероксисомах АФК могут диффундировать по другим органеллам, выполняя сигнальные функции. Частично нейтрализация перекиси водорода может уравниваться за счет работы аскорбат-глутатионового цикла, но и его работа может быть ослаблена процессами старения. Происходит снижение активности АПО и МДГАР (Jiménez et al., 1998). В основном, окислительные реакции запускаются в митохондриях и пероксисомах. Старение вызывает ослабление работы АОС в митохондриях, там обнаруживаются высокие концентрации перекиси водорода (Jiménez et al., 1998). В пероксисомах стареющих листьев наблюдается резкое возрастание содержания перекиси водорода и глубокая депрессия активности КАТ (del Rio et al., 1998).

1.3.2. Участие в процессах образования различных по составу клеточных стенок

Долгое время симпласт считался более функционально активным и интересным по сравнению с апопластом – достаточно инертным образованием, который состоит из межклеточного пространства, клеточной стенки и внешней поверхности плазмалеммы, и транспортирует воду и растворы солей в симпласт. Сейчас считается, что апопласт является резервуаром информации о биотическом и абиотическом окружении клетки и может участвовать в генерации и рецепции стрессовых сигналов и контроле роста растительных клеток (Dumas et al., 2008).

Отмечают, что клеточная поверхность чутко реагирует на абиотических и биотических условий. При стрессовых условиях на поверхности клетки

обнаруживаются ферменты, участвующие в создании системы фитоиммунитета. Сначала ОС сопровождается запуском ОВР на поверхности клеток, при этом сразу может наступить гибель клетки (Часов, Минибаева, 2014). Система редокс-регуляторов апопласта является одним из ключевых источников АФК (Minibayeva et al., 1998; Минибаева, Гордон, 2003).

На растениях рода *Arabidopsis* было показано, что 500 различных протеинов клеточной стенки распределены в 9 функциональных классов (Jamet et al., 2008; Albenne et al., 2013). Наиболее обширной группой являются белки, работающие с углеводами (25.8 %), среди них те, которые приводят к их синтезу или их распаду. Вторая очень большая группа – оксидоредуктазы (14.6 %), которая, по большей части, представлена ферментами АОС, – и практически половина из них принадлежит к ПО. Ферменты АОС участвуют в образовании непосредственно клеточных стенок и их сшивок, обеспечивая физико-химическую защиту и водонепроницаемость (Werker et al., 1979, Halloin, 1982; Egley et al., 1983, Marles et al., 2003; Pourcel et al., 2005).

На функционирование АОС апопластного пространства оказывают влияние стрессы биотического и абиотического характера (Luwe, 1996; Dietz, 1997; Vanacker et al., 1998a, 1998b). Кроме того, эти стрессы индуцируют синтез АО и ферментов АОС в апопласте клеток (Luwe, 1996; Ranieri et al., 1996; Blinda et al., 1997; Thordal-Christensen et al., 1997; Schraudner et al., 1998; Vanacker et al., 1998a, 1998b; Piqueras et al., 1999; Hernández et al., 2001).

Долгое время информация о присутствии ферментов АОС и низкомолекулярных АО в апопласте растительных тканей была недостаточна, работа аскорбат-глутатионового цикла также сначала не была исследована (Castillo, Greppin, 1988; Polle et al., 1990; Luwe, 1996; Dietz, 1997; Vanacker et al., 1998a). Однако позднее было обнаружено присутствие в апопласте активностей СОД, КАТ, ПО, МДГАР и ДГАР, ГР. Кроме того, было отмечено, что аскорбат, дегидроаскорбат и восстановленный глутатион могут присутствовать в апопласте в достаточно высоких концентрациях (Polle et al., 1990; Luwe, 1996; Ranieri et al., 1996; Vanacker et al., 1998a, 1998b).

В целом, ПО непосредственно вовлечены в многочисленные динамические процессы, происходящие в клеточной стенке (Fry, 2004a, 2004b; Cosgrove, 2005). В

апопласте локализуется одна из самых важных и функционально активных ПО – апопластная ПО или ПО клеточной стенки. Деятельность апопластной ПО – один из основных источников АФК (Torres et al., 2002; Bindschedler et al., 2006). За счет деятельности ПО и работы других ферментов – различных оксидаз, в том числе, таких как НАДФН-оксидазы, в клеточной стенке генерируются АФК, основной из которых является перекись водорода (Caliskan, Cuming, 1998; Møller, McPherson, 1998; Ros-Barceló et al., 2002; Kawano, 2003; Liskay et al., 2003).

Ферменты АОС, перекись водорода, как наиболее долгоживущая АФК, и другие АФК вовлечены в очень важный процесс – лигнификацию клеточной стенки, которая основана на процессах полимеризации монолигнолов (Ogawa et al., 1996). Так, от интенсивности работы АОС в клеточных стенках, направленной на лигнификацию, будет зависеть состав клеточных стенок: будут ли в них преобладать структурные звенья углеводной или фенольной природы. В перераспределении этих процессов наибольший вклад имеют апопластные ПО или ПО клеточных стенок. ПО активно окисляют монолигнолы в апопластном пространстве (Koutaniemi et al., 2005, 2007).

Многие исследования показали наличие корреляций между ПО активностью и содержанием лигнина (Ranocha et al., 2002; Blee et al., 2003). Структурные элементы клеточных стенок, такие как экстенсины и остатки феруловых кислот в полисахаридах могут инициировать ПО активность, вызывая образование сшивок, способствуя повышению жесткости клеточной стенки и остановке удлинения клеток (Brownleader et al., 2000; Fry, 2004a, 2004b). Напротив, ПО также способны генерировать очень мощный гидроксильный радикал, который может вызывать разрушение клеточных стенок и способствовать удлинению клеток (Liskay et al., 2004).

Участие растительных ПО в биосинтезе лигнина было показано на многих растительных объектах, в том числе на древесных (Polle et al., 1994, 1997; Fagerstedt et al., 1998; Tsutsumi et al., 1998; Christensen et al., 1998, 2001; McDougall, 2001; Kärkönen et al., 2002; Li et al. 2003; Marjamaa et al. 2006a, 2006b; Koutaniemi et al., 2005, 2007).

За счет перекись-зависимой окислительной полимеризации оксикоричных спиртов, а также в результате образования эфирных связей с поперечно-

сшивающими агентами – фенолкарбонowymi кислотами с участием ПО могут формироваться защитные барьеры из лигнина и суберина (Андреева, 1991; Bernards, Razem, 2001; Mellon, 1991; Горшкова, 2007).

Изучение биохимических основ процессов лигнификации на древесных растениях представляет особый интерес ввиду их экономической важности для получения древесины и ее использования как биоэнергетического ресурса. В связи с этим активно изучаются ферменты и гены, их кодирующие (Boerjan et al., 2003; Marjamaa et al., 2007, 2009). Кроме того, исследователей интересует активность различных изоформ ПО в лигнифицирующейся ксилеме (Polle et al., 1997; Fagerstedt et al., 1998; Tsutsumi et al., 1998; Christensen et al., 1998, 2001; McDougall, 2001; Marjamaa et al., 2006a).

У растений *Populus trichocarpa* Trichobel во вторичных клеточных стенках лигнифицирующихся волокон были обнаружены катионные изоформы ПО со способностью окислять полимерные фенольные субстраты (Christensen et al., 1998; Sasaki et al., 2006). В геноме *P. trichocarpa* Torr. & A.Gray ex. Hook. было идентифицировано множество генов фенилпропаноидного пути, многие из которых кодировали ПО (Tuskan et al., 2006). В лигнифицирующейся ксилеме *P. abies*, *P. sylvestris*, *B. pendula* обнаруживаются изоформы ПО. Кроме того, самая высокая экспрессия генов, кодирующих ПО, обнаруживается локально у *P. abies* в развивающихся трахеидах (Marjamaa et al., 2006b), показывая их возможную роль в полимеризации монолигнолов и биосинтезе лигнина.

Отмечают, что изменение различных условий окружающей среды, pH внутри клеточных компартментов, концентрации имеющихся монолигнолов, количества перекиси водорода и, несомненно, числа генов, кодирующих ПО, – все в совокупности влияют на состав лигнина и соотношения конечных связей в полимерах лигнина (Brunow et al., 1998; Sipilä et al., 2004; Méchin et al., 2007). Показано, что у растений *N. tabacum* при снижении экспрессии катионных ПО обнаруживалось понижение содержания лигнина (Blee et al., 2003), в то время как сверхэкспрессия анионных ПО не оказывала влияния на содержание лигнина в корнях, листьях и стеблях (Lagrimini et al., 1997). Снижение экспрессии генов анионных ПО в трансгенных линиях *Populus sieboldii* Miq. × *P. gradidentata* Michx. приводило к снижению содержания лигнина (Li et al., 2003). На растениях рода

Arabidopsis мутантные линии с генами, кодирующими дефективные ПО, показывали уменьшение содержания лигнина (Tsutsumi et al., 1998). Также было показано, что сверхэкспрессия гена, кодирующего ПО, приводила к эктопической лигнификации в трансгенных растениях *Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera (El Mansouri et al., 1999). Кроме количественных изменений лигнина, повышенная экспрессия ПО может вызывать изменения в структуре лигнина, такие как, например, увеличение количества сиригильных единиц (Li et al., 2003) или увеличение частоты встречаемости альдегидных кольцевых групп (Elfstrand et al., 2002). Таким образом, влияя на экспрессию пероксидазных генов, можно влиять на качество и количество лигнина.

Наряду с ПО, также и ПФО часто находятся в лигнифицирующихся тканях и окисляют большой спектр фенольных компонентов, включая монолигнолы (Koutaniemi et al., 2007).

Большое количество работ посвящено роли перекиси водорода в лигнификации. Однозначно, перекись водорода имеет одно из самых важных значений в лигнификации клеток ксилемы. Многочисленные примеры свидетельствуют об этом. Так, способность перекиси водорода быть контролирующим фактором в лигнификации хорошо показана на суспензии клеточной культуры *Zinnia elegans* Jacq. (Gabaldón et al., 2005). Подобно этому, при изъятии перекиси водорода из формирующейся культуры лигнина у *P. abies* образование лигнина замедлялось или прекращалось (Kärkönen et al., 2002). Сверхэкспрессия кодирующих ПО генов у растений *N. tabacum* увеличивала образование перекиси водорода, которое, в свою очередь, вызывало увеличение содержания лигнина (Kim et al., 2008). На гибридных линиях *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx. с увеличенными внеклеточными концентрациями перекиси водорода вследствие экспрессии СОД был более лигнифицирован (Srivastava et al., 2007).

Накопление перекиси водорода в клеточных стенках контролируется многими восстанавливающими агентами, в основном, аскорбатом, количество которого уменьшается до минимума в лигнифицирующихся клеточных стенках через активность аскорбатоксидазы (AcO, КФ 1.10.3.3) (Kärkönen, Fry, 2006; Ros-Barceló et al., 2006).

1.3.3. Антиоксидантная система растений и фенольный метаболизм

Все растения продуцируют большое количество вторичных метаболитов. Одна из наиболее важных групп – фенольные соединения, которые характеризуются, как минимум, одним кольцом с одной и более гидроксильными группами. Предшественником большинства из них является коричная кислота, которая образуется из фенилаланина при действии фенилаланин-аммиак-лиазы (ФАЛ, КФ 4.3.1.5), – связующего звена между шикиматным и фенилпропаноидным путями. Переключение на фенилпропаноидный путь является необходимым процессом. Показано, что при нормальных условиях роста 20 % углерода фиксируется растениями именно через этот путь (Dixon, Paiva, 1995).

Фенольные соединения растительного организма – высокореакционноспособные вещества. Окисление фенолов является частью нормального развития растения. Окислительные реакции необходимы во время процессов роста, развития и старения растений (Buchanan-Wollaston, Morris, 2000, Munné-Bosch, Alegre, 2004; Treutter, 2006). Усиление фенилпропаноидного метаболизма и количества фенольных соединений может иметь место при изменении условий окружающей среды и возникновении стрессовых для растений условий (Dixon, Paiva, 1995, Grace, Logan, 2000, Lavola et al., 2000; Sakihama, Yamasaki, 2002). Активность фенольных соединений регулируется количеством присутствующих в молекуле гидроксильных групп, их расположением, наличием или отсутствием двойных связей (Запрометов, 1993).

Фенолы способны легко окисляться ПО и ПФО с образованием высокореакционных промежуточных продуктов типа семихинонных радикалов и хинонов, которые могут спонтанно реагировать с белковыми компонентами, образуя комплексы темноокрашенных продуктов (Nicolas et al., 1993; Guyot et al., 1996; Walker, Ferrar, 1998). Известно, что в стрессовых условиях из клетки высвобождаются вещества фенольной природы, которые выполняют защитную функцию. Её считают одной из основных для фенольных соединений (Лукьянова и др., 1982; Андреева, 1991).

Эксперименты по обработке растений различными полифенолами приводили у разных растений к снижению степени их поражения инфекцией (Волынец, 2013); изменениям ростовой активности проростков *T. aestivum* и накоплению

низкомолекулярных АО в листьях (Загоскина и др., 2015). Кроме того, фенольные соединения положительно влияют на продуктивность высших растений (Zhao, Zou, 2002; Bartwal et al., 2013). Они участвуют в образовании сшивок клеточных стенок, чтобы обеспечить физико-химическую защиту и водонепроницаемость (Werker et al., 1979; Halloin, 1982; Egley et al., 1983; Marles et al., 2003; Pourcel et al., 2005).

Неэнзиматическое окисление флавоноидов может также привести к образованию хиноидных компонентов (Guyot et al., 1996; Mochizuki et al., 2002). Через цепочку реакций хиноны могут окислять другие полифенолы, формируя вторичные хиноны, ответственные за реакции потемнения (Cheynier et al., 1994). Наличие реакций потемнения – один из главных признаков потери качества.

Фенольные соединения, являясь АО, инактивируют свободные радикалы либо путем их прямого перехвата и, образуя при этом нерадикальные продукты, (вероятно, такие процессы происходят при образовании лигнина и полимеризации флавонов), либо путем связывания ионов металлов с переменной валентностью с последующим окислением органических соединений (Меньщикова, Зенков, 1993; Li, Xie, 2000). Фенольные АО эффективно связывают кислородные супероксидный и гидроксильный радикалы и ингибируют индуцируемое ими ПОЛ (Аверьянов, Лапикова, 1988; Меньщикова, Зенков, 1993).

Кроме того, некоторые фенольные соединения и сами могут продуцировать АФК. В нейтральной среде многие полифенольные соединения растительного происхождения, автоокисляясь, образуют супероксидные радикалы. Причем наиболее интенсивно этот процесс происходит при окислении триоксифенолов (Мерзляк, 1999). При участии ПО клеточных стенок они способны синтезировать перекись водорода (Pedreno et al., 1989; Takahama, 1989).

За счет работы МДГАР аскорбат-глутатионового цикла окислительный статус фенолов может быть регенерирован. Регенерированные (восстановленные) формы могут далее действовать как АО (Yamasaki, Grace, 1998; Sakihama et al., 2000). Окисленные же (феноксильные) формы в нормальных физиологических условиях не имеют вреда, так как они нестабильны и быстро превращаются в нерадикальные продукты, иногда они действуют как прооксиданты. Но, в целом, конечно, феноксильные радикалы токсичны для живых организмов из-за

способности инициировать свободнорадикальные реакции в мембранах и склонности сшиваться с различными молекулами (Sakihama et al., 2000).

1.3.4. Антиоксидантная система растений и углеводный метаболизм

Углеводы (сахара) и ферменты, участвующие в их метаболизации, тесно связаны с ОС и сигналингом АФК (Couée et al., 2006, Sulmon et al., 2006; Suzuki, Mittler, 2006; Takahashi, Murata, 2008).

Сахара имеют двойственные отношения с АФК в растениях: (1) участвуют в реакциях дыхательных процессов, по этому пути образуются многочисленные АФК; (2) участвуют в реакциях оксидативного ПФЦ, связанного с работой НАДФН-оксидаз, которые участвуют в утилизации АФК (Couée et al., 2006).

Поэтому защитные эффекты сахаров зависят от активности ферментов ПФЦ (Barra et al., 2003). С одной стороны, реакции ПФЦ снабжаются эндогенно доступными сахарами (Debnam et al., 2004; Couée et al., 2006), которые создают восстановительные способности для нейтрализации перекиси водорода и других АФК. С другой стороны, избыток сахаров, образующихся в фотосинтезирующих листьях, может результировать в избыточных количествах цитозольной перекиси водорода, особенно когда экспорт этих сахаров затруднен возможностями тканей и органов-акцепторов при стрессовых условиях (Van den Ende, Valluru, 2008).

Сахара, особенно длинноцепочечные водорастворимые олиго- и полисахариды, такие как фруктаны, могут быть кандидатами для улавливания АФК в тканях, реагирующих на широкий спектр изменения условий среды. Вакуолярные сахара, существующие вблизи тонопласта или взаимодействующие с мембраной, могут играть решающую роль в нейтрализации АФК и, таким образом, предотвращая ПОЛ перекисью водорода (Van den Ende, Valluru, 2008).

На модельных системах, способных генерировать гидроксильный радикал, показано, что сахара непосредственно могут перехватывать свободные радикалы (Аверьянов, Лапикова, 1988; Morelli et al., 2003). В растениях рода *Arabidopsis*, обработанных глюкозой или сахарозой, образовывалось меньше синглетного кислорода и перекиси водорода, что способствовало повышению их устойчивости к действию атразина – индуктора ОС (Ramel et al., 2009).

Так, сахара признаются как важные регуляторные молекулы с сигнальной и предположительно улавливающей АФК функцией в растениях (Rolland et al., 2006). Природа и местоположение сахаров и несакхарозных сигналов, таких как АФК и гормоны, важны для интегрирования регуляторного механизма, контролирующего различные функции в растительной клетке. Действие сахаров и АОС не только связаны, но, кроме того, сахара усиливают ответы ответственных за стресс генов. Кроме действия как сигналы, сахара или сахароподобные вещества, вероятно, в комбинации с фенольными компонентами, формируют вакуолярную окислительно-восстановительную систему, действующую в согласии с хорошо известными цитоплазматическими антиоксидантными механизмами (Price et al., 2004). Растворимые сахара могут стабилизировать структуру и активность ферментов АОС (Chaves et al., 2003). Могут активировать гены, отвечающие за активность ферментов (Contento et al., 2004).

Показано, что сахароза стимулирует накопление запасных веществ углеводной и фенольной природы, которые могут быть вовлечены в нейтрализацию цитозольных АФК, синтезируя фенольные радикалы, которые затем восстанавливаются аскорбатом.

Сахара в высоких концентрациях могут напрямую улавливать АФК, образуящиеся при наличии избытка перекиси водорода, синтезируя сахарозные радикалы. Вакуолярные фенольные вещества в гликозилированной форме могут помогать восстанавливать сахара из сахарозных радикалов (Bolouri-Moghaddam et al., 2010).

Предполагают, что сахароза имеет одну из самых лучших способностей к антиоксидантной защите *in vitro* (Smirnoff, Cumbes, 1989; Morelli et al., 2003; Nishizawa et al., 2008). Вероятно, схожие антиоксидантные реакции могут существовать и *in planta*. При низких концентрациях сахароза может действовать как субстрат для реакций или как сигнал, в то время как при высоких концентрациях она способна действовать напрямую как защитный компонент (Van den Ende, Valluru, 2008).

Для глюкозы также выявлены взаимосвязи с работой АОС и АФК. Глюкоза является главным углеродным прекурсором для синтеза каротиноидов (Pallett, Young, 1993), аскорбата (Foyer, 1993; Smirnoff et al., 2001) и аминокислот, включая

цистеин, глутамин и глицин, которые являются строительными блоками для глутатиона (Noctor, Foyer, 1998). Так, выявлена положительная корреляция между экзогенной глюкозой и накоплением каротиноидов – важных низкомолекулярных АО (Mortain-Bertrand et al., 2008). Кроме того, уменьшение уровня аскорбата в листьях может частично восстанавливаться при внесении глюкозы (Smirnoff, Pallanca, 1996).

Показано, что глюкоза опосредованно участвует в повышении активностей ферментов АОС, таких как СОД, КАТ, ПО (Hu et al., 2009; Huang et al., 2013). Известно о важной роли глюкозы в увеличении скоростей фотосинтеза при различных абиотических стрессах (Hu et al., 2009; Jiang et al., 2012).

Глюкоза может работать как регулятор экспрессии генов в растениях, также при ее воздействии увеличивается число ответственных за стрессовую реакцию генов (Graham et al., 1994; Koch, 1996; Rolland et al., 2002). Так, например, гены халконсинтазы (ХС, КС 2.3.1.74), которая обеспечивает синтез защитных антоцианов, и СОД, которая стоит на первом рубеже защиты организма, находятся среди тех, которые могут индуцироваться глюкозой (Feinbaum et al., 1991; Koch, 1996; Rossel et al., 2002). Кроме того, среди таких ферментов также упоминаются глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФД, КФ 1.1.1.49) (Hauschild, von Schaewen, 2003), глутатионтрансфераза (ГТ, КФ 2.5.1.18) (Price et al., 2004). Также глюкоза может воздействовать на сопряженные пути детоксификации, например, на работу УДФ-глюкозотрансферазы (УДФГТ, КФ 2.4.1), которая вовлечена в детоксификацию некоторых гербицидов, образование которых связано с деятельностью АФК (Hatzios, 2000).

Глюкоза была использована в клетках цианобактерий, чтобы увеличить клеточную восстановительную силу через поддержание высоких концентраций НАДФН (Alfonso et al., 2000; Li, Sherman, 2000; Ryu et al., 2004). При низком уровне глюкозы отмечено снижение темпов образования АФК в митохондриях и сокращение сроков жизни листа (Barros et al., 2004). Кроме того, глюкоза повышает клеточную защиту против перекиси водорода (Averillbates, Przybytkowski, 1994).

Один из наиболее важных ферментов, поддерживающих взаимодействие сахаров и АФК, это гексокиназа (ГК, КФ 2.7.1.1). Фермент регулирует уровни глюкозо-6-фосфата и АФК, стимулируя защитные антиоксидантные механизмы и

синтез фенольных компонентов. Особенно активно эти процессы протекают в цитозоле и митохондриях. Активная работа фермента ускоряет темпы гликозилирования фенольных веществ. Кроме того, фермент способен действовать как глюкозный сенсор, контролирующий деление и расширение клеток, взаимодействуя с гормонами (Fotopoulos et al., 2003; Essmann et al., 2008). Увеличение экспрессии Г6ФД коррелирует с устойчивостью к ОС (Salvemini et al., 1999; Woda et al., 2000; Debnam et al., 2004).

Необходимо отметить, что органы и ткани с высокой концентрацией сахаров проявляют синергизм во взаимодействиях сахаров и фенольных компонентов, который является частью взаимосвязанной окислительно-восстановительной системы, улавливающей АФК и защищающей от стресса. Кроме того, связанные с деятельностью инвертаз (Инв, КФ 3.2.1.26) сигнальные функции моносахаров являются очень важными в течение ответных реакций растений (Fotopoulos et al., 2003; Essmann et al., 2008).

Инв, приводящие к расщеплению сахарозы до глюкозы и фруктозы, могут влиять на рост и развитие растений или напрямую (например, влияя на ДАО) или действуя как регуляторный белок), или косвенно – путем сахарозного сигналинга, через повышение соотношения гексозы/сахароза. Глюкозу и фруктозу считают потенциальными нейтрализаторами АФК (Couée et al., 2006; Keunen et al., 2013).

У трансгенных по гену дрожжевой инвертазы растений *S. tuberosum*, характеризующихся высоким содержанием сахаров в листьях, отмечено повышение устойчивости к холодовому и ОС (индуктор – метилвиологен) (Синькевич и др., 2009; 2010). Такой эффект был обусловлен низкомолекулярной составляющей АОС – сахарами, содержание которых в клетках растений было значительно выше содержания аскорбата (Синькевич и др., 2010).

В растениях связь между образованием АФК и фотосинтетическим метаболизмом очень важна (Rossel et al., 2002). Активная фотосинтетическая деятельность в листьях может индуцировать аккумуляцию растворимых сахаров и АФК. И процессы старения листа связаны с временными высокими уровнями растворимых сахаров, сопровождающих высокие темпы окислительных реакций. Также многочисленные защитные эффекты растворимых сахаров против ОС связаны с непрямыми сигнальными эффектами, запускающими образование

улавливающих АФК веществ (Couée et al., 2006; Ramel et al., 2009). Было предположено, что растворимые сахара, особенно, когда они находятся в высоких концентрациях, могут и сами улавливать АФК (Van den Ende, Valluru, 2008).

Таким образом, несмотря на имеющиеся обширные и многогранные литературные данные, которые посвящены строению, функциям компонентов АОС и АФК в растительном организме, а также многочисленные работы, в которых приведены результаты исследований, наблюдаемых *in vivo* и проведенных *in vitro*, в которых ферменты АОС имеют сигнальные, защитные и другие роли, до настоящего времени вопрос участия ферментов АОС в процессах ксилогенеза у древесных растений остается открытым. Нет информации о том, существуют ли особенности функционирования ферментов АОС у древесных растений с признаками структурных аномалий.

Однако, в литературе отмечается, что путь расщепления сахарозы в организме сосудистых растений имеет решающую роль при прогнозировании преимущественного пути ксилогенеза, который будет определять состав клеточных стенок: будут ли в них преобладать компоненты углеводной или фенольной природы. Кроме того, такие ферменты, как СОД, КАТ, ПО, ПФО, а также непосредственно перекись водорода и супероксидный радикал принимают участие в формировании лигнина (Gaspar et al., 1985; Savidge, 1996; Li et al., 2003; Gabaldón et al., 2005; Koutaniemi et al., 2007; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009; Gill et al., 2010 и др.). Возможные пути отражены на рисунке 6.

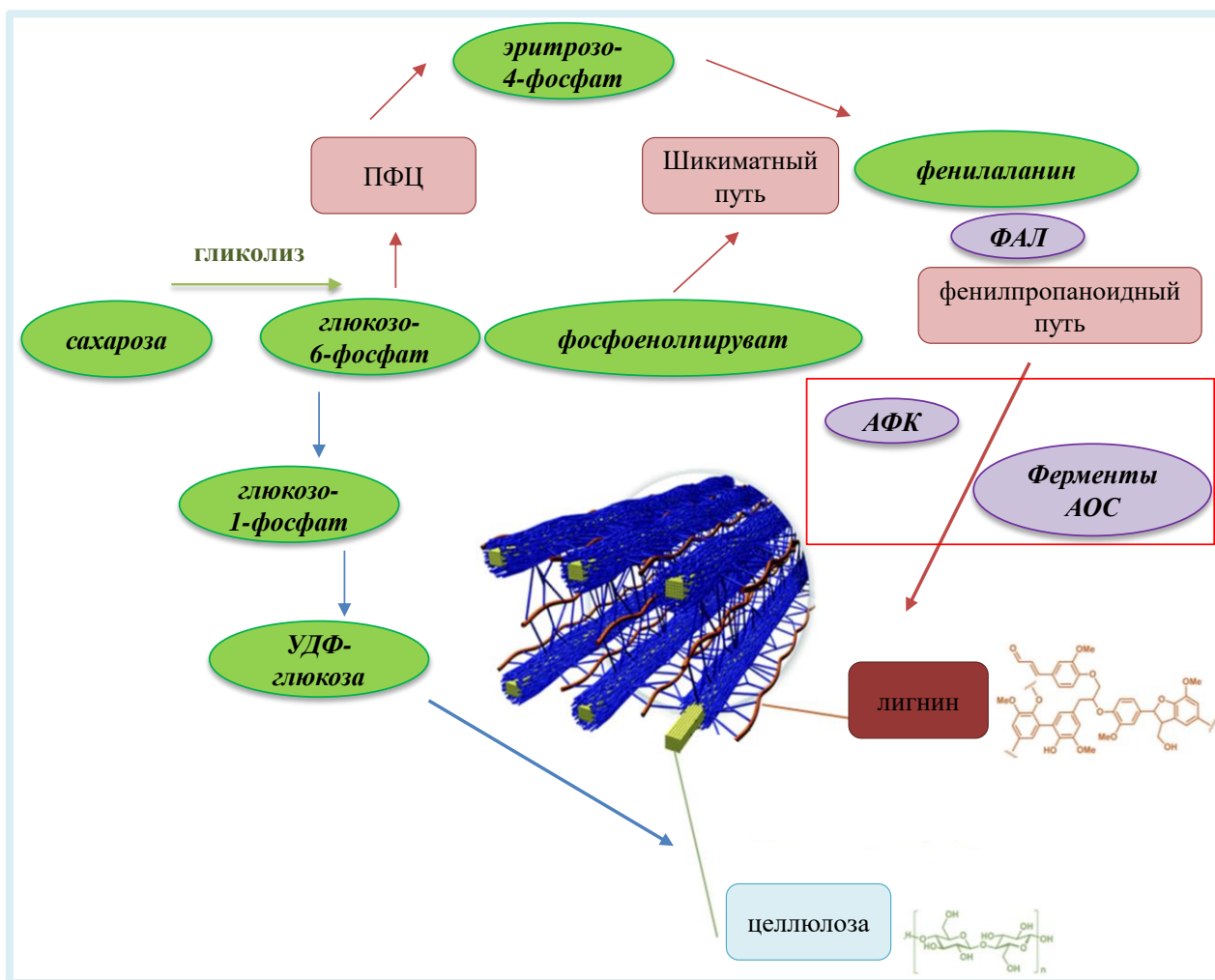


Рис. 6. Пути альтернативных биохимических превращений сахарозы, приводящих к образованию разных по составу клеточных стенок с преобладанием целлюлозы или лигнина (по Savidge, 1996 с изменениями).

1.4. Поиск маркеров процессов ксилогенеза

Ксилогенез, или процесс формирования древесины, – это фиксация углерода в составе структурных полимеров углеводной и фенольной природы в клеточных стенках древеснеющих тканей растений. Изучение процессов ксилогенеза актуально как для фундаментальной науки, так и для практического использования древесного материала (Никишов, 1985; Barnett, Jeronimidis, 2003).

Ксилогенез у растений рассматривается в рамках парадигмы ПКС. Сосуды ксилемы представлены трахеальными элементами – вытянутыми мертвыми клетками с лигнифицированными вторичными клеточными стенками. Они образуются путем дифференциации клеток камбия и проходят все стадии до ПКС.

Одним из модельных объектов является цинния (*Z. elegans*) (Iakimova, Woltering, 2017). В литературе имеются данные о регуляции ксилогенеза, связанной с ОС. Развитие трахеальных элементов у *Z. elegans* происходит при наличии окислительного статуса (Barceló, 1998, 1999; 2005; Ros et al., 2006; Novo-Uzal et al., 2013). Показано вовлечение АФК и особенно перекиси водорода в процессы ПКС (Levine et al., 1994). При дифференциации ксилемы перекись водорода необходима для лигнификации (Novo-Uzal et al., 2013). Она вовлечена в индуцируемое ПО окисление коричных спиртов до лигнина и уплотнение клеточной стенки за счет взаимодействия с её белками (Olson, Varner, 1993; Levine et al., 1994; Ogawa et al., 1997; Barceló, 1998; Liu et al., 1999). Наблюдения показали, что в клеточной культуре и в стеблях *Z. elegans* живые недифференцированные клетки образовывали АФК до и в начале процессов лигнификации вторичных клеточных стенок. Такой ранний синтез перекиси водорода живыми клетками необходим для ее дальнейшего использования вплоть до этапа ПКС. Перекись водорода будет затем поступать из живых клеток в дифференцирующиеся трахеальные элементы через внутриклеточное пространство (Olson, Varner, 1993; Ferrer, Barceló, 1999; Barceló, 1998, 2005; Weir et al., 2005; Ros et al., 2006). Предполагается, что перекись водорода генерировалась у *Z. elegans* за счет работы локализованной на мембране НАДФН-оксидазы и/или ПО (Barceló, 1998, 1999, 2005; Novo-Uzal et al., 2013). Эксперименты доказали, что не только в культуре клеток, но и при лигнификации *in planta* ПО и НАДФН-оксидазы играют решающую роль. В многочисленных исследованиях показано, что внесение ингибиторов данных ферментов приводит к угнетению лигнификации (Fukuda, Komamine, 1982; Sato et al., 1993, 1995; Barceló, 1999; Demura et al., 2002; Karlsson et al., 2005; Ros et al., 2006). Также было показано участие фенолоксидаз в формировании мономерных радикалов лигнина (Ranocha et al., 1999; Voerjan et al., 2003; Barros et al., 2015). В экспериментах Henmi et al. (2005) в ксилогенных клеточных культурах *Z. elegans* были обнаружены повышенные эндогенные уровни окисленного глутатиона (GSSG). Авторы сообщают, что экзогенное внесение восстановленного глутатиона (GSH) на ранних стадиях развития подавляло дифференцировку трахеальных производных. Вероятно, баланс GSH/GSSG вовлечен в регуляцию развития трахеальных производных (Henmi et al., 2005).

Все эти исследования говорят о существовании определенных маркеров ксилогенеза, то есть различных цитологических, биохимических и молекулярно-генетических показателей, которые могли бы идентифицировать переходы между различными стадиями ксилогенеза (Fukuda, 1996). Необходимо осуществлять поиск путей управления процессами, лежащими в основе ксилогенеза, с целью повышения продуктивности растений. Кроме того, встает важный вопрос: как на ранних этапах обнаружить особенности переходов различных стадий ксилогенеза и какие маркеры наиболее четко могут идентифицировать данные переходы.

2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Растительный материал

Объектами исследования были: (1) две формы березы повислой: *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* разного возраста; (2) взрослые растения *P. sylvestris* с прямослойной и косослойной древесиной ствола.

2.1.1. *B. pendula*

46-летние деревья *B. pendula* var. *pendula* с характерной для вида прямослойной древесиной и *B. pendula* var. *carelica* с узорчатой древесиной ствола произрастали на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН, в 2 км от г. Петрозаводска, Республика Карелия. Почвенные и климатические условия у исследуемых деревьев не отличались. Исследование проводили в течение 2016 года, растительный материал отбирали в утреннее время (9-11 часов утра) в дни без осадков. Даты отбора были приурочены к протеканию различных фаз (период покоя, выход из состояния покоя, сокодвижение, рост листовой пластинки, камбиальный рост, отток метаболитов в ствол, подготовка к покою).

25-летние растения *B. pendula* var. *carelica* произрастали на лесосеменной плантации в Медвежьегорском районе Республики Карелия и были выращены из семян от контролируемого опыления плюсовых деревьев. Исследуемые растения отличались по степени узорчатости древесины ствола, которую характеризовали баллом от 0 (безузорчатые растения) до 3 (наиболее узорчатые растения), согласно способу диагностики узорчатой текстуры древесины, предложенного В. И. Ермаковым (1986). На стволе вырезали окошки 10x6 см и подсчитывали количество желобковидных углублений на 1 см² обнаженной поверхности древесины. Так, растениям, не имеющим углублений, присваивали 0 баллов; имеющим 1-3 углубления на 1 см² (редкий рисунок) – 1 балл; 4-6 углублений на 1 см² (плотный рисунок) – 2 балла; 7 и более углублений на 1 см² (очень плотный рисунок) – 3 балла (Ермаков, 1986). Растительные ткани отбирали во время камбиального роста в периоды: (1) активного формирования ранней тонкостенной древесины (конец июня 2017 года) и (2) активизации утолщения клеточной стенки (начало июля 2016 года).

12-летние растения *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости древесины ствола отбирали на Агробиологической станции Карельского научного центра РАН. Растения были выращены из семян, полученных от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена *B. pendula* var. *carelica* получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Отбор образцов проводили в период активной камбиальной деятельности (начало июля 2018 года). Среди растений *B. pendula* var. *carelica* выделяли: (1) безузорчатые растения, (2) безузорчатые и (3) узорчатые участки ствола узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*.

Сеянцы *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* исследовали в возрасте 1.5 месяцев, 2.5 месяцев, 3-4 месяцев, 10 месяцев. Семена для выращивания исследуемых растений были получены от контролируемого опыления (Forelia OY, Финляндия). Семена *B. pendula* var. *carelica* получены от родительских деревьев с ярко выраженными признаками узорчатости древесины. Сеянцы выращивали на светоустановке при следующих условиях: температура воздуха – 21-22 °С, освещенность – 8 клк, светопериод – 16 часов. Питательный грунт имел следующий состав основных элементов: N – 0.5 %, С – 21 %, P подвижный – 0.03 %, К подвижный – 0.09 %.

2.1.2. *P. sylvestris*

Деревья *P. sylvestris* (возраст 150-300 лет) с прямослойной древесиной и с проявившимся косослоем, выраженным в разной степени (5-20 градусов наклона). Образцы были отобраны в июле 2018 года в период активного камбиального роста. Наличие косослоя определяли по отклонению волокон от линии, параллельной продольной оси. Для этого вырезали окошки 10x6 см на расстоянии 1 м друг от друга по вертикальной линии и измеряли угол наклона.

Деревья *P. sylvestris* произрастали в разновозрастных древостоях (табл. 1) в пределах среднетаёжной подзоны на территории Республики Карелия в разных типах лесорастительных условий. Древостои имели 2-3 поколения сосны, в прошлом неоднократно подвергались внешним воздействиям; в настоящее время характеризуются низкой полнотой (около 0.5) и общей сомкнутостью крон не менее 0.6.

Таблица 1. Таксационная характеристика сосновых древостоев.

Состав, возраст древостоя	D ср, см	H ср, м	Запас, м ³ /га	Класс * бонитета	Тип лесорастительных условий
5C ₂₀₀ 3C ₁₀₀ 2C ₃₀₀	32	22	150	III.5	брусничный
4C ₁₇₀ 1C ₂₁₀ 3E ₁₅₀ 2Б ₇₀	40	23	150	III	черничный
4C ₁₅₀ 3C ₂₅₀ 3C ₃₀₀	36	21	160	IV	черничный влажный

* - по младшему поколению

Сосняк брусничный произрастал на озовой гряде, подвергался выборочным рубкам в 1800, 1870 и 1930 г.г. и в 1939 г. был пройден пожаром. Травяно-кустарничковый ярус представлен исключительно кустарничками – *Vaccinium vitis-idaea* L. (35 %), *Vaccinium myrtillus* L. (15%) и *Empetrum hermaphroditum* Hagerup (10%). В мохово-лишайниковом ярусе произрастали *Pleurozium schreberi* (Bird.) Mitt. (70 %), *Cladonia arbuscula* (Wallr.) Flot. (20 %), а также *Cetraria islandica* (L.) Ach. (5 %) и *Dicranum cf. scoparium* Hedw. (5 %).

Сосняк черничный был расположен в прибрежной зоне Онежского озера на абрадированной супесчаной морене, частично перекрытой эоловыми песками. Пройден интенсивными выборочными рубками в 1875 и 1955 г.г. В результате последней сформировался смешанный древостой с участием ели и березы. В живом напочвенном покрове доминировали кустарнички – *Vaccinium myrtillus* (40 %) и *Vaccinium vitis-idaea* (20 %), а также произрастали *Maianthemum bifolium* (L.) F. W. Schmidt (10 %), *Oxalis acetosella* L. (10 %), *Solidago virgaurea* L., *Melampyrum pratense* L., *Orthilia secunda* (L.) House, *Luzula pilosa* (L.) Willd., *Trientalis europaea* L., *Lycopodium annotinum* L. и *Dactylorhiza maculata* (L.) Soo, в понижениях – *Eriophorum vaginatum* L. и *Polytrichum cf. junipeinum* Hedw.

Сосняк черничный произрастал у подножия невысокой озовой гряды в условиях периодического застойного увлажнения. В прошлом подвергался рубкам в 1770 и 1870 г.г. В сообществе на прилегающем суходоле имелись следы пожара 1895 г., который безусловно затронул и исследуемый участок. В 1965 г. на территории проводилась лесоосушительная мелиорация. В травяно-

кустарничковом ярусе преобладала *Vaccinium myrtillus* (80 %). Также присутствовали *Vaccinium uliginosum* L. (10 %), *Vaccinium vitis-idaea* (10 %), *Eriophorum vaginatum* (10 %), а также *Rubus chamaemorus* L. (5 %) и *Ledum palustre* L. (5 %). Моховой ярус представлен *Sphagnum* cf. *girgensohnii* Russow (20 %).

Во всех трех древостоях на кернях обнаруживалась дифференциация на ядровую и заболонную древесину; ширина последней составляла, в среднем, 3-5 см (от 7 до 38 %). В сосняке черничном наличие ядровой древесины обнаружено не у всех деревьев, а в остальных двух древостоях выражено ярко.

2.2. Отбор растительного материала

У 1.5 и 3-4-месячных сеянцев на анализ отбирали стебли и листья размером 2-5 см. Определяли активность *АпИнв*, *СОД*, *КАТ*, *ПО* и *ПФО* и морфологические показатели (высоту, массу стебля и листьев). Было отобрано по 10-15 индивидуальных растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*.

У 2.5-месячных сеянцев на анализ отбирали листья размером 2-5 см. Определяли активность *ПО* и *ПФО* в диапазоне рН. Было отобрано по 5 индивидуальных растений.

У 10-месячных сеянцев на анализ отбирали листья, которые находились во внепочечном периоде развития. По форме исследуемые листья соответствовали форме листа взрослого растения, однако обладали разными размерами, поэтому листья сеянцев были разделены на стадии развития по длине: 1-2 см – I стадия развития, 3-4 см, 5-6 см, 7-8 см – II, III и IV соответственно. Определяли активность *КАТ* и *ПО*. Для определения активности фермента на каждой стадии развития листа проводили по 5-8 независимых опытов. Эти же растения служили объектами для модификации условий определения активности *КАТ*.

У взрослых деревьев на анализ отбирали ткани ствола (флоэмы и ксилемы) – у березы и сосны, листья с укороченных побегов (брахибластов) – у березы.

Образцы тканей ствола были отобраны на высоте ~ 1.3 м от земли. У растений *B. pendula* var. *carelica* выбирали участки с наибольшей степенью проявления структурных аномалий. На стволе вырезали окошки 4х6 см и отделяли кору от древесины. С обнаженной поверхности древесины лезвием соскабливали слои ксилемы, куда входили материнские клетки ксилемы и наружные слои

прироста текущего года. С внутренней поверхности коры препарировали комплексы тканей, включающие: (1) камбиальную зону, (2) проводящую флоэму. Отбор тканей ствола контролировали под световым микроскопом. Материал замораживали в жидком азоте и хранили при температуре -80 °С.

У 46-летних растений *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* в тканях ствола определяли активность АпИнв, КАТ и ПО. Отбирали по 5 растений *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica*.

У 25-летних растений *V. pendula* var. *carelica* в тканях ствола определяли активность СОД, КАТ, ПО и ПФО, содержание лигнина, целлюлозы, фенольных соединений, в листьях – активность СОД, КАТ, ПО и ПФО. Всего было отобрано 25 безузорчатых растений *V. pendula* var. *carelica* и 45 растений *V. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости. Эти же растения служили объектами для модификации условий определения активности СОД и ПФО.

У 12-летних растений *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* в тканях ствола определяли активность СОД, КАТ, ПО и ПФО. Отбирали по 4 растения каждой группы (растения *V. pendula* var. *pendula*, безузорчатые и узорчатые участки ствола узорчатых растений *V. pendula* var. *carelica*).

У деревьев *P. sylvestris* в тканях ствола определяли активность СС, АпИнв, СОД, КАТ, ПО и ПФО, содержание лигнина и фенольных соединений. Всего было отобрано по 30 деревьев *P. sylvestris* с прямослойной и 35 с косослойной древесиной.

Со ствола деревьев *P. sylvestris* на высоте ~ 1.3 м от земли были взяты керны (возрастной бурав Haglof, Швеция) для определения среднего значения радиального прироста за десятилетний период за счет измерения ширины годичных колец.

2.3. Биохимические исследования

2.3.1. Определение активности ферментов

Растительные ткани растирали с жидким азотом и гомогенизировали в буфере при 4 °С, который имел следующий состав: 50 мМ Hepes (pH 7.5), 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 3 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ PMSF. После 20-минутной экстракции гомогенат центрифугировали при 10000 g в течение 20 минут

(центрифуга MPW-351R, Польша). Осадок трехкратно промывали буфером. В осадке определяли активность АПИInv, в супернатанте – активности СОД, КАТ, ПО и ПФО. Активность указанных ферментов определяли спектрофотометрически (Спектрофотометр СФ-2000, ОКБ «Спектр», Россия). Содержание белка определяли по методу Бредфорда.

2.3.1.1. Определение активности апопластной инвертазы

Инкубационная среда для определения активности АПИInv содержала 100 мМ ацетатный буфер (рН 4.7), 25 мМ сахарозу (Галибина и др., 2016б). Количество образовавшейся в процессе инкубации глюкозы определяли глюкозооксидазным методом. Активность АПИInv выражали в мкмоль распавшейся сахарозы на г сырой ткани за 30 минут (мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани).

2.3.1.2. Определение активности сахарозосинтазы

Инкубационная среда для определения активности СС содержала 73 мМ трис-НСl (рН 7.5), 2.5 мМ УДФ-глюкозу, 20 мМ фруктозу, 5 мМ MgCl₂, 3 мМ DTT. Количество образовавшейся сахарозы определяли по резорциновому методу Роэ. Активность СС выражали в мкмоль образовавшейся сахарозы на мг белка за 30 минут (мкмоль сахарозы/мг белка) (Галибина и др., 2016а).

2.3.1.3. Определение активности пероксидазы

Для определения активности ПО в качестве донора водорода использовали гваякол, в качестве субстрата – перекись водорода. Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 5), 2.6 мМ перекись водорода и 21.5 мМ гваякол. Время наблюдения за реакцией – 30 минут. Активность определяли по образованию продукта реакции – тетрагваякола (ТГ) за счет увеличения оптической плотности при 470 нм. Количество ТГ рассчитывали с учетом коэффициента экстинкции ($\epsilon_{(\lambda = 470\text{нм})} = 0.0266 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$). Активность ПО выражали в мкмоль образовавшегося ТГ на мг белка за 30 минут (мкмоль ТГ/мг белка) (Галибина и др., 2013; Никерова, Галибина, 2017; Никерова и др., 2018).

2.3.1.4. Модификация способа определения активности супероксиддисмутазы

При проведении исследования по определению активности ферментов возникла задача подбора условий для проведения биохимических реакций *in vitro* для выбранных объектов исследования. Подбор биохимических условий для проведения реакций при исследовании древесных растений составляет особую сложность. Информация в известной литературе недостаточна.

Модификации подверглись условия для определения активности СОД, КАТ и ПФО в соответствии с выявленными особенностями ферментативного препарата исследуемых образцов.

В 1971 году авторами Beauchamp и Fridovich было предложено определять активность СОД по ингибированию фотовосстановления нитросинего тетразолия (НСТ). Позднее, в 1987 году, авторами Beyer и Fridovich было предложено спектрофотометрическое приложение данного метода, которое широко применяется до настоящего времени.

Суть биохимической реакции следующая: на свету рибофлавин образует супероксидные радикалы, они окисляют НСТ при наличии метионина до формазана, последний имеет синюю окраску. СОД, которая присутствует в ферментативном препарате, катализирует образование продукта реакции – перекиси водорода, при этом рибофлавин является источником супероксидного радикала, а метионин – донором водорода.

Степень развития синей окраски, соответствующая степени окисления НСТ, отличается в разных образцах, что свидетельствует о различной активности СОД, которая обратно пропорциональна степени развития окраски. За единицу активности СОД принимают количество фермента, приводящее к 50 % ингибирования фотовосстановления НСТ (Vatankhah et al., 2010; El-Mashad, Mohamed, 2012; Rodrigues et al., 2017).

Проведенная методическая работа показала, что в ферментативных препаратах древесных образцов могут присутствовать вещества, подобные метионину и рибофлавину. Поэтому при исследовании супероксиддисмутазной реакции *in vitro* были проведены дополнительные серии измерений оптической плотности опытных образцов, при которых в инкубационную среду поочередно не добавляли метионин и рибофлавин.

Было отмечено, что у разных опытных образцов при проведении дополнительных серий измерений окраска развивалась в разной степени, что подтверждало присутствие в ферментативных препаратах веществ, подобных метионину и рибофлавины. А, как известно, система рибофлавин-метионин является источником активных форм кислорода (Tzeng et al., 1996) (рис. 7).

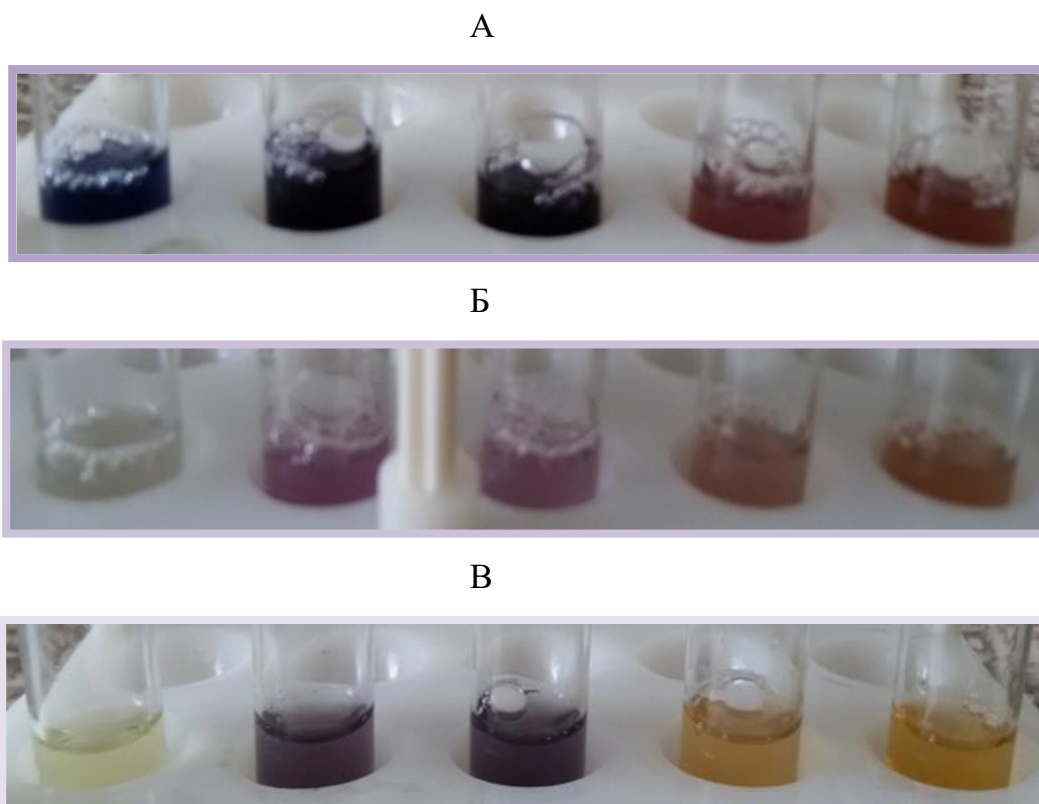


Рис. 7. Измерение активности СОД в образцах ксилемы и флоэмы. А – инкубационная среда содержит НСТ, метионин и рибофлавин, Б – инкубационная среда без рибофлавина, В – инкубационная среда без метионина. Слева направо: 1 – контрольная проба, 2 и 3 – инкубационная среда с добавлением супернатантов из тканей ксилемы *B. pendula* var. *carelica*, 4 и 5 – инкубационная среда с добавлением супернатантов из тканей флоэмы *B. pendula* var. *carelica*.

Показатель степени ингибирования образования окраски (I), который соответствует условной активности СОД, определяли по формуле:

$$I = 1 - \frac{(D2 - D4 - D6)}{(D1 - D3 - D5)}$$

где D – оптическая плотность при длине волны 560 нм для:

D_1 и D_2 – контрольного и опытного вариантов с метионином и рибофлавином в среде инкубации;

D_3 и D_4 – контрольного и опытного вариантов без метионина в среде инкубации;

D_5 и D_6 – контрольного и опытного вариантов без рибофлавина в среде инкубации.

Для нахождения активности СОД (A) использовали формулу:

$$A = \frac{I * k * V}{10 * m}$$

где I – показатель степени ингибирования окраски;

k – коэффициент, показывающий разведение супернатанта;

V – объем супернатанта, мл,

10 – длина оптического пути, мм;

m – масса белка в навеске, взятой для анализа, мг.

Таким образом, об активности СОД судили по ингибированию фотовосстановления НСТ. Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8), 172 мкМ НСТ, 210 мкМ метионин, 24 мкМ рибофлавин, 0.1 % тритон X-100. Активность определяли по уменьшению оптической плотности при 560 нм после 30 минут инкубации под светом флуоресцентных ламп. Активность СОД выражали в усл. ед. на мг белка за 30 минут (усл. ед./мг белка) (Никерова и др., 2018, 2019б).

2.3.1.5. Модификация способа определения активности каталазы

При подборе условий для определения активности КАТ необходимо учитывать ее чрезвычайную активность (Чеснокова и др., 2006; Mhamdi et al., 2010). Даже при незначительном изменении времени реакции на доли секунд активность фермента может значительно возрасти, поэтому при исследовании реакции *in vitro* очень важно установить время измерения реакции на стабильный период.

Об активности КАТ судят по уменьшению оптической плотности в области поглощения перекиси водорода ($\lambda = 240$ нм). Для этого перед каждым измерением необходимо построение графика в диапазоне изучаемых концентраций перекиси водорода, который показывает зависимость оптической плотности от концентрации субстрата (рис. 8).

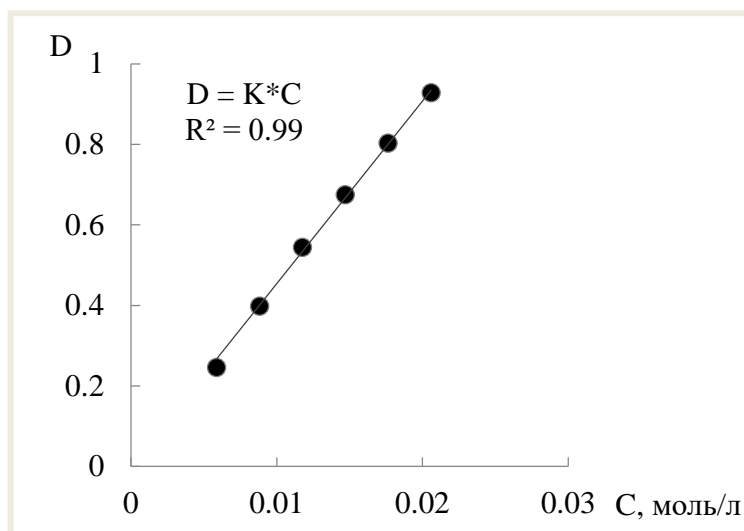


Рис. 8. График, отражающий зависимость оптической плотности (D) от концентрации перекиси водорода (C), где K – коэффициент линейной зависимости, R^2 – значение коэффициента аппроксимации.

На рисунке 9 приведена зависимость активности КАТ от времени реакции.

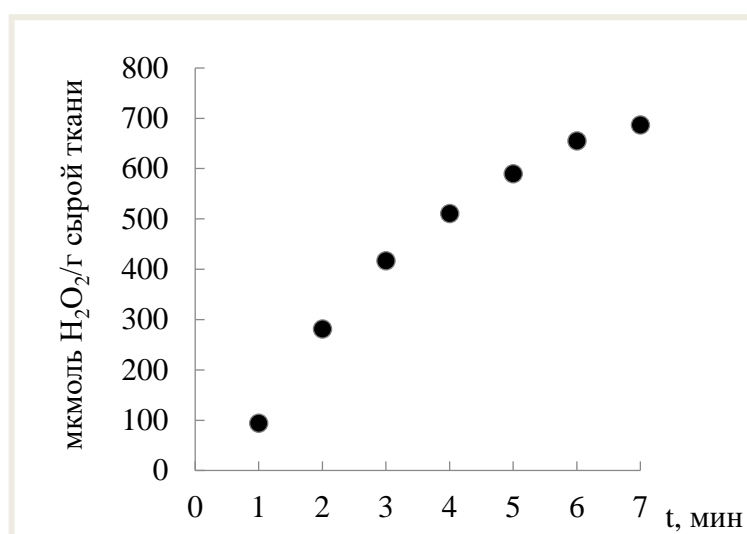


Рис. 9. График, отражающий зависимость активности КАТ от времени наблюдения за реакцией.

Линейная зависимость активности КАТ от времени реакции наблюдалась в диапазоне 3-6 мин, для регистрации реакции каталазного окисления в исследуемых образцах было выбрано время – 4 мин.

Для изучаемых объектов была адаптирована следующая схема определения активности КАТ. В качестве контрольного варианта использовали фосфатный буфер; в качестве опытного варианта использовали смесь фосфатного буфера с добавлением перекиси водорода. Измеряли оптические плотности контрольного и опытного образцов (D1 и D2, соответственно, в формуле для расчета активности КАТ) при 240 нм относительно холостой кюветы, содержащей фосфатный буфер. Затем добавляли в контрольный и опытный образцы супернатант (объем зависел от активности фермента) и вновь измеряли значения оптических плотностей (D3 и D4, соответственно, в формуле для расчета активности КАТ).

Для нахождения активности КАТ (А) использовали формулу:

$$A = \frac{X * ((D2 - D1) - (D4 - D3)) * 1000 * V}{(K * m)}$$

где D – оптическая плотность при длине волны 240 нм;

V – объем супернатанта, мл;

K – коэффициент линейной зависимости оптической плотности от концентрации перекиси водорода (рис. 8);

m – масса белка в навеске, взятой для анализа, мг;

X – коэффициент, показывающий разведение супернатанта.

Таким образом, об активности КАТ судили по ферментативному разложению перекиси водорода. Состав инкубационной среды: 50 мМ К, Na-фосфатный буфер (рН 7.8) и 14.7 мМ перекись водорода. Инкубировали в течение 4 минут. Активность определяли по уменьшению оптической плотности при 240 нм, содержание перекиси водорода рассчитывали по предварительно построенному градуировочному графику (Никерова и др., 2016). Активность КАТ выражали в мкмоль восстановленной перекиси водорода на мг белка за 4 минуты (мкмоль H₂O₂/мг белка).

2.3.1.6. Модификация способа определения активности полифенолоксидазы

Активность ПФО часто выражают в условных единицах, как количество фермента, вызывающее увеличение оптической плотности на 0.1, 0.01 или 0.001 единицу абсорбции за 1 минуту. Субстратом реакции часто выбирают пирокатехин (Raymond et al., 1993; Ziyar, Pekyardimci, 2004; Ortega-García, Peragón, 2009; Pandey, 2013).

В настоящем исследовании за единицу активности ПФО принимали увеличение оптической плотности на 0.001 единицу абсорбции за 1 минуту, что согласуется с работами многих исследователей (Muchuweti et al., 2006; Ünal, Şener, 2006; Gawlik-Dziki et al., 2007; Zhu, Zhan, 2010; Alici, Arabaci, 2016).

Было обнаружено, что ферментативные препараты могут существенно отличаться друг от друга по значению оптической плотности, кроме того, добавление самого субстрата реакции (пирокатехина) приводило к повышению оптической плотности. Поэтому при определении количественной активности ПФО эти особенности нужно учитывать для получения корректной разницы между различными ферментативными препаратами (рис. 10).

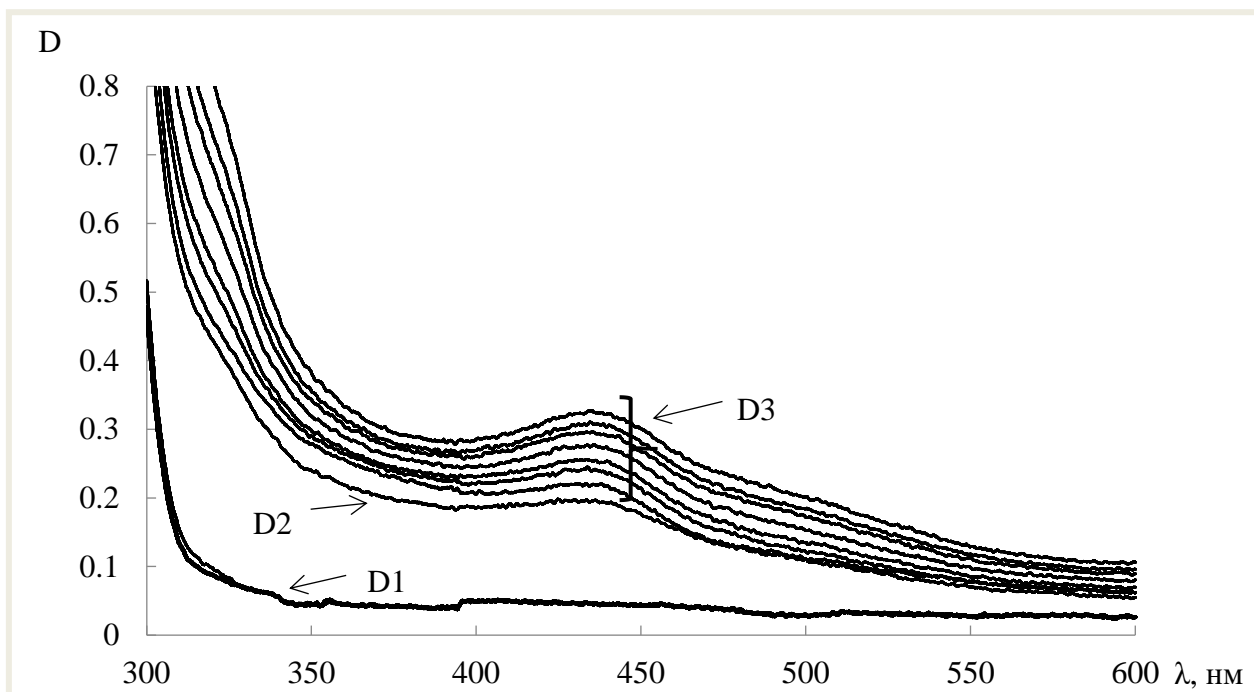


Рис. 10. Изменение электронных спектров инкубационной смеси, содержащей: D1 – фосфатный буфер и пирокатехин (оптическая плотность практически не изменяется за время наблюдения за реакцией); D2 – фосфатный буфер и

супернатант; D3 – фосфатный буфер, супернатант и пирокатехин (оптическая плотность увеличивается при наблюдении за реакцией, что связано с окислением пирокатехина).

Для изучаемых объектов была адаптирована следующая схема определения активности ПФО. В качестве холостой пробы использовали фосфатный буфер. Затем определяли оптическую плотность фосфатного буфера с добавлением пирокатехина (D1 в формуле для расчета); следующий вариант содержал фосфатный буфер и супернатант (D2 в формуле для расчета). После к фосфатному буферу и супернатанту добавляли пирокатехин для запуска реакции и наблюдали за реакцией в течение 20 минут, измеряя оптическую плотность (D3 в формуле для расчета) через определенные промежутки времени против холостой кюветы.

Для нахождения активности ПФО для каждого из образцов строили отдельный график зависимости изменения оптической плотности образца (D) от времени (рис. 11), где $D = D3 - D2 - D1$.

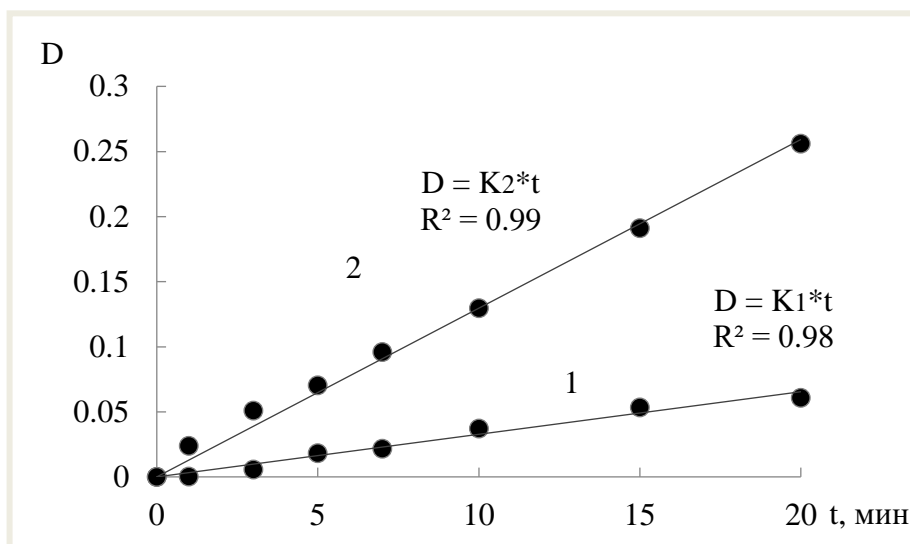


Рис. 11. График, отражающий зависимость оптической плотности (D) от времени наблюдения за реакцией (t), где K – коэффициент линейной зависимости, R^2 – значение коэффициента аппроксимации (1 – в образцах ксилемы безузорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*; 2 – в образцах ксилемы узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*).

Для нахождения активности ПФО (А) использовали формулу:

$$A = \frac{K * t}{(0.001 * m)}$$

где К – коэффициент линейной зависимости оптической плотности от времени; (рис. 11)

t – время, мин.,

m – масса белка в навеске, содержащейся в объеме супернатанта, мг.

Таким образом, для определения активности ПФО в качестве субстрата использовали пирокатехин. Состав инкубационной среды: 50 mM К, Na-фосфатный буфер (pH 7.8), 16.4 mM пирокатехин. Для определения активности ПФО в образцах листового аппарата у 25-летних растений *B. pendula* использовали 164 mM пирокатехин, в образцах тканей ствола у *P. sylvestris* – 246 mM пирокатехин. Время наблюдения за реакцией – 20 минут. Активность определяли по увеличению оптической плотности при длине волны 420 нм, где поглощают продукты окисления пирокатехина. Активность ПФО выражали в усл. ед. на мг белка за 1 минуту (усл. ед./мг белка) у *B. pendula* (Никерова и др., 2018, 2019б). У *P. sylvestris* активность ПФО выражали в усл. ед.*1000 на мг белка за 1 минуту (усл. ед.*1000/мг белка).

2.3.1.7. Определение оптимумов pH для пероксидазы и полифенолоксидазы

В ходе исследования были установлены оптимумы pH для определения активности ПО и ПФО. Для этого определяли активность ферментов в листовом аппарате 2.5-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* в диапазоне pH 50 mM К, Na-фосфатный буферов.

Так, при определении активности ПО самая высокая обнаружена при pH 5 (рис. 12), а при определении активности ПФО – при pH 7.8 (рис. 13).

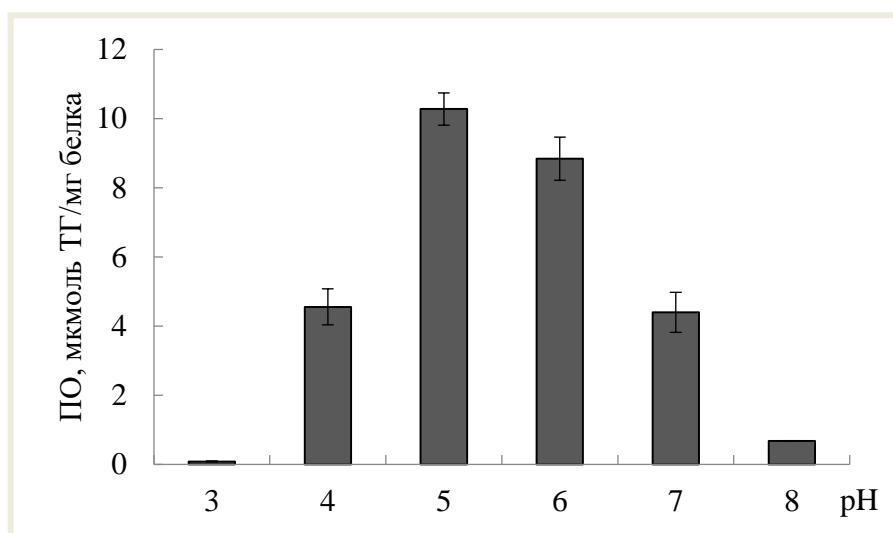


Рис. 12. Изменение активности и оптимальных значений pH для ПО в листовом аппарате у 2.5-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula*.

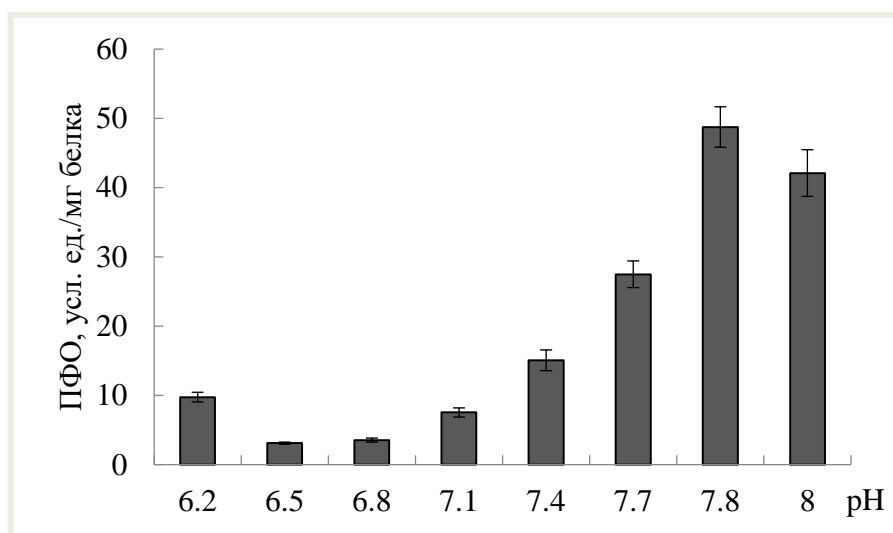


Рис. 13. Изменение активности и оптимальных значений pH для ПФО в листовом аппарате у 2.5-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula*.

2.3.2. Определение содержания целлюлозы

Целлюлозу выделяли по методу Кюршнера-Хоффера смесью концентрированной азотной кислоты и этилового спирта в соотношении 1:4 (по объему) (Оболенская и др., 1991). Содержание целлюлозы определяли гравиметрическим методом и выражали в процентах на абсолютно сухую навеску с поправкой на зольность.

2.3.3. Определение содержания лигнина

Для определения лигнина навеску растительного материала предварительно экстрагировали этиловым спиртом для освобождения от смолистых веществ (Гелес, 2001). Затем лигнин выделяли методом кислотного гидролиза в 72-% серной кислоте (TAPPI protocol, 2011). Содержание лигнина определяли гравиметрическим методом и выражали в процентах на абсолютно сухую навеску с поправкой на зольность.

2.3.4. Определение содержания фенолов

Общее содержание фенолов проводили из лиофильно высушенного растительного материала спектрофотометрически (Спектрофотометр СФ-2000, ОКБ «Спектр», Россия) по цветной реакции с паранитроанилином в присутствии нитрита натрия в пересчете на кверцетин (Долгодворова, Черняева, 1977). Общее содержание фенолов выражали в процентах на абсолютно сухую навеску.

2.4. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных осуществлялась в среде Microsoft Excel и PAST. На диаграммах приведены средние значения, с учетом указанной биологической (обозначение на графиках **n**) и трехкратной аналитической повторностей, и их стандартные ошибки. Выборки проверялись на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка. Для оценки достоверности различий при нормальном распределении использовали t-критерий Стьюдента (обозначение на графиках (*)). При отклонениях от нормального распределения для оценки различий использовали критерий Манна-Уитни (обозначение на графиках латинскими буквами). Для обнаружения зависимости активности ферментов и содержания целлюлозы, лигнина от степени узорчатости древесины, а также активности ферментов от стадии развития листа проводили анализ с использованием теста ранговой корреляции Спирмена. Также проводили корреляционный анализ, показывающий взаимосвязь активности ферментов между собой. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

Исследования выполнены на научном оборудовании Центра коллективного пользования Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук».

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Годичная динамика активности пероксидазы и каталазы в тканях ствола у двух форм *B. pendula*, различающихся по структуре древесины

Исследование проводили в течение 2016 года на 46-летних растениях *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Температура, наряду с фотопериодом, – основной фактор, запускающий или тормозящий важнейшие метаболические процессы, происходящие в растении, и, тем самым, характеризующий определенную фенологическую фазу (Федорков, 2007). На рисунке 14 представлены среднесуточные температуры в день отбора образцов, день до отбора и день после отбора. Даты отбора были приурочены к протеканию различных фенофаз.

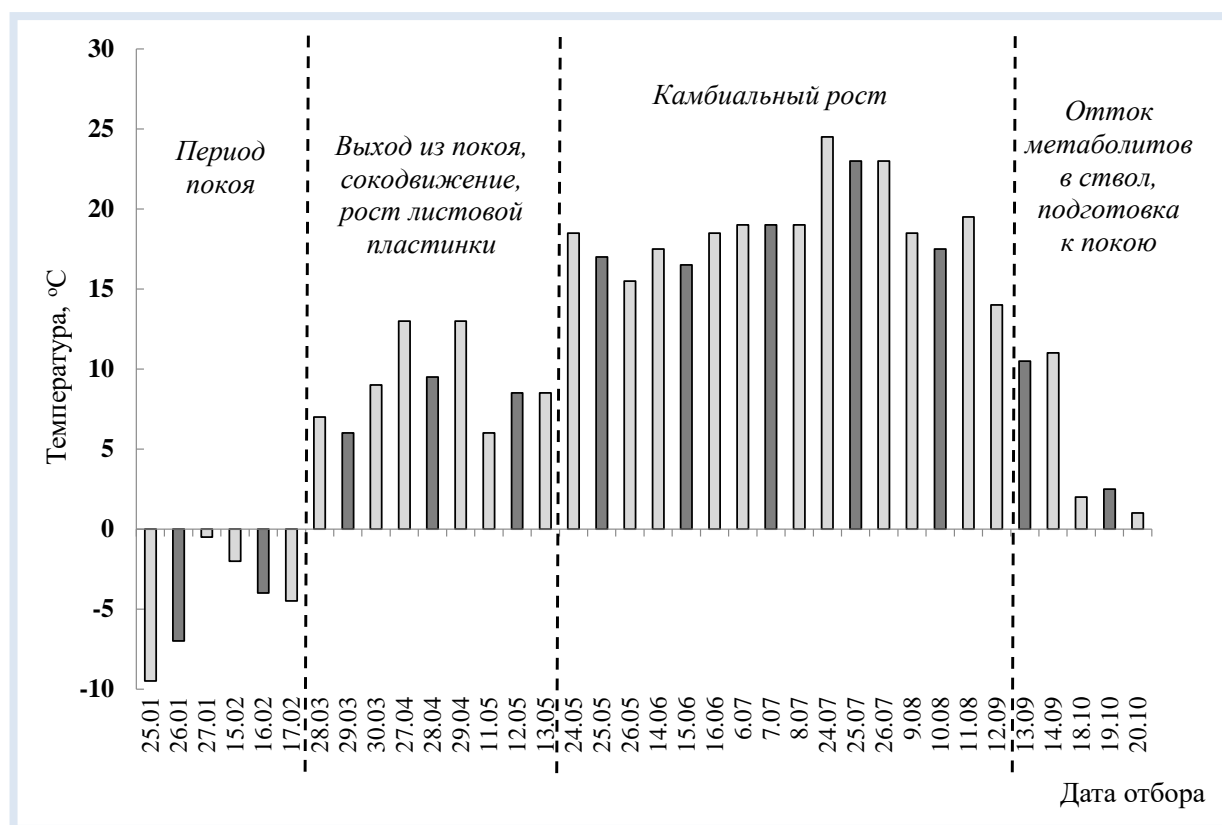


Рис. 14. Динамика среднесуточной температуры в течение 2016 года в г. Петрозаводске. Данные с сервера «Погода России» (<https://rp5.ru>). Темными столбиками обозначены даты отбора образцов.

Период покоя:

26.01 – состояние глубокого покоя (в лабораторных условиях почки не распускаются);

16.02 – состояние вынужденного покоя (почки способны распускаться и расти).

Выход из состояния покоя, сокодвижение, рост листовой пластинки:

29.03 – выход из состояния покоя, в стволе начинается гидролиз запасных веществ (Галибина и др., 2012);

28.04 – активное сокодвижение;

12.05 – активные процессы во флоэме, клетки флоэмы сильно вакуолизированы, отделение коры от ксилемы идет по зоне дифференциации флоэмных клеток (Барильская, 1978), лист распустился на 50-70 %.

Камбиальный рост:

25.05 – начало формирования прироста ксилемы, камбиальная зона оводнена, отделяется к флоэме, лист распустился на 100 %;

15.06 – активное формирование ранней тонкостенной древесины;

07.07 – активизация утолщения клеточной стенки;

25.07 – продолжение формирования вторичной клеточной стенки;

10.08 – завершение камбиального роста, кора плохо отходит от ксилемы.

Подготовка к состоянию покоя:

13.09 – интенсивный отток метаболитов в ствол, кора не отходит от ксилемы;

19.10 – подготовка к состоянию покоя.

3.1.1. Активность каталазы у двух форм *V. pendula*, отличающихся по структуре древесины

У растений *V. pendula* var. *pendula* в ксилеме при переходе от глубокого к вынужденному покою активность КАТ увеличивалась от 405 до 463 мкмоль H_2O_2 /мг белка (рис. 15, 26 января и 16 февраля) и продолжала возрастать по мере выхода растений из состояния покоя. Максимальную активность КАТ в ксилеме наблюдали в период разворачивания листовой пластинки (рис. 15 А, 12 мая) – 622 мкмоль H_2O_2 /мг белка. Во флоэме активность КАТ в период покоя была 381 мкмоль H_2O_2 /мг белка. Отметим, что во флоэме в период покоя активность КАТ была ниже, чем в ксилеме (рис. 15 А, 26 января), так как процессы дыхания у

древесного растения, в большей степени, сосредоточены в ксилеме, а активность КАТ может быть косвенным показателем более активных дыхательных процессов (Крамер, Козловский, 1983).

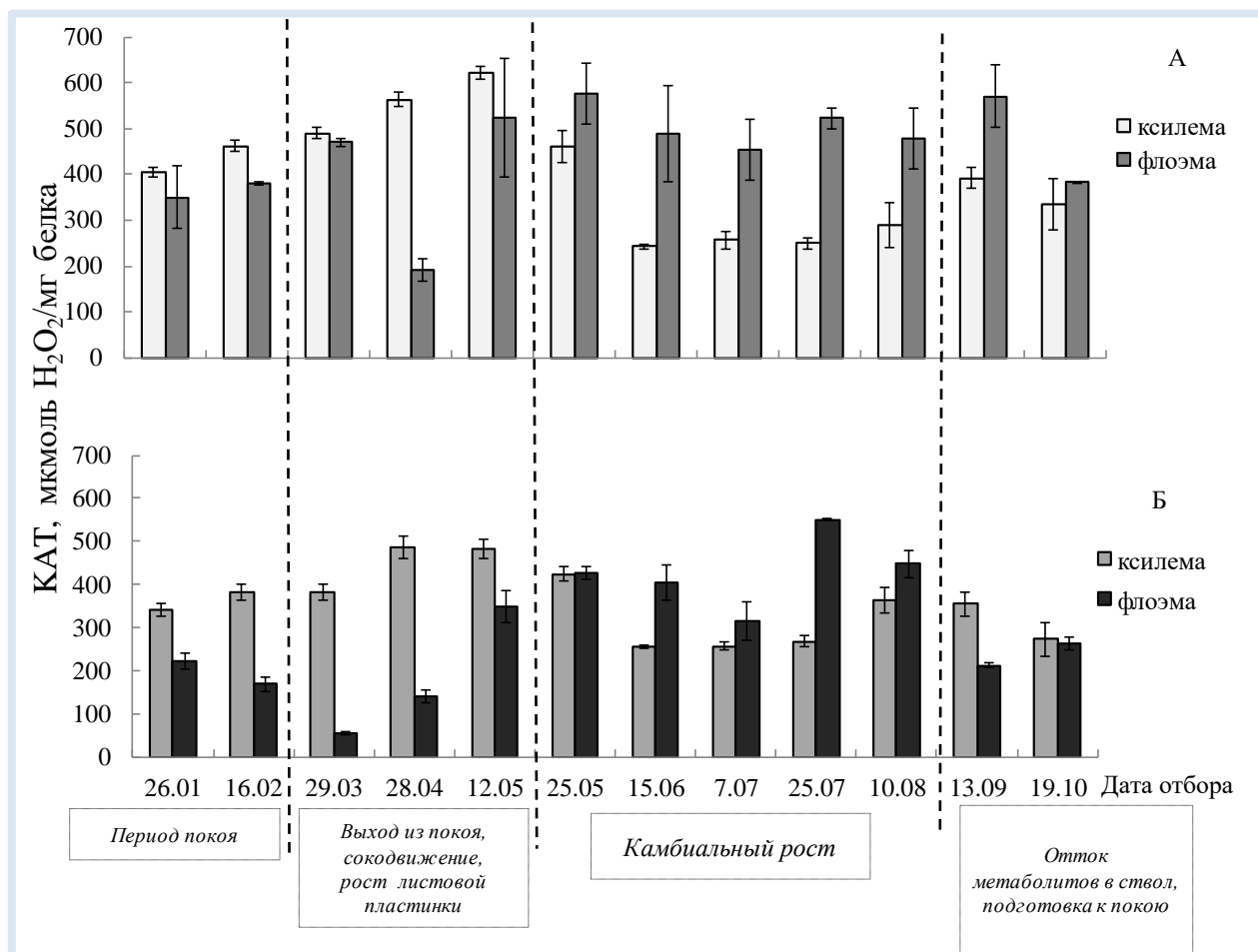


Рис. 15. Сезонная динамика активности КАТ в тканях ствола у двух форм *B. pendula*: *B. pendula* var. *pendula* (А) (n=5), *B. pendula* var. *carelica* (Б) (n=5).

В период выхода растений из состояния покоя активность КАТ возросла и колебалась в диапазоне 470-524 мкмоль H₂O₂/мг белка (рис. 15 А, 29 марта и 12 мая), за исключением периода сокодвижения, когда ее активность снизилась до 190 мкмоль H₂O₂/мг белка (рис. 14 А, 28 апреля).

В период камбиального роста во флоэме активность каталазы практически не изменялась, а в ксилеме происходило ее снижение. Прекращение ростовых процессов и интенсивный отток метаболитов в ткани ствола сопровождалось возрастанием активности КАТ, особенно во флоэме, где её значение достигало 571 мкмоль H₂O₂/мг белка (рис. 15 А, 13 сентября). При переходе растений к

состоянию покоя активность КАТ в тканях ствола была близка к таковым в период покоя.

У растений *B. pendula* var. *carelica* активность КАТ в ксилеме имела похожую годовую динамику. Активность фермента в период покоя колебалась в диапазоне 340-381 мкмоль H_2O_2 /мг белка (рис. 15 Б, 26 января и 16 февраля), повышалась при выходе из состояния покоя, достигала максимальных значений в период разворачивания листовой пластинки – 486 мкмоль H_2O_2 /мг белка (рис. 15 Б, 28 апреля) и снижалась в период камбиального роста до 255-362 мкмоль H_2O_2 /мг белка (рис. 15 Б, 15 июня, 7 июля, 25 июля и 10 августа). Во флоэме узорчатых растений сезонная динамика активности КАТ отличалась от таковой у растений *B. pendula* var. *pendula*. При выходе растений из состояния покоя (рис. 15 Б, 23 марта) и после окончания камбиального роста в период интенсивного оттока метаболитов в ствол (рис. 15 Б, 13 сентября) происходило снижение активности КАТ до 55 и 213 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно.

Активность КАТ в ксилеме у растений *B. pendula* var. *pendula* была выше, чем у узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*, за исключением периода камбиального роста, когда происходит формирование древесины и отложение вторичной клеточной стенки (вторая половина июля). В этот период в ксилеме наблюдалась обратная тенденция: КАТ была выше у растений *B. pendula* var. *carelica* (рис. 15 Б). Активность КАТ во флоэме была выше в течение всего сезона у растений *B. pendula* var. *pendula* по сравнению с узорчатыми растениями *B. pendula* var. *carelica*, за исключением периода формирования вторичной клеточной стенки (25 июля). Формирование нормальной древесины сопряжено с активными ростовыми процессами (Галибина и др., 2015а, 2016б). Известно, что активизация работы меристем связана с увеличением уровня дыхания, затрат энергии на метаболизм (Sairam et al., 2003; Мазей и др., 2009; Павлова и др., 2014), которые, вероятно, сопровождалось повышением каталазной активности. Активность КАТ, в таком случае, могла служить показателем формирования новых жизнеспособных органов и тканей (Карасев и др., 2015).

3.1.2. Активность пероксидазы у двух форм *B. pendula*, отличающихся по структуре древесины

В период глубокого покоя у обеих изучаемых форм *B. pendula* активность ПО, как и КАТ, была невысокая (рис. 15, 16, 26 января). Известно, что ферменты АОС являются показателем активных аэробных процессов, а в зимний период покоя в растении преобладают анаэробные процессы (Рогожин, 2004). Пик активности ПО приходился на конец марта, когда растения еще находились в состоянии вынужденного покоя. Значения ее в ксилеме достигали 485 и 1087 и во флоэме 611 и 1250 мкмоль ТГ/мг белка у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* соответственно (рис. 16 А, Б, 29 марта).

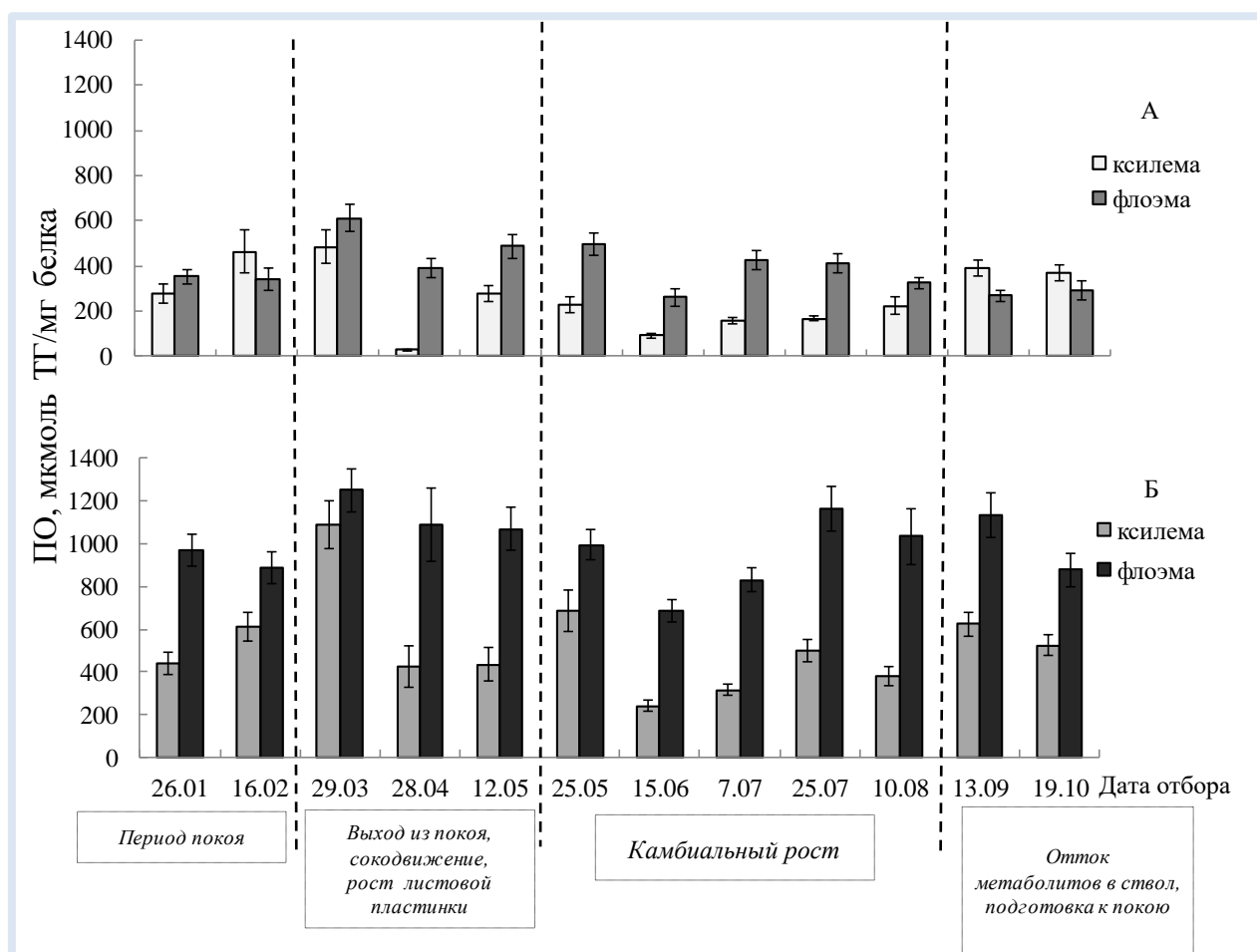


Рис. 16. Сезонная динамика активности ПО в тканях ствола у двух форм *B. pendula*: *B. pendula* var. *pendula* (А) (n=5), *B. pendula* var. *carelica* (*B. pendula* var. *carelica*) (Б) (n=5).

В ксилеме низкие значения активности наблюдали в период сокодвижения (31 и 424 мкмоль ТГ/мг белка у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* соответственно) и в период формирования ранней тонкостенной древесины (91 и 243 мкмоль ТГ/мг белка у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* соответственно) (рис 16 А, Б, 28 апреля и 15 июня). Во флоэме – только в период формирования ранней тонкостенной древесины (263 и 688 мкмоль ТГ/мг белка у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* соответственно) (рис 16 А, Б, 15 июня).

Обнаружено, что у растений *B. pendula* var. *pendula* на протяжении всего сезона активность ПО была ниже, чем у растений *B. pendula* var. *carelica*, как в ксилеме ($p = 0.0024$), так и во флоэме ($p < 0.0001$). (рис. 16). В тканях флоэмы, по сравнению с тканями ксилемы, активность ПО была значимо выше у *B. pendula* var. *pendula* ($p = 0.0304$) и особенно у *B. pendula* var. *carelica* ($p = 0.0003$).

Полученные данные подтверждают обнаруженную ранее (Галибина и др., 2013) обратную корреляцию между ростовыми процессами и пероксидазной активностью в тканях ствола. В период камбиального роста основной субстрат в тканях березы – сахароза интенсивно расходуется на синтез компонентов клеточных стенок структурных элементов древесины. В этот период метаболизация сахарозы в камбиальных инициалах происходит с участием цитоплазматических ферментов: цитоплазматической инвертазы (ЦитИнов) (на стадии формирования тонкостенной древесины) и СС (на стадии активного отложения вторичной клеточной стенки (Галибина, 2018). При снижении активности ЦитИнов и СС в метаболизации сахарозы в тканях ствола *B. pendula* активное участие принимает АпИнов (Галибина и др., 2019а).

В этой связи рассмотрим сезонную динамику активности АпИнов (рис. 17) и сравним ее с таковой ферментов АОС. У растений *B. pendula* var. *pendula* на протяжении всего сезона активность АпИнов, как и активность ПО, была, в целом, ниже, чем у растений *B. pendula* var. *carelica* в тканях флоэмы ($p = 0.0073$) и ксилемы (в каждую отдельную дату отбора) (рис. 17). Активность АпИнов и ПО положительно коррелировали в ксилеме и у растений *B. pendula* var. *pendula* ($r = 0.86$; $p = 0.0004$), и у *B. pendula* var. *carelica* ($r = 0.68$; $p = 0.015$) (рис. 16, 17).

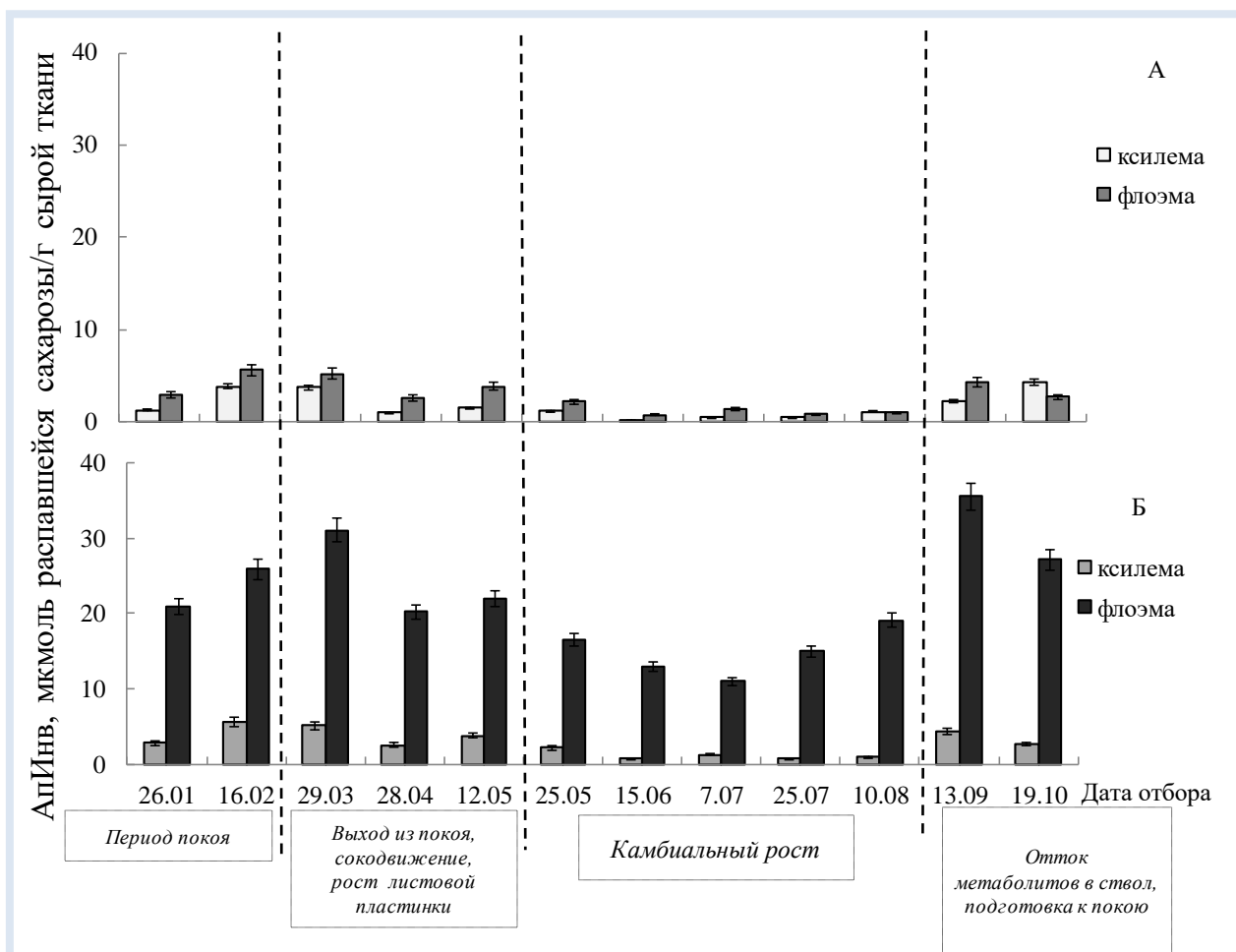


Рис. 17. Сезонная динамика активности АпИнв в тканях ствола у двух форм *B. pendula*: *B. pendula* var. *pendula* (А) (n=5), *B. pendula* var. *carelica* (Б) (n=5).

Отметим, что тесная взаимосвязь активности изучаемых ферментов отмечалась и в отдельные фазы сезонной динамики. Так, например, выход из состояния покоя в связи с повышением температуры (рис. 14, 29 марта), когда происходит интенсификация процессов дыхания и расход метаболитов углеводной природы (Исаева, Рязанова, 2006; Федорков, 2007), сопровождался возрастанием активности КАТ (рис. 15), ПО (рис. 15) и АпИнв (рис. 17). Повышение активности АпИнв свидетельствуют о возрастании концентрации сахарозы в апопласте, особенно у растений с узорчатой древесиной, что может быть следствием интенсивного гидролиза полимерных компонентов в этот период (Галибина и др., 2012). Избыток гексоз, образующихся при апопластной утилизации сахарозы, может, в свою очередь, расходоваться на образование субстратов окисления и АФК (Couée et al., 2006; Донцов и др., 2006; Wellen, Thompson, 2010), приводя к

возрастанию активности ПО и КАТ. Особенно активность ферментов АОС увеличивалась во флоэме (рис. 15, 16), где была выше активность АпИнв (рис. 17).

Если у растений *B. pendula* var. *pendula* во флоэме высокая активность ПО (рис. 16 А) наблюдалась на фоне высокой активности КАТ (рис. 15 А), то у узорчатых растений была отмечена другая тенденция: экстремально высокая активность ПО (рис. 16 Б) на фоне самой низкой каталазной активности (рис. 15 Б). Такая компенсаторная роль ПО и КАТ не редко отмечается исследователями у разных растений (Chen et al., 2008; Fernández-García et al., 2004).

В период камбиальной деятельности сахара, притекающие из фотосинтезирующих листьев, активно расходуются в камбиальной зоне на рост и дифференциацию ксилемы и флоэмы. В ксилеме сахароза утилизируется ЦитИнв и СС (Галибина, 2018). В это время (июнь-август) на фоне снижения активности АпИнв (рис. 17) понижена активность КАТ и ПО в ксилеме (рис. 15, 16). На фоне интенсивного расхода метаболитов на камбиальный рост в ксилеме, во флоэме наблюдалась высокая активность КАТ, особенно во время интенсивного отложения вторичной клеточной стенки (рис. 15, 25 июля), что может свидетельствовать об активных дыхательных процессах в этих тканях (Мазей и др., 2009; Павлова и др., 2014).

В период подготовки растения к состоянию покоя (сентябрь) в стволе в результате осеннего оттока ассимилятов из кроны повышается содержание сахарозы (Галибина, 2018), что отразилось в повышении активности АпИнв (рис. 17). Моносахара, образующиеся в результате расщепления сахарозы АпИнв, возвращаются в клетки паренхимы и идут на синтез запасных биополимеров. Как и в период выхода растения из состояния покоя на фоне повышения активности АпИнв (рис. 17) у растений *B. pendula* var. *pendula* происходило повышение активности КАТ и ПО (рис. 15, 16). У узорчатых растений на фоне большей активности АпИнв (рис. 17) существенно возрастала активность ПО (рис. 16) и понижалась активность КАТ (рис. 16).

Выявленная в течение сезона взаимосвязь активностей КАТ, ПО и АпИнв может свидетельствовать о тесной связи между изменениями, происходящими у *B. pendula* var. *carelica* в углеводном обмене (Галибина и др., 2015а, 2015б, 2019а, 2019б) и ферментами АОС.

Таким образом, данный этап исследования показал, что КАТ и ПО ведут себя разнонаправленно в течение сезона у *V. pendula* var. *pendula* и у *V. pendula* var. *carelica*. Период камбиального роста является наиболее информативным с точки зрения рассмотрения участия данных ферментов в формировании узорчатой древесины у *V. pendula* var. *carelica*, при этом особый интерес для изучения представляют ткани ствола – ксилема и флоэма. На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что по изменению активности КАТ и ПО можно судить о возможном сценарии ксилогенеза у *V. pendula* var. *carelica*.

У растений *V. pendula* var. *carelica* наблюдается более высокая активность ПО, а у растений *V. pendula* var. *pendula* практически весь сезон (за исключением периода камбиального роста) выше активность КАТ. С одной стороны, причиной меньшей активности КАТ у *V. pendula* var. *carelica* может быть высокое содержание у нее перекиси водорода, которая, согласно данным литературы, ингибирует КАТ (Мирошниченко, 1992). С другой стороны, известно, что константа Михаэлиса у КАТ намного более высокая, чем у ПО (Mittler, Zilinskas, 1991; König et al., 2002), что говорит о низком сродстве к своему субстрату – перекиси водорода. В этой связи, наоборот, более низкое содержание перекиси водорода в тканях узорчатых растений может быть причиной более низкой у них активности КАТ.

Для выяснения этих вопросов необходимо определение активности других ферментов АОС: СОД – фермента, участвующего в образовании перекиси водорода, и ПФО – фермента, который может перехватывать кислород и, с его участием, окислять фенольные соединения совместно с ПО.

3.2. Распределение активности ферментов АОС в камбиальной зоне растений *V. pendula* при разных сценариях ксилогенеза

Образование древесины – это очень лабильная характеристика, так в пределах одного дерева качество ее может существенно различаться (Paiva et al., 2008; Dharanishanthi, Dasgupta, 2016). У *V. pendula* var. *carelica* в рамках одного ствола может формироваться как прямослойная, типичная для вида древесина, так и узорчатая древесина (Novitskaya et al., 2016, рис. 18).

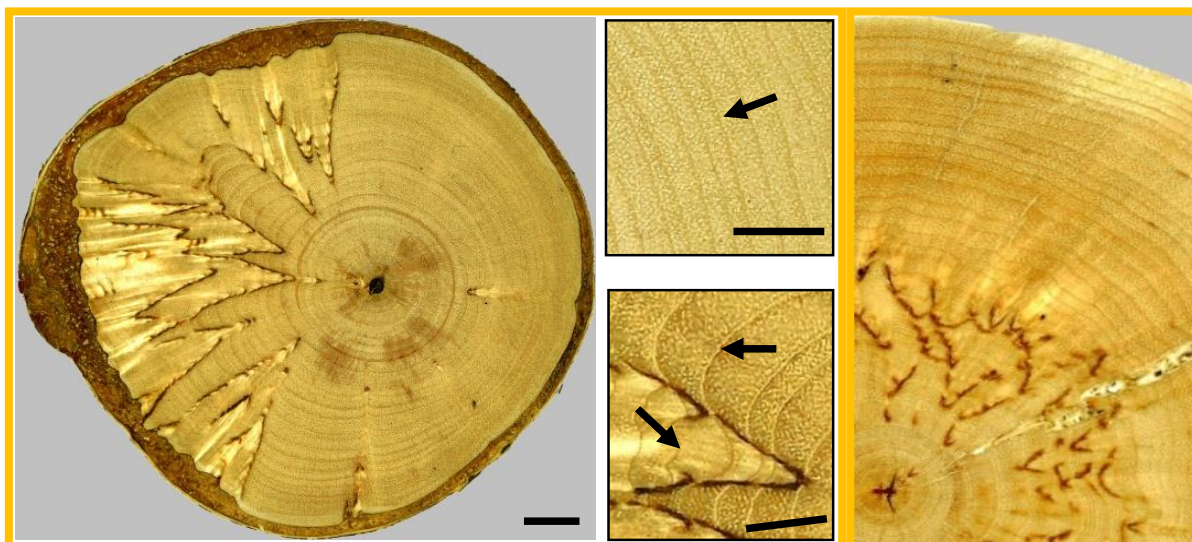


Рис. 18. Узорчатые и безузорчатые участки на одном стволе растений *B. pendula* var. *carelica*.

Для исследования были выбраны 12-летние растения *B. pendula* var. *carelica*, у которых на одном стволе встречались безузорчатые и узорчатые участки древесины. В качестве контрольных использовали растения *B. pendula* var. *pendula* (рис. 19). Ткани отбирали в период активного камбиального роста в июле 2018 года.

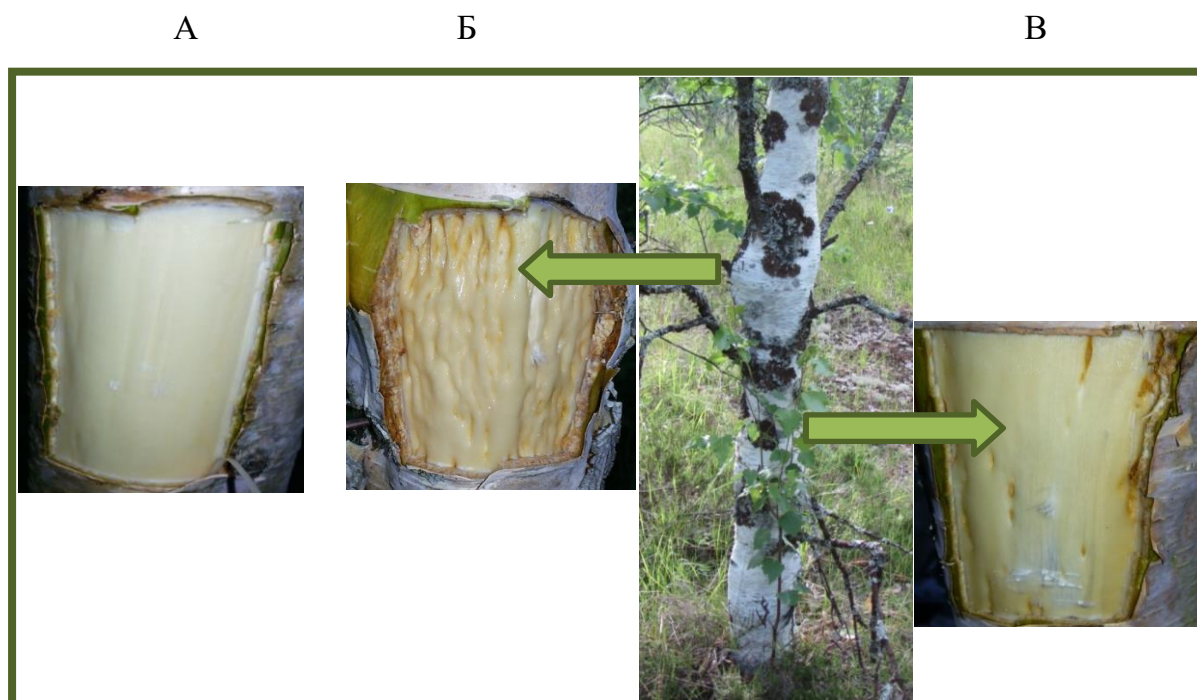


Рис. 19. Растения *B. pendula* var. *pendula* (А) и *B. pendula* var. *carelica*: безузорчатая (Б) и узорчатая части ствола (В) соответственно.

Для понимания роли ферментов АОС при формировании структурных аномалий, кроме перекись-утилизирующих ферментов (КАТ и ПО), также изучали активность СОД – фермента АОС, стоящего на первом рубеже защиты организма от АФК, и активность ПФО – фермента, который, наряду с ПО, входит в состав основных ферментов вторичного метаболизма растения.

3.2.1. Закономерности изменения активности исследуемых ферментов в ксилеме

В ксилеме активность СОД находилась примерно на одном уровне у всех исследуемых растений, различающихся по структуре древесины, и варьировала в диапазоне 0.71 – 0.82 усл. ед./мг белка.

Активность КАТ у растений *V. pendula* var. *pendula* была 179 мкмоль H_2O_2 /мг белка, в то время как у растений *V. pendula* var. *carelica* в безузорчатой и узорчатой части ствола 273 и 254 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно. Различия между активностью КАТ у растений *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* не отличались значимо, однако наблюдалась тенденция на увеличение активности фермента у растений *V. pendula* var. *carelica* даже в той части ствола, где аномалии внешне не были выражены.

При рассмотрении активности ПО и ПФО выявлены сходные тенденции. Оба фермента имели близкие значения активности у растений *V. pendula* var. *pendula* и в безузорчатой части ствола у растений *V. pendula* var. *carelica*. В узорчатых участках активность обоих ферментов была достоверно более высокой. Так, активность ПО у растений *V. pendula* var. *pendula* и в безузорчатой части ствола *V. pendula* var. *carelica* составила 67 и 49 мкмоль ТГ/мг белка соответственно, в то время как у растений *V. pendula* var. *carelica* в узорчатой части ствола 180 мкмоль ТГ/мг белка.

Активность ПФО у растений *V. pendula* var. *pendula* и в безузорчатой части ствола *V. pendula* var. *carelica* составила 463 и 354 усл. ед./мг белка соответственно, в то время как у растений *V. pendula* var. *carelica* в узорчатой части ствола 802 усл. ед./мг белка (рис. 20).

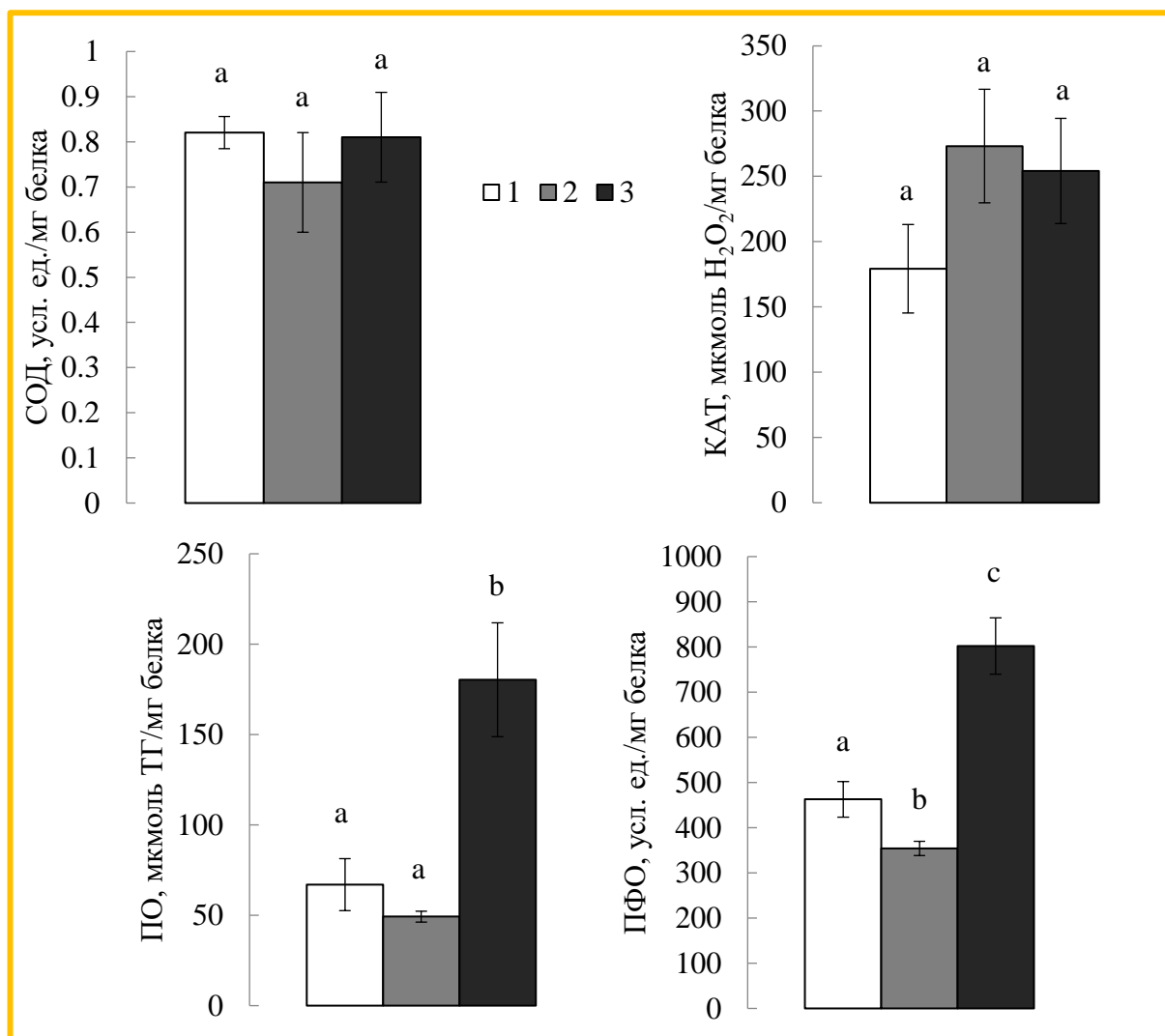


Рис. 20. Активность ферментов АОС в ксилеме у растений *V. pendula* var. *pendula* (1) (n=4) и у растений *V. pendula* var. *carelica* в безузорчатой (2) (n=4) и узорчатой (3) (n=4) частях ствола. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

3.2.2. Закономерности изменения активности исследуемых ферментов во флоэме

Во флоэме наблюдалась тенденция к увеличению активности СОД в ряду: *V. pendula* var. *pendula*, безузорчатые участки и узорчатые участки ствола *V. pendula* var. *carelica*. Значения активности фермента в этом ряду составили 1.9; 2.4 и 2.9 усл. ед./мг белка соответственно.

Активность КАТ у растений *V. pendula* var. *pendula* была 302 мкмоль H₂O₂/мг белка, в то время как у растений *V. pendula* var. *carelica* в безузорчатой и узорчатой частях ствола 564 и 398 мкмоль H₂O₂/мг белка соответственно.

Значения активности ПО в ряду растений *V. pendula* var. *pendula*, безузорчатых участков и узорчатых участков ствола *V. pendula* var. *carelica* – 73, 569 и 1009 мкмоль ТГ/мг белка; активность ПФО в том же ряду 352, 1407 и 1807 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 21).

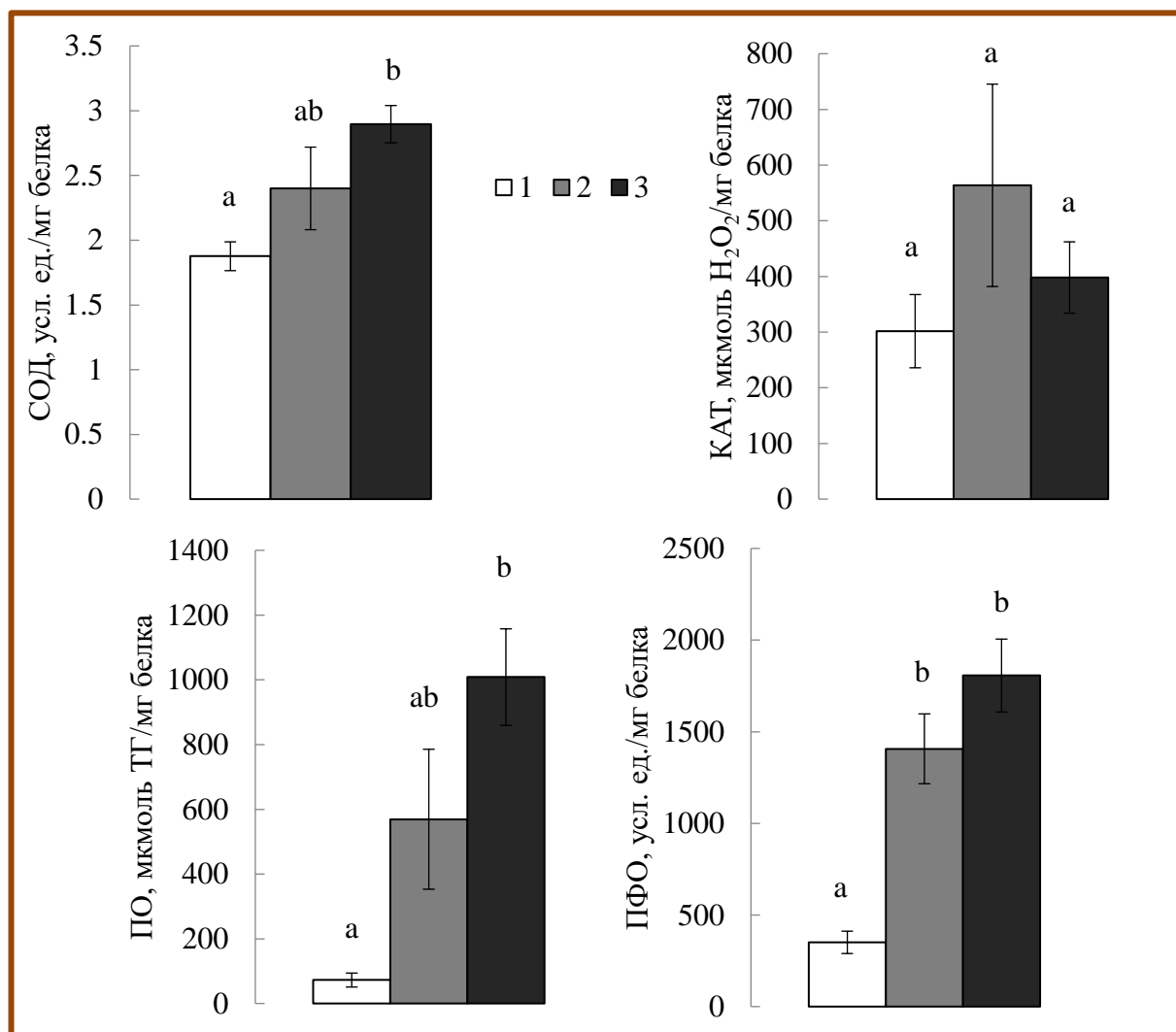


Рис. 21. Активность ферментов АОС во флоэме у растений *V. pendula* var. *pendula* (1) (n=4) и у растений *V. pendula* var. *carelica* в безузорчатой (2) (n=4) и узорчатой (3) (n=4) частях ствола. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

В результате проведенного исследования в дифференцирующихся тканях ксилемы у растений *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* (узорчатые и безузорчатые участки ствола) не обнаружено отличий в активности СОД и КАТ. При этом активности ПО и ПФО в узорчатых участках были значимо выше.

Кажется логичным, что этому могла предшествовать высокая активность СОД, при участии которой активно бы образовывалась перекись водорода, однако этого не происходило. Возможно, причина тому, единство буферной системы распределения кислорода, как субстрата реакций СОД и ПФО (Vaughn, Duke, 1984).

Особый интерес в этом отношении представляют ткани флоэмы, большая активность в них СОД (в 2.3, 3.4, 3.6 раза соответственно в ряду растений *B. pendula* var. *pendula*, безузорчатых участков и узорчатых участков ствола *B. pendula* var. *carelica*) сопровождалась и более высокой активностью КАТ (в 1.7, 2.1, 1.6 раза соответственно в ряду растений *B. pendula* var. *pendula*, безузорчатых участков и узорчатых участков ствола *B. pendula* var. *carelica*), по сравнению с таковыми в ксилеме. При этом, уже в безузорчатых участках ствола активность ПФО была достоверно выше, по сравнению с *B. pendula* var. *pendula*.

Высокую активность ПО и ПФО в ксилеме узорчатых частей ствола и во флоэме узорчатых и безузорчатых частей ствола растений *B. pendula* var. *carelica* можно связать с высокой активностью здесь АПИИВ (Галибина и др., 2019б). Работа последней приводит к интенсивному образованию гексоз, что коррелирует с накоплением в паренхимных клетках узорчатых растений большого количества липидов, веществ фенольной природы (Барильская, 1978; Новицкая, 2008; Novitskaya, Kushnir, 2006), что и может объяснять здесь высокие значения активностей основных ферментов фенольного метаболизма – ПО и ПФО. Известно, что органы и ткани с высокой концентрацией гексоз проявляют синергизм в углеводном и фенольном обмене, который является частью взаимосвязанной окислительно-восстановительной системы, улавливающей АФК (Fotopoulos et al., 2003; Essmann et al., 2008).

Таким образом, на этапе активного формирования структурных аномалий в узорчатых участках ствола утилизация перекиси водорода происходит преимущественно за счет повышения активности ПО. Повышение в стволе узорчатых растений активности ПФО также можно рассматривать, как индикатор образования структурных аномалий.

3.3. Участие ферментов антиоксидантной системы в формировании древесины *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью развития структурных аномалий

Одна из сложностей в изучении *B. pendula* var. *carelica* связана с особенностями наследования признака «узорчатости». Многолетние исследования *B. pendula* var. *carelica* показали (Любавская, 1978; Ермаков, 1986; Машкина и др., 2000; Новицкая, 2008; Ветчинникова, 2005 и др.), что при любом варианте скрещивания родительских форм в потомстве появляются особи, как с узорчатой, так и безузорчатой текстурой древесины. При этом степень развития узора, а, следовательно, и хозяйственная ценность растений, варьирует от дерева к дереву, в связи с чем, вопрос диагностики этого ведущего признака при изучении насаждений *B. pendula* var. *carelica* приобретает особое значение.

В этой связи активность ферментов АОС исследовали на деревьях *B. pendula* var. *carelica*, произрастающих на лесосеменной плантации и отличающихся высоким уровнем индивидуальной изменчивости по расположению и плотности рисунка на стволе. Отбирали высокоствольные узорчатые растения *B. pendula* var. *carelica* и растения, у которых признак узорчатости не проявился (безузорчатые растения).

Все растения были поделены на четыре группы, каждой из которых был присвоен балл от 0 до 3. К первой группе (0 баллов) отнесли безузорчатые деревья, ко второй (1 балл) – растения с редким рисунком, имеющие 1-3 углубления на см², в третью группу (2 балла) попали растения, имеющие плотный рисунок, что соответствует 4-6 углублениям на см², и, в четвертую (3 балла) – особи с очень плотным рисунком – 7 и более углублений на см² и большим количеством темноокрашенных включений (рис. 22).

Отбор тканей проводили в периоды активного формирования ранней тонкостенной древесины и вторичного утолщения клеточных стенок. Изучали активность СОД, КАТ, ПО, ПФО.

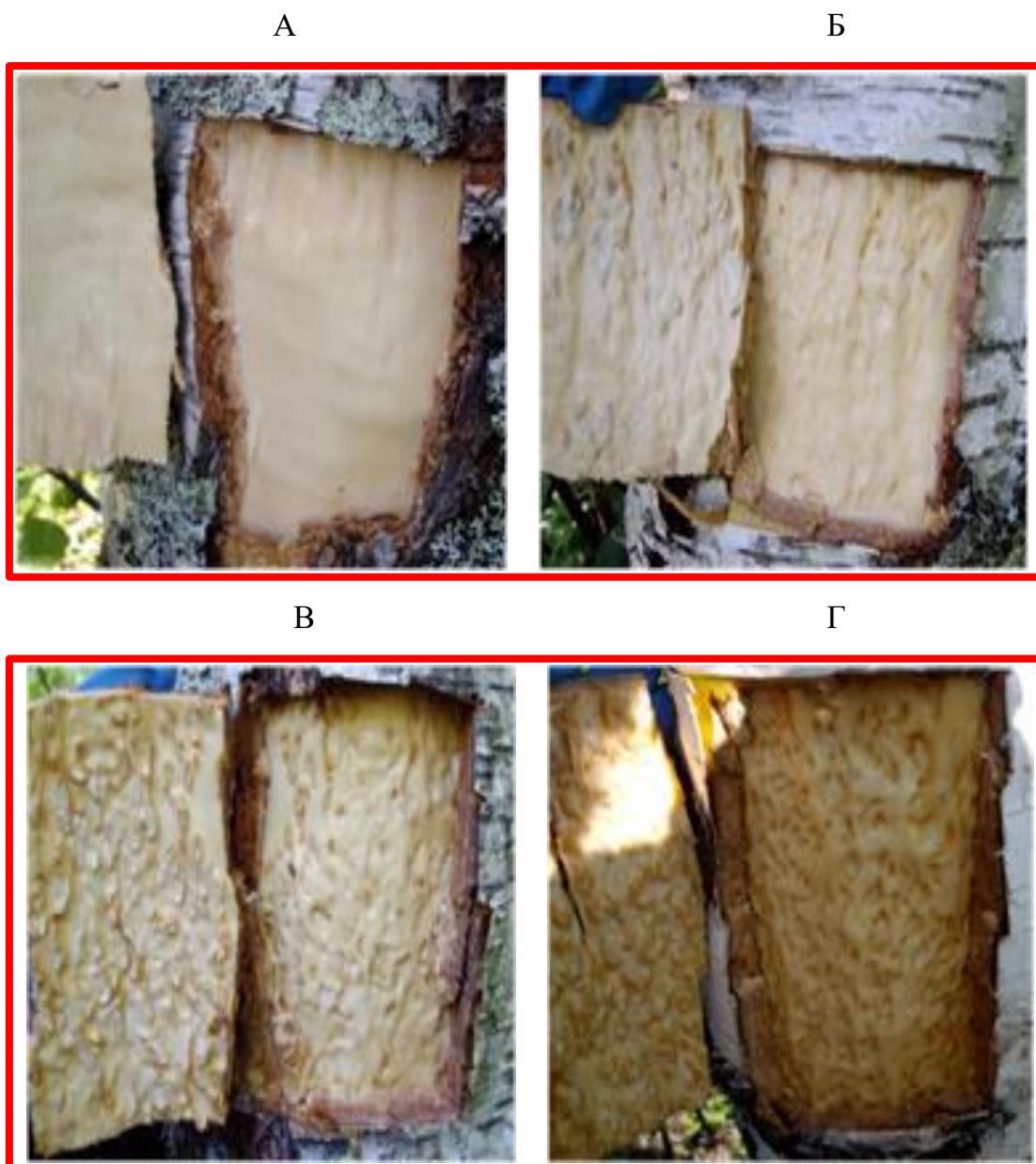


Рис. 22. Растения *B. pendula* var. *carelica* с разной степенью узорчатости древесины: 0 баллов (А), 1 балл (Б), 2 балла (В), 3 балла (Г).

3.3.1. Период активного вторичного утолщения клеточных стенок

В условиях Карелии этот период приходится на конец июня – начало июля, в зависимости от погодных условий. В 2016 году растительный материал отбирали в последнюю неделю июня. Ткани ксилемы включали дифференцирующиеся ксилемные производные камбия и наружные слои прироста ксилемы текущего года, ткани флоэмы – камбиальную зону, проводящую флоэму и самые внутренние слои непроводящей флоэмы. На рисунке 23 представлены данные по активности изучаемых ферментов в ксилеме.

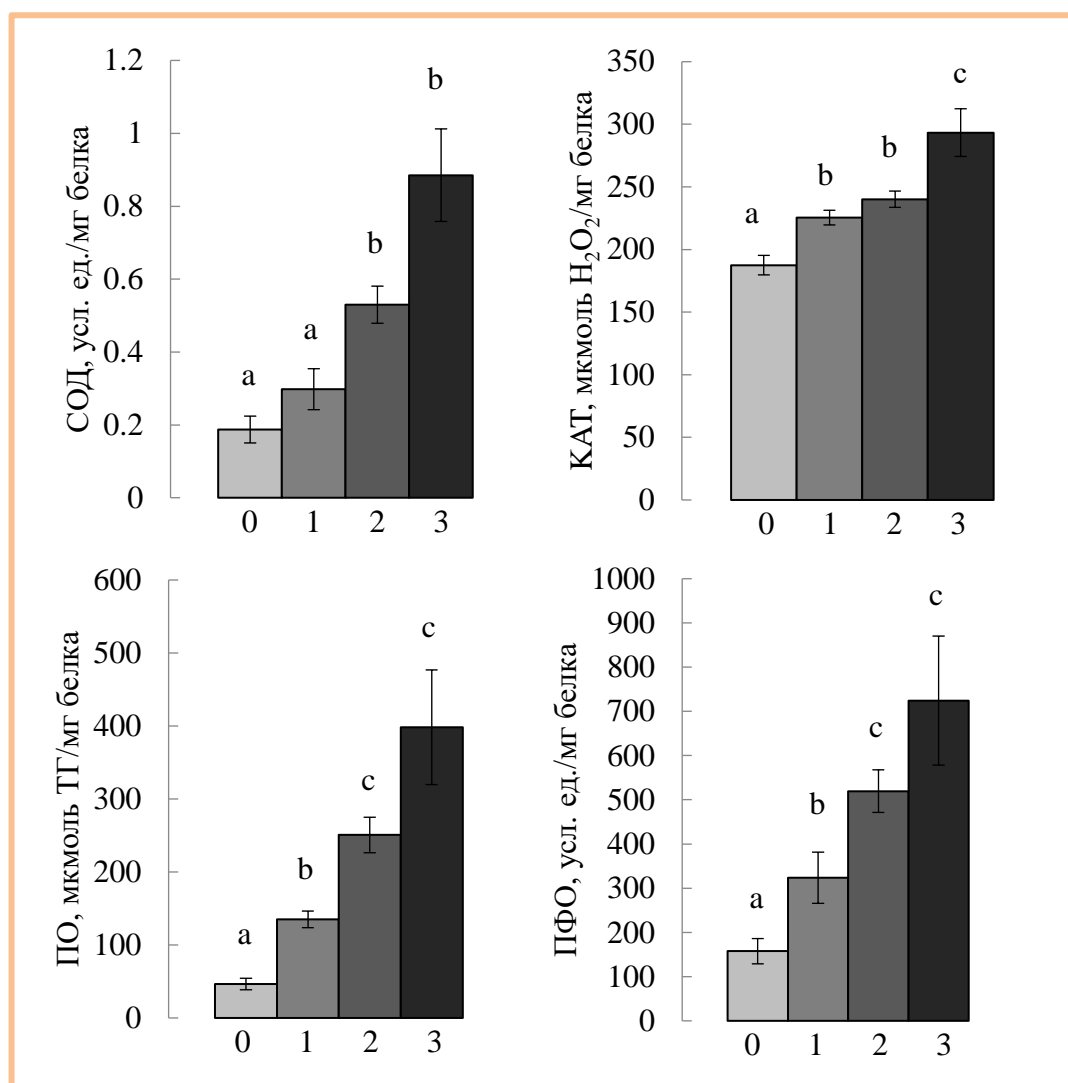


Рис. 23. Активность СОД, КАТ, ПО и ПФО в ксилеме у безузорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* (0 баллов) (n=25) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) (n(1)=19; n(2)=19; n(3)=7) в период активного камбиального роста. Баллы указаны по оси абсцисс. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Активность изучаемых ферментов у узорчатых растений, в целом, была выше, чем у безузорчатых, за исключением СОД, у которой активность у безузорчатых растений и растений с баллом узорчатости 1 значимо не отличалась. Кроме того, в ряду возрастания степени узорчатости значение их активности повышалась.

Так, активность СОД у исследуемых растений находилась в диапазоне 0.19-0.89 усл. ед./мг белка, при этом в ряду растений с 0, 1, 2 и 3 баллами узорчатости активность фермента от 0 к 1 баллу, от 1 к 2 баллам и от 2 к 3 баллам возрастала в

1.6, 1.8 и 1.6 раза. Активность КАТ при возрастании балла узорчатости от 0 к 3 увеличивалась, соответственно, в 1.2, 1.1 и 1.2 раза и достигала значений 188, 225, 240 и 293 мкмоль H_2O_2 /мг белка. При изучении пероксидазной и полифенолоксидазной активностей обнаружили такую же тенденцию, что у СОД и КАТ. Активность ПО увеличивалась в ряду растений с баллом узорчатости 0, 1, 2, 3 в 2.9, 1.9 и 1.6 раз и составила 46, 135, 251 и 398 мкмоль ТГ/мг белка, соответственно. Активность ПФО у безузорчатых растений была 158 усл. ед./мг белка; у растений с баллом узорчатости 1 –324 усл. ед./мг белка, с баллом 2 –520 усл. ед./мг белка, у самых узорчатых растений с баллом 3 –724 усл. ед./мг белка (рис. 23).

Во флоэме активность ПО и ПФО у узорчатых растений, как и в ксилеме, возрастала с увеличением степени узорчатости. Активность СОД отличалась только между безузорчатыми и узорчатыми растениями *B. pendula* var. *carelica* в целом (без разделения по степени узорчатости), при этом активность КАТ у тех же групп имела тенденцию на повышение средних значений.

Отметим, что в возрасте 12 лет еще не наблюдается значимых отличий по активности СОД и КАТ в безузорчатых и узорчатых частях ствола *B. pendula* var. *carelica*, к возрасту 25 лет данные метаболические различия становятся явными для СОД (рис. 24).

Так, активность СОД у безузорчатых растений была 1.8 усл. ед./мг белка, а у узорчатых в 1.4 раза выше: 2.5 усл. ед./мг белка. Активность КАТ у безузорчатых растений достигла значения 334 мкмоль H_2O_2 /мг белка, а у узорчатых, в свою очередь, 379 мкмоль H_2O_2 /мг белка. Активность ПО составила 95, 581, 820 и 1382 мкмоль ТГ/мг белка, увеличиваясь в ряду возрастания узорчатости в 6.1, 1.4 и 1.7 раза соответственно. ПФО возрастала при увеличении степени узорчатости в 2.7, 1.3 и 1.6 раза. Активность ПФО у безузорчатых растений была соответственно 429 усл. ед./мг белка. У растений с баллом узорчатости 1 –1168 усл. ед./мг белка, с баллом 2 –1547 усл. ед./мг белка, у самых узорчатых растений с баллом 3 –2438 усл. ед./мг белка (рис. 24).

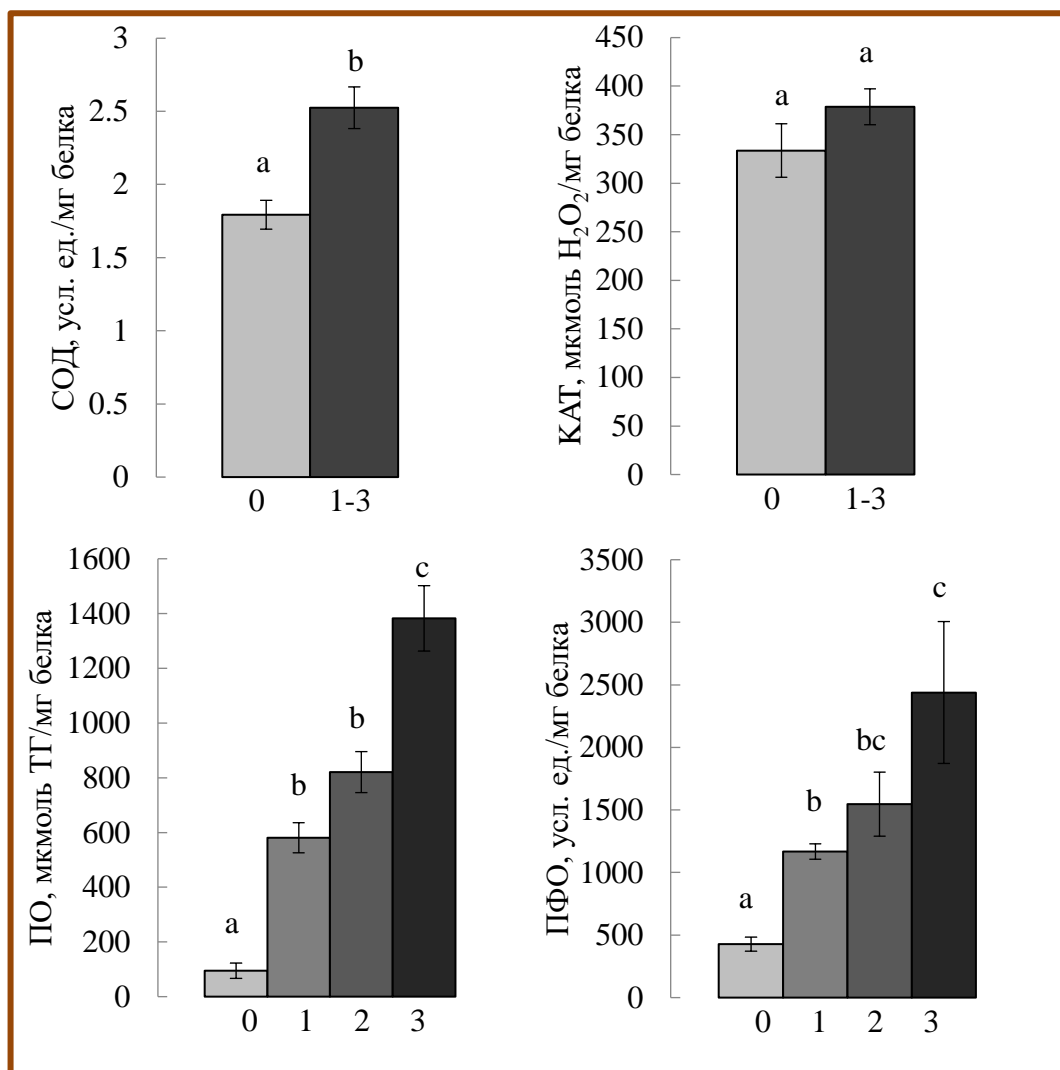


Рис. 24. Активность СОД, КАТ, ПО и ПФО во флоэме у безузорчатых растений *B. pendula var. carelica* (0 баллов) (n=25) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) (n(1)=19; n(2)=19; n(3)=7) в период активного камбиального роста. Баллы указаны по оси абсцисс. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

3.3.2. Период активного формирования ранней тонкостенной древесины

В период активного утолщения вторичных клеточных стенок увеличение активности изучаемых ферментов АОС при возрастании степени узорчатости древесины более явно проявлялось в дифференцирующейся ксилеме (ткани ксилемы), чем во флоэме. Именно в этот период в узорчатых участках ствола наблюдается высокая метаболизация сахарозы АпИнв (рис. 17; Галибина, 2018). В связи с этим, была поставлена задача изучить активность ферментов АОС в

предшествующий ему период, когда в камбиальной зоне происходят интенсивные деления и формируется ранняя тонкостенная древесина.

В условиях Карелии этот период, как правило, приходится на начало-середину июня. В 2017 году, в связи с низкими температурами в июне, эта фаза сместилась на начало июля. В этот период в ксилеме у узорчатых растений, по сравнению с безузорчатыми растениями, достоверно выше была только активность ПО и ПФО. Ранее на 12-летних растениях нами было показано, что только у этих ферментов выявлены достоверные отличия в активности между узорчатыми и безузорчатыми участками ствола узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* (рис. 20).

Так, активность СОД у исследуемых растений находилась в диапазоне 0.42-0.87 усл. ед./мг белка и в ряду растений с 0, 1, 2 и 3 баллами узорчатости составила 0.42, 0.57, 0.62 и 0.87 усл. ед./мг белка соответственно. Активность КАТ при возрастании балла узорчатости от 0 к 3 достигала значений 185, 215, 241 и 212 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно. Активность ПО в ряду растений 0-3 балла степени узорчатости древесины составила 46, 144, 190 и 325 мкмоль ТГ/мг белка соответственно. Активность ПФО в ряду растений 0-3 балла степени узорчатости древесины составила 250, 460, 482 и 638 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 25).

В ксилеме в период формирования ранней тонкостенной древесины, по сравнению с периодом интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок, у растений со степенью узорчатости древесины 0 и 1 балл были выше активность СОД и ПФО, у растений со степенью узорчатости 2, 3 балла – активность ПО и ПФО была выше, напротив, в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок (рис. 24).

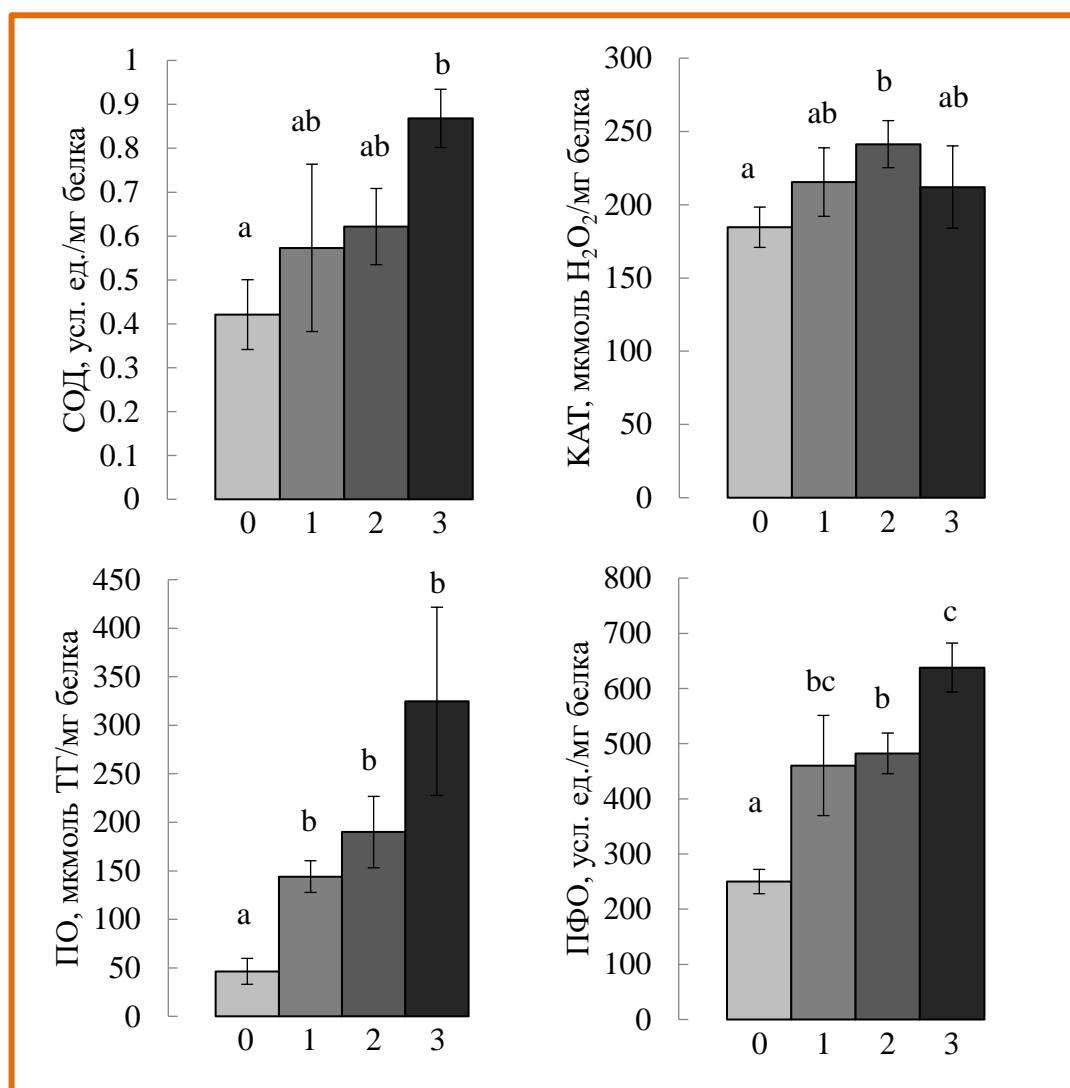


Рис. 25. Активность СОД, КАТ, ПО и ПФО в ксилеме у безузорчатых растений *V. pendula* var. *carelica* (0 баллов) (n=25) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) (n(1)=19; n(2)=19; n(3)=7) в период подготовки к камбиальному росту. Баллы указаны по оси абсцисс. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

3.3.3. Ферменты антиоксидантной системы – возможные биохимические маркеры аномальной древесины

Во время камбиального роста была обнаружена зависимость возрастания активности изучаемых ферментов АОС от степени узорчатости древесины. Наиболее четко эта зависимость проявлялась в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок по сравнению с периодом формирования ранней тонкостенной древесины, в который не было обнаружено корреляции для КАТ.

Анализ с использованием рангового коэффициента корреляции Спирмена показал, что в ксилеме в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок и в период формирования ранней тонкостенной древесины активность изучаемых ферментов зависит от степени узорчатости древесины. С увеличением степени узорчатости возрастает активность ферментов АОС (табл. 2). В тканях флоэмы в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок зависимость активности ферментов от степени узорчатости была обнаружена только для ПО и ПФО (табл. 3).

Таблица 2. Результаты теста ранговой корреляции Спирмена, отражающего зависимость активности изучаемых ферментов в ксилеме от степени узорчатости древесины в периоды интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок (А) и формирования ранней тонкостенной древесины (Б). Указаны коэффициент корреляции (r) и уровень значимости (p). Красным цветом выделено отсутствие корреляции.

А					Б				
	СОД	КАТ	ПО	ПФО		СОД	КАТ	ПО	ПФО
r	0.82	0.81	0.95	0.82	r	0.50	0.34	0.74	0.79
p	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	p	0.0099	0.0893	<0.0001	<0.0001

Таблица 3. Результаты теста ранговой корреляции Спирмена, отражающего зависимость активности изучаемых ферментов во флоэме в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок. Указаны коэффициент корреляции (r) и уровень значимости (p). Красным цветом выделено отсутствие корреляции.

	СОД	КАТ	ПО	ПФО
r	0.30	0.27	0.94	0.87
p	0.0939	0.1409	<0.0001	<0.0001

В период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок в тканях ксилемы установлена сильная положительная корреляционная взаимосвязь активности изучаемых ферментов АОС между собой (табл. 4). В тканях флоэмы анализировали взаимосвязь между активностями ПО и ПФО. Была обнаружена сильная положительная корреляция ($r = 0.99994$; $p < 0.0001$).

Таблица 4. Результаты корреляционного анализа, отражающего взаимосвязь между изучаемыми ферментами в ксилеме в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок. Указаны коэффициент корреляции r и уровень значимости p .

	СОД	КАТ	ПО	ПФО
СОД		<i>0.0246</i>	<i>0.0076</i>	<i>0.0181</i>
КАТ	0.98		<i>0.0160</i>	<i>0.0203</i>
ПО	0.99	0.98		<i>0.0023</i>
ПФО	0.98	0.98	0.998	

В период формирования ранней тонкостенной древесины в ксилеме была установлена сильная положительная корреляционная только между активностями СОД и ПО, СОД и ПФО, ПО и ПФО (табл. 5).

Таблица 5. Результаты корреляционного анализа, отражающего взаимосвязь между изучаемыми ферментами в ксилеме между собой в период формирования ранней тонкостенной древесины. Указаны коэффициент корреляции r и уровень значимости p . Красным цветом выделено отсутствие корреляции.

	СОД	КАТ	ПО	ПФО
СОД		<i>0.5913</i>	<i>0.0036</i>	<i>0.0336</i>
КАТ	<i>0.41</i>		<i>0.5175</i>	<i>0.4202</i>
ПО	0.996	<i>0.48</i>		<i>0.0231</i>
ПФО	0.97	<i>0.58</i>	0.977	

Приведенные результаты свидетельствуют о взаимосвязанной каскадной работе ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica* (табл. 4, 5). Особенно ярко эта взаимосвязь выражена в тканях ксилемы, где обнаружена корреляция активности всех изучаемых ферментов АОС со степенью узорчатости древесины (табл. 2), за исключением КАТ в период формирования ранней тонкостенной древесины. Во флоэме подобная взаимосвязь отмечена для двух ферментов – ПО и ПФО (табл. 3). Следует отметить, что зависимости наблюдаются только в период интенсивного утолщения вторичных клеточных стенок.

Выявленная взаимосвязанная работа ферментов АОС в тканях ствола *B. pendula* var. *carelica* при формировании узорчатой древесины позволяет сделать вывод об активном участии АФК в этом процессе. Эту взаимосвязь схематически можно представить следующим образом (рис. 26).

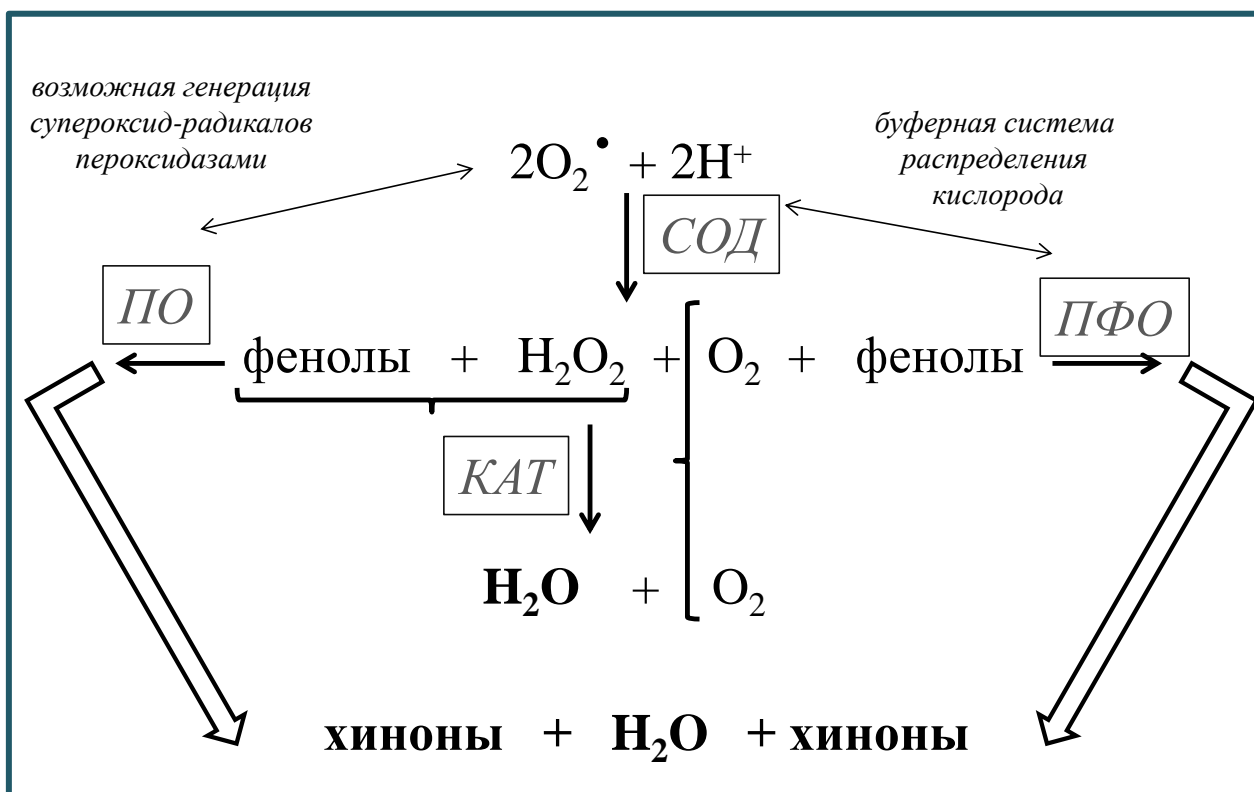


Рис. 26. Взаимосвязанная каскадная работа ферментов АОС.

В результате супероксиддисмутазной реакции происходит образование перекиси водорода, что в дальнейшем активизирует работу КАТ и ПО.

Согласованная работа СОД, КАТ и ПО происходит за счет поддержания баланса между супероксидными радикалами и перекисью водорода (Mittler et al., 2004; Прадедова и др., 2011a; Jajic et al., 2015). КАТ, ПО и ПФО связаны друг с другом посредством молекулярного кислорода, как продукта каталазной реакции, и фенолов растительного организма, а также перекиси водорода, генерируемой деятельностью СОД (Wang et al., 1991; Sheptovitsky, Brudvig, 1996). Более того, перекись водорода может являться сигнальной молекулой для запуска генов ПФО (Thipyarong et al., 2004). Хиноны, являясь продуктами реакции ПО и ПФО, образуют семихинонные радикалы, которые ковалентно присоединяются к другим молекулам и генерируют большое количество супероксидных радикалов, что обеспечивает взаимосвязь ПФО и СОД (Steffens et al., 1994; Thipyarong et al., 2004).

АФК на определенном контролируемом уровне всегда присутствуют в клетках, участвуют во многих метаболических процессах, вовлечены в нормальную жизнедеятельность растительного организма, участвуют в сигнальных путях растения (Apel, Hirt, 2004; Mittler, 2017). Возникает вопрос: в чем же причина увеличения АФК, а следом и активности АОС при формировании узорчатой древесины?

Наши предыдущие исследования показали, что при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica* имеет место смена приоритетного направления утилизации сахаров в клетках ксилемы. Образование нормальной по строению древесины *B. pendula* var. *pendula*, в составе которой преобладают сосуды и волокна, происходит на фоне высокой активности СС и сопровождается активным синтезом структурных компонентов клеточных стенок.

В ряду растений от безузорчатых до самых узорчатых уменьшается содержание целлюлозы (тест ранговой корреляции Спирмена $r = -0.83$; $p < 0.0001$). Так, у безузорчатых растений с нормальной прямослойной древесиной содержание целлюлозы (45.9 %), в ряду увеличения степени узорчатости от 1 до 3 значения соответственно 41.2 %, 40,9 % и 35,9 % (рис. 27).

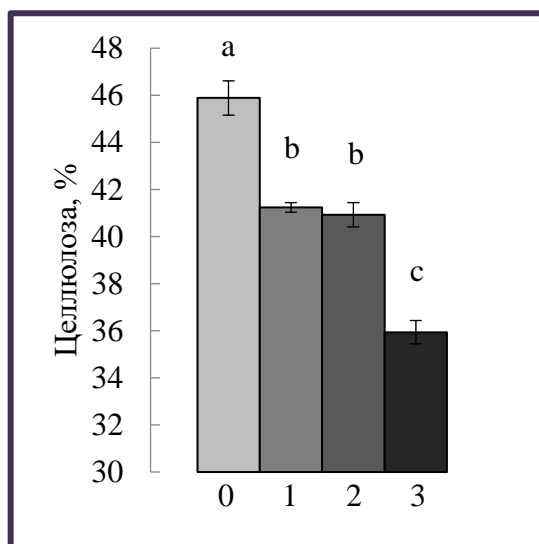


Рис. 27. Содержание целлюлозы у безузорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* (0 баллов) ($n=25$) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) ($n(1)=19$; $n(2)=19$; $n(3)=7$). Баллы указаны по оси абсцисс. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Дифференциация производных камбия у *B. pendula* var. *carelica* в зонах развития структурных аномалий происходит на фоне низкой активности СС (Галибина и др., 2015а; Галибина и др., 2016б; Мощенская и др., 2016, 2017). Избыток сахарозы выводится в апопласт и расщепляется с участием АпИInv. Возрастание активности АпИInv в камбиальной зоне можно рассматривать как компенсаторный механизм, направленный на устранение избыточного содержания сахарозы, что важно для поддержания ДАО между тканями и органами древесного растения (Галибина и др., 2019б). В данном случае процессы, связанные с синтезом/распадом сахарозы и крахмала, начинают преобладать над синтезом структурных компонентов вторичных клеточных стенок. Такая направленность метаболизма характерна для клеток, сохраняющих живой протопласт. В данной связи следует отметить, что в аномальных участках древесины *B. pendula* var. *carelica* вместо волокон и сосудов наблюдается активная дифференцировка клеток запасующей паренхимы. Уменьшение отношения активности СС/АпИInv коррелирует со степенью развития структурных аномалий в камбиальной зоне *B. pendula* (Галибина и др., 2015б; Галибина и др., 2016б; Галибина и др., 2019а).

Клетки паренхимы характеризуются активными дыхательными процессами, следовательно, в ЭТЦ образуется большое количество супероксидных радикалов

(Гарифзянов и др., 2011; Jajic et al., 2015), которые могут способствовать увеличению активности СОД. Глюкоза, являясь сигнальной молекулой, может инициировать активность ферментов АОС (Hu et al., 2012), а также непосредственно взаимодействовать с АФК, образуя субстраты пероксидазного окисления (Синькевич и др., 2009). У *B. pendula* var. *carelica* в местах структурных аномалий в клетках паренхимы накапливается большое количество фенолов (Барильская, 1978; Новицкая, 2008), которые наряду с АФК, выступают в качестве субстратов окислительных пероксидазных и полифенолоксидазных реакций (Запрометов, 1993; Srivastava, van Huyste, 1977; Maksimović et al., 2008).

При изучении сезонной динамики активности ПО и КАТ у растений *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* было показано, что в течение всего сезона в ксилеме активность АпИInv коррелирует с активностью ПО у изучаемых растений. Возрастание активности АпИInv сопровождается увеличением содержания свободных гексоз, которые включаясь в ПФЦ и цикл Кребса (Savidge, 1996; Донцов и др., 2006; Couee et al., 2006; Wellen, Thompson, 2010; Borges et al., 2017), участвуют в синтезе АФК и фенольных соединений, запуская цепь ферментов АОС.

Среди прочих, перекись водорода может играть роль той сигнальной молекулы, которая обеспечивает взаимосвязь ферментов АОС и АпИInv. Она регулирует уровень экспрессии *PR*-генов (Bi et al., 1995; Pellinen et al., 2002), кодирующих патоген-индуцируемые белки (*PR*-белки, от pathogenesis related к ним относятся и ПО), которые управляют неспецифической устойчивостью растений к действию различных факторов (Kinkema et al., 2000; Van Loon et al., 2006; Almagro et al., 2009). Как правило, повышение уровня экспрессии *PR*-генов рассматривают в связи с влиянием патогенов. Не так давно на трансгенных растениях *Populus tremula* L. × *P. alba* L. показали, что у растений со сверхэкспрессией генов, кодирующих АпИInv, увеличивается уровень экспрессии *PR*-генов (Zhang et al., 2014).

Перекись водорода, наряду с другими АФК, может расходоваться на синтез лигнина (Osion, Varner, 1993; Polle et al., 1994; Ros Barcelo, 2005; Michalak, 2006; Ros-Barceló, Gómez Ros, 2009). Есть данные, что сверхэкспрессия гена СОД может приводить к активной лигнификации (Gill et al., 2010).

Обнаруженная в наших исследованиях более высокая активность ПО и ПФО в узорчатых тканях, может быть как раз обусловлена активными процессами лигнификации. Высокоактивные хиноны, образующиеся в результате пероксидазных и полифенолоксидазных реакций, могут модифицировать и сшивать большое количество молекул с получением полимеров (Boudet et al., 2003; Passardi et al., 2004; Ros-Barceló et al., 2006; Ortega-Garcia, Peragon, 2009; Yang et al., 2010). При этом одревеснение клеточных стенок трахеальных и волокнистых элементов происходит с участием клеток паренхимы: синтезирующиеся в них монолигнолы экспортируются в клеточную стенку соседних одревесневающих клеток (Pickett-Heaps, 1968; McCann et al., 2001; Mellerowicz et al., 2001, Mellerowicz, Sundberg, 2008; Schuetz et al., 2013).

В предыдущих исследованиях было показано, что в тканях узорчатой ксилемы выше жесткость структуры клеточной стенки, по сравнению с прямослойной древесиной, за счет увеличения доли компонентов фенольной природы, как в составе лигнина, так и в виде поперечных диферуловых мостиков (Галибина, Терехова, 2014).

При определении содержания лигнина было отмечено, что у наиболее узорчатых 25-летних растений *B. pendula* var. *carelica* с баллом узорчатости 3 самая высокая активность СОД, ПО и ПФО сопровождалась более интенсивным синтезом лигнина по сравнению с безузорчатыми растениями (рис. 28). Содержание лигнина у безузорчатых растений составило 18.1 %, а у наиболее узорчатых растений 19.8 %.

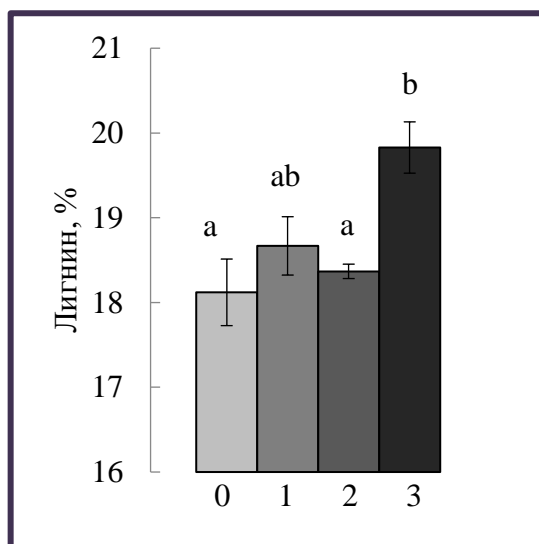


Рис. 28. Содержание лигнина у безузорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* (0 баллов) ($n=25$) и с разной степенью узорчатости (от 1 до 3) ($n(1)=19$; $n(2)=19$; $n(3)=7$). Баллы указаны по оси абсцисс. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Во флоэме была обнаружена корреляция со степенью узорчатости только для основных ферментов вторичного метаболизма – ПО и ПФО. Кроме того, не присутствует и такой серьезной взаимосвязи внутри ферментов АОС, как была обнаружена в ксилеме. Отметим, что во флоэме активность ПО и ПФО значительно выше, чем в ксилеме, что, вероятно, можно связать с бóльшим количеством фенольных соединений во флоэме у древесных растений (Антонова, Стасова, 2006, 2008).

При определении содержания фенолов в исследуемых образцах было обнаружено, что их содержание во флоэме больше в 10 раз по сравнению с ксилемой. Содержание фенолов в ксилеме у 25-летних растений *B. pendula* var. *carelica* составило 0.24 %, а во флоэме 2.4 % (рис. 29).

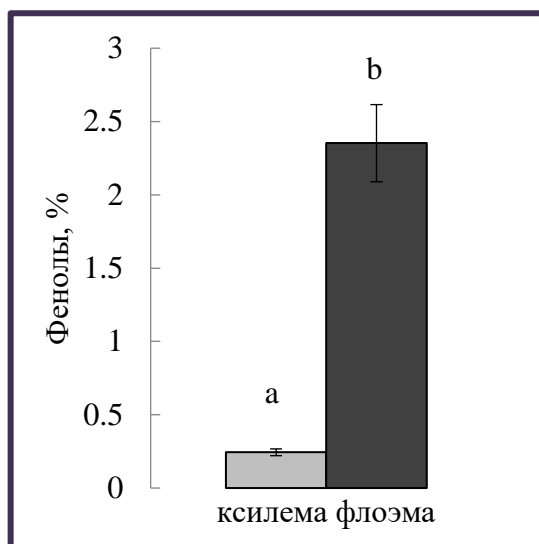


Рис. 29. Содержание фенолов у растений *V. pendula* var. *carelica* в ксилеме (n=70) и во флоэме (n=70). Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

На основании данных исследований был предложен способ количественной экспресс-диагностики «узорчатости» древесины *V. pendula* var. *carelica* по определению активности ГвПО в ксилеме (Галибина, Никерова, 2016).

Таким образом, формирование узорчатости тесно сопряжено с процессами вторичного метаболизма у древесного растения, что отражается в повышении активности ферментов АОС. Полученные данные показали возможность использования ферментов АОС в качестве биохимических маркеров узорчатости (рис. 30) в период активного камбиального роста.

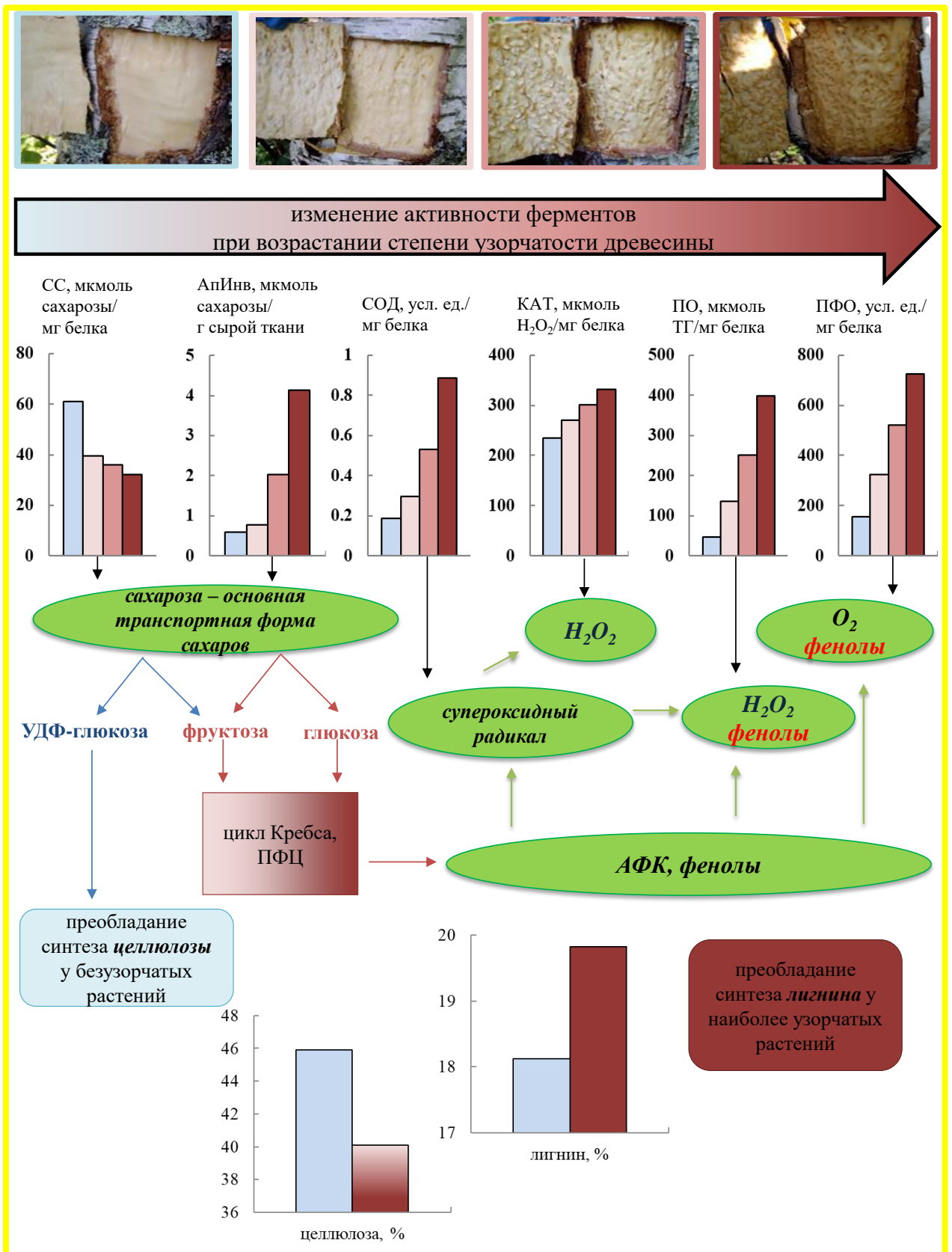


Рис. 30. Биохимические маркеры узорчатости у *B. pendula* var. *carelica* (с использованием данных по активностям АПИИв и СС из диссертации Галибиной Н. А., 2018).

3.4. Соотношение активностей ферментов антиоксидантной системы у сеянцев двух форм *V. pendula*

Известно, что ферменты АОС вовлечены в регуляцию метаболизма на протяжении всего онтогенеза растения (Жукова и др., 1996; Половникова, Воскресенская, 2008; Jakovljevic et al., 2013; Iqbal et al., 2017), поэтому их изучение необходимо на разных его стадиях.

Активация АОС, зависящая от многих факторов, среди которых возраст растения, тип и место анализируемого компартмента несет целью восстановление донорно-акцепторного баланса (ДАБ), нарушенного на уровне ЭТЦ внутриклеточных мембран (Sairam, Srivastava, 2002).

В этой связи возникает вопрос, как ведут себя изучаемые ферменты АОС, являющиеся во взрослом состоянии биохимическими маркерами структурных аномалий у *V. pendula*, в раннем онтогенезе? Сохраняются ли обнаруженные биохимические закономерности, когда внешних признаков еще нет? Может ли активность изучаемых ферментов в листовом аппарате, который связан со стеблем ДАО, являться индикатором для определения узорчатости на ранних стадиях онтогенеза?

Для выяснения этих вопросов было проведено исследование активности ферментов АОС на начальных этапах онтогенеза у 1.5 и 3-4-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica*.

3.4.1. Морфометрические показатели сеянцев

В возрасте 1.5 месяцев сеянцы *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* внешне не отличались (рис. 31), к 3-4-месяцем сеянцы *V. pendula* var. *pendula* по морфометрическим показателям превосходили сеянцы *V. pendula* var. *carelica* (рис. 32).

А

Б



Рис. 31. Сеянцы *V. pendula* var. *pendula* (А) и *V. pendula* var. *carelica* (Б) в возрасте 1.5 месяцев.

А

Б



Рис. 32. Сеянцы *V. pendula* var. *pendula* (А) и *V. pendula* var. *carelica* (Б) в возрасте 3-4 месяцев.

Высота сеянцев *V. pendula* var. *pendula* составила в среднем 7.9 см, а у *V. pendula* var. *carelica* – 5.2 см. Масса листьев у сеянцев *V. pendula* var. *pendula* (0.41 г) превосходила таковую у *V. pendula* var. *carelica* (0.21 г), такая же тенденция была обнаружена и для массы стебля: 0.13 и 0.06 г – у сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* соответственно (рис. 33).

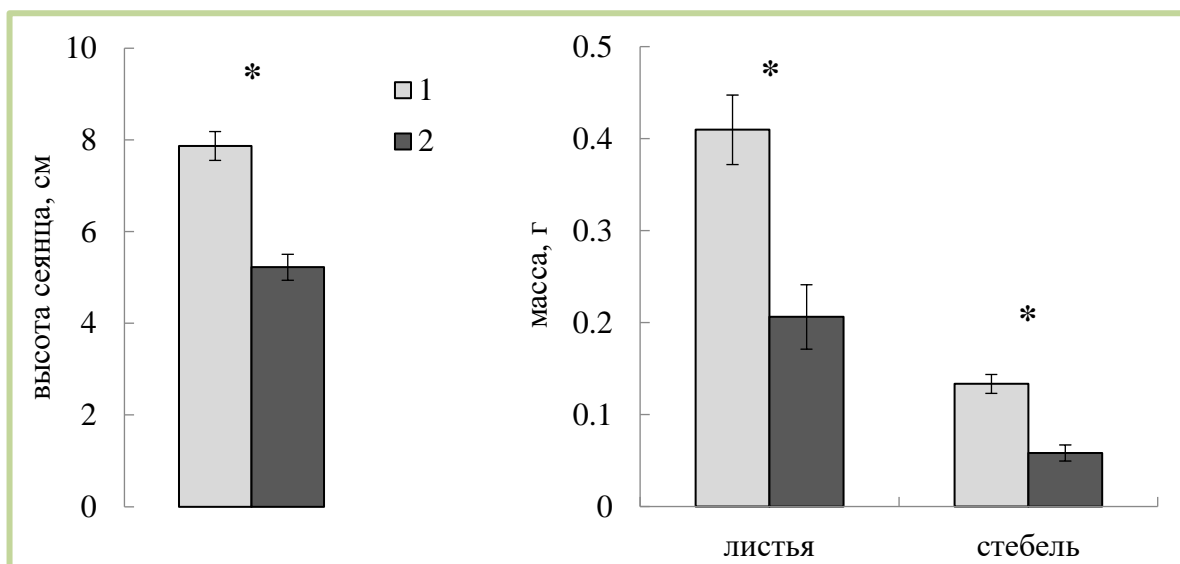


Рис. 33. Морфометрические показатели сеянцев *B. pendula* var. *pendula* (1) (n=15) и *B. pendula* var. *carelica* (2) (n=15) в возрасте 3-4 месяцев. Статистическая значимость различий при $p < 0.05$ отмечена символом (*).

3.4.2. Активность ферментов АОС у сеянцев в стебле и листовом аппарате

Активность СОД в стебле возрастала при увеличении возраста сеянцев у обеих изучаемых форм *B. pendula*, в листе оставалась практически неизменной. В возрасте 1.5 месяцев активность в листе была незначительно выше, чем в стебле (рис. 34 А), а в 3-4 месяца – наоборот, активность в стебле была немного более высокой (рис. 34 Б). Известно, что накопление транскриптов СОД тканеспецифично и зависит от стадии развития организма (Zhu, Scandalios, 1993). Возрастание активности СОД у сеянцев в стебле к возрасту 3-4 месяцев могло быть связано с увеличением свободно-радикальных окислительно-восстановительных реакций (Прадедова и др., 2009) при интенсивных ростовых процессах, связанных с оттоком метаболитов из листа.

Активность СОД в листе не отличалась значимо у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* обоих возрастов: её активность достигла значения 1.2 усл. ед./мг белка у 1.5 месячных сеянцев обеих форм; к возрасту 3-4 месяцев значения активности СОД стали 1.4 и 1.2 усл. ед./мг белка – у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* соответственно (рис. 34). При увеличении возраста в листе у двух форм *B. pendula* закономерности, наблюдаемые в изменениях активностей изучаемых ферментов, аналогичные: при очень незначительном возрастании

активности СОД отмечается понижение активности КАТ, ПО и ПФО. Так, у сеянцев *V. pendula* var. *pendula* активности КАТ, ПО и ПФО в листе уменьшились в 2.5, 6.3 и в 1.6 раза соответственно. Активность КАТ снизилась с 1563 до 631 мкмоль H_2O_2 /мг белка, активность ПО с 65 до 10 мкмоль ТГ/мг белка, а активность ПФО со 109 усл. ед./мг белка до 67 усл. ед./мг белка. У сеянцев *V. pendula* var. *carelica* активности КАТ, ПО и ПФО в листе уменьшились в 2.3, 3.7 и в 1.4 раза соответственно. Активность КАТ снизилась с 1653 до 708 мкмоль H_2O_2 /мг белка, активность ПО с 33 до 9 мкмоль ТГ/мг белка, а активность ПФО со 97 усл. ед./мг белка до 70 усл. ед./мг белка (рис. 34).

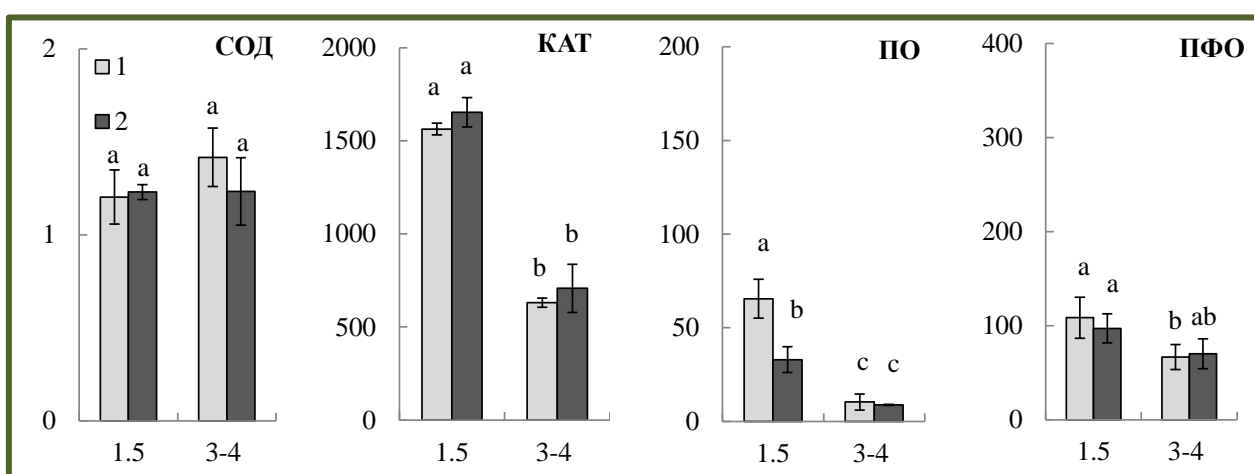


Рис. 34. Активность СОД (усл. ед./мг белка), КАТ (мкмоль H_2O_2 /мг белка), ПО (мкмоль ТГ/мг белка) и ПФО (усл. ед./мг белка) в листе у 1.5- и 3-4-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula* (1) (n=12) и *V. pendula* var. *carelica* (2) (n=12). Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

В стебле у обеих изучаемых форм активность СОД возрастает при росте: у *V. pendula* var. *carelica* в 1.6 раза, у *V. pendula* var. *pendula* – в 1.7 раза (рис. 35). Активность КАТ, в свою очередь, незначительно снижается. У сеянцев *V. pendula* var. *pendula* активность КАТ составляет 717 и 503 мкмоль H_2O_2 /мг белка у 1.5- и 3-4-месячных сеянцев соответственно. У сеянцев *V. pendula* var. *pendula* эти значения 764 и 521 мкмоль H_2O_2 /мг белка соответственно. Однако закономерности, наблюдаемые у ПО и ПФО, отличаются. Активность ПО у сеянцев *V. pendula* var. *pendula* снижается со 149 до 36 мкмоль ТГ/мг белка, а ПФО остается практически неизменной: значения при 1.5 и 3-4 месяцах 210 и 201 усл. ед./мг белка

соответственно. У сеянцев *B. pendula* var. *carelica*, напротив, активность ПО не отличается: значения 110 и 113 мкмоль H_2O_2 /мг белка при переходе возраста от 1.5 к 3-4 месяцам. Активность ПФО возрастает и составляет 198 и 312 усл. ед./мг белка соответственно (рис. 35).

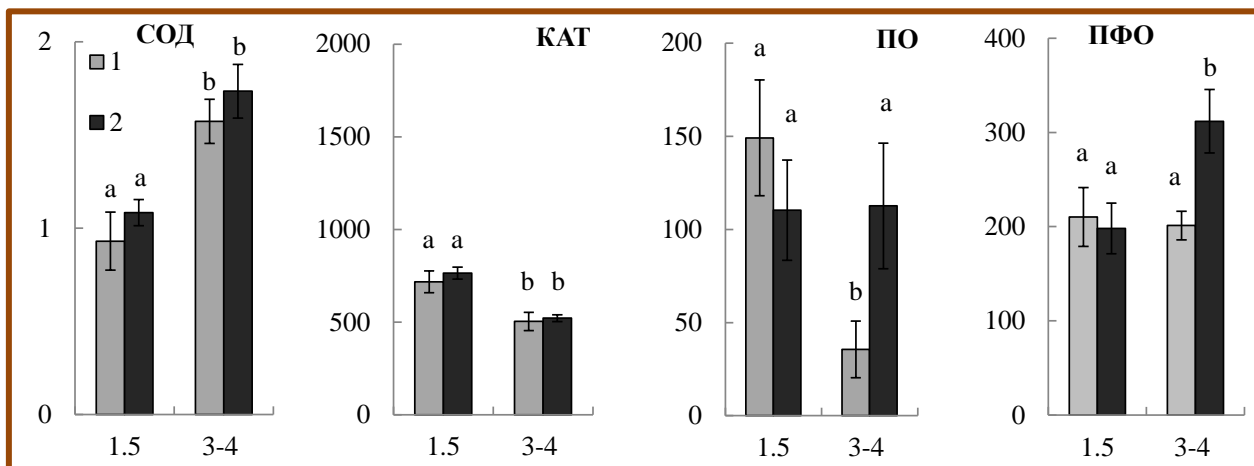


Рис. 35. Активность СОД (усл. ед./мг белка), КАТ (мкмоль H_2O_2 /мг белка), ПО (мкмоль ТГ/мг белка) и ПФО (усл. ед./мг белка) в стебле у 1.5- и 3-4-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* (1) (n=12) и *B. pendula* var. *carelica* (2) (n=12). Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Отметим разницу в активности ферментов между изучаемыми формами *B. pendula*. Активность ферментов в листе не отличалась между формами в разном возрасте. Отличия выявлены единично: активность ПО была значимо ниже (в 2 раза) у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* по сравнению с сеянцами *B. pendula* var. *carelica* в возрасте 1.5 месяцев (рис. 34).

В стебле наблюдаем иную картину. К возрасту 3-4 месяцев отличия в активности ПО и ПФО становятся значимыми. Активность обоих ферментов выше у сеянцев *B. pendula* var. *carelica*: для ПО в 3.2, для ПФО – в 1.6 раза соответственно (рис. 35).

Изучение ферментов АОС на начальных этапах онтогенеза выявило отличия в распределении их активности между сеянцами разного возраста. Так, в стебле 1.5-месячных сеянцев у растений *B. pendula* var. *carelica* и *B. pendula* var. *pendula* активности СОД, КАТ, ПО и ПФО значимо не отличались. В стебле у 3-4-месячных сеянцев распределение активности ферментов АОС было аналогично

тому, что наблюдали у взрослых растений, а именно: активности ПО и ПФО были выше у сеянцев *B. pendula* var. *carelica*.

Таким образом, стебель сеянцев *B. pendula* к возрасту 3-4 месяцев, когда видимые признаки развития аномалий еще, конечно, отсутствуют, биохимически отражает переход метаболических реакций в направлении аномального ксилогенеза. Отметим, что активность АПИInv, которая не отличается у 1.5-месячных сеянцев обеих изучаемых форм, становится выше у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* к возрасту 3-4 месяцев в стебле (рис. 36), что, вероятно, является причиной последующего повышения также и ПО и ПФО. Отмечается понижение активности фермента при росте сеянцев и в листе, и в стебле у сеянцев *B. pendula* var. *pendula*, что согласуется с теми же изменениями КАТ и ПО (рис. 34, 35). Кроме того, параллельное понижение активности ПО и АПИInv в стебле при росте сеянцев наблюдается у *B. pendula* var. *pendula* (рис. 35, 36).

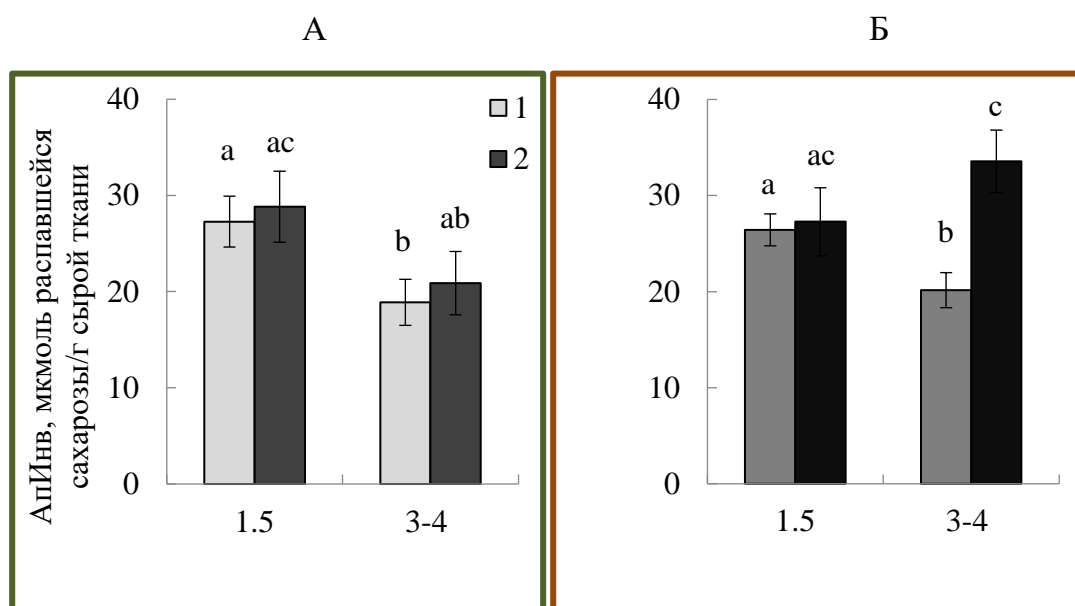


Рис. 36. Активность АПИInv в листе (А) и стебле (Б) у 1.5- и 3-4-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* (1) (n=12) и *B. pendula* var. *carelica* (2) (n=12). Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Активность КАТ не показала отличий у исследуемых растений. Можно предположить, что у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* это свидетельствует о преобладании каталазного пути расщепления перекиси водорода, что

подтверждается затем более низкой активностью ПО ввиду отсутствия необходимости в нейтрализации перекиси водорода. У сеянцев *V. pendula* var. *carelica* в нейтрализации перекиси водорода задействованы и КАТ, и ПО. Образовавшиеся в ходе пероксидазной реакции полифенолы вступают в реакцию полифенолоксидазного окисления. Вероятно, здесь имеет место внутриклеточное повышение активности ПФО, которая включается в метаболизм каскадом реакций ферментов АОС, и, в данном случае, не связана с различными реакциями повреждения, которые обычно вызывают ее высокую активность (Toivonen, Brummell, 2008).

У 3-4-месячных растений *V. pendula* var. *pendula* более низкая активность ферментов АОС коррелирует с более активными ростовыми процессами (рис. 33, 34, 35). Активация же ферментов АОС у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* того же возраста свидетельствует о переориентации на процессы вторичного метаболизма, что коррелирует со снижением темпов роста. ПО изменяет свою активность в ходе онтогенеза растения (Андреева, 1991; Кордюм и др., 2003; Passardi et al., 2005). Предполагается, что высокие значения активности ПО и ПФО могут понижать интенсивность ростовых процессов (Laukkanen et al., 1999). Все эти факты подтверждают ранее обнаруженную у взрослых растений обратную корреляцию между ростовыми процессами и пероксидазной активностью в тканях ствола (Галибина и др., 2013).

Ранее при изучении сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* в возрасте 5 месяцев было показано, что у растений *V. pendula* var. *carelica* высокие значения активности АПИнв способствуют накоплению большого количества гексоз в акцепторных органах и запасных метаболитов (Мощенская и др., 2016). Данное исследование показывает, что биохимические и молекулярные различия начинают наблюдаться между растениями *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* еще в более раннем возрасте, начиная с 3 месяцев.

Таким образом, показано, что ферменты АОС могут быть биохимическими маркерами нормального и аномального ксилогенеза у *V. pendula* var. *carelica* уже на ранних стадиях онтогенеза, когда видимые признаки аномальной древесины, конечно, отсутствуют. Протекание процессов нормального ксилогенеза, связанного с образованием прямослойной древесины, сопряжено с более

интенсивными ростовыми процессами. Аномальный ксилогенез сопряжен с активными процессами вторичного метаболизма, что подтверждается более высокой активностью ферментов АОС у сеянцев *B. pendula* var. *carelica*.

3.5. Активность ферментов АОС в листовом аппарате как возможный индикатор ранней диагностики образования узорчатой древесины

Изучение активности ферментов АОС, которые, возможно, могут иметь индикаторную роль в стебле уже в раннем онтогенезе при рассмотрении процессов нормального и аномального ксилогенеза, в листе приобретает особое значение. Лист функционирует в целостной системе ДАО. Акцепторные зоны (зоны роста или запасаения), в случае изучения древесных растений – это формирующиеся стволовые ткани, получают ассимиляты, которые образовались в листе в ходе различных процессов жизнедеятельности (например, фотосинтеза и дыхания) (Шелякин и др., 2016). Предположительно, активность ферментов АОС, определяемая в листовом аппарате, могла бы стать удобным биохимическим маркером для идентификации процессов нормального и аномального ксилогенеза.

Результаты, описанные в разделе 3.4.2., показали, что активность ПО у 1.5-месячных сеянцев в листе выше, чем у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* того же возраста. К возрасту 3-4 месяцев значимых отличий обнаружено не было. Вероятно, это связано с необходимостью разделения листового аппарата по стадиям развития листа, так как у сеянцев разных форм соотношение листьев разных размеров не одинаково.

3.5.1. Активность ферментов АОС в листовом аппарате у сеянцев двух форм *B. pendula*

Для верификации высказанной гипотезы было проведено исследование активности перекись-расщепляющих ферментов (КАТ и ПО) у 10-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* на разных стадиях развития листа.

Все исследуемые листья находились во внепочечном периоде развития, они имели форму, характерную для взрослого растения, но существенно отличались размерами. Для анализа отбирали листья, обладающие наибольшей длиной

листовой пластинки, которая составила 7-8 см. Эти листья были отнесены к IV стадии развития. Остальные стадии выделяли в процентах от длины наибольшего листа (75, 50 и 25 % соответственно). Так, листья, длина которых составила 5-6 см, были отнесены к III стадии развития, листья длиной 3-4 см – ко II стадии, 1-2 см – к I стадии (рис. 37).

А



Б



Рис. 36. Внешний вид листьев сеянцев *B. pendula* var. *pendula* (А) и *B. pendula* var. *carelica* (Б) I - IV стадий. I стадия – лист 1-2 см, II стадия – лист 3-4 см, III стадия – лист 5-6 см, IV стадия – лист 7-8 см.

Количество листьев у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* были больше, чем у сеянцев *B. pendula* var. *pendula*. Кроме того, у *B. pendula* var. *carelica* листовой аппарат был равномерно представлен листьями всех изучаемых стадий развития, а у *B. pendula* var. *pendula* молодые листья (II и особенно I стадий) встречались единично, и возобновление листового аппарата происходило не так интенсивно.

В результате проведенных измерений установлено, что у обеих изучаемых форм *B. pendula* каталазная активность в листьях значимо возрастала при переходе их от I к IV стадии развития, то есть с увеличением длины листовой пластинки: у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* $r = 0.83$ ($p = 0.00012$), у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* $r = 0.92$ ($p < 0.0001$) (рис. 38).

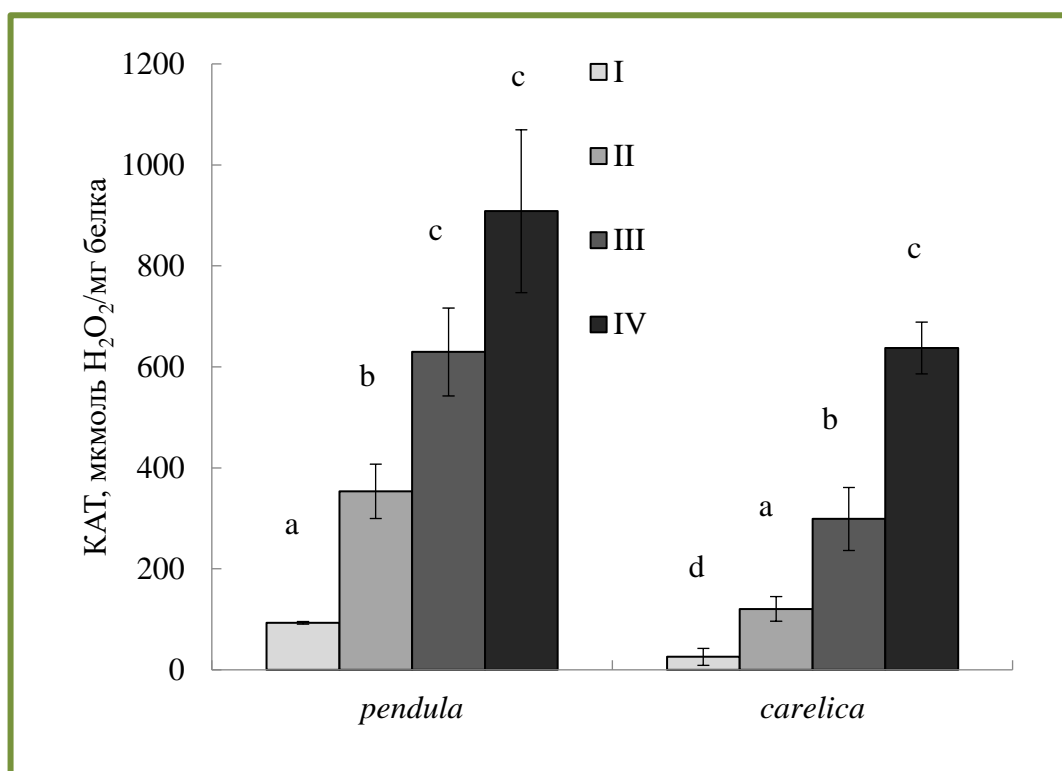


Рис. 38. Активность КАТ в листьях, отличающихся стадией развития (I-IV) ($n(I)=5$; $n(II)=8$; $n(III)=8$; $n(IV)=6$), у 10-месячных сеянцев *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. I стадия – лист 1-2 см, II стадия – лист 3-4 см, III стадия – лист 5-6 см, IV стадия – лист 7-8 см. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

У сеянцев *B. pendula* var. *pendula* она изменялась в диапазоне от 93 до 909, а у *B. pendula* var. *carelica* – от 26 до 638 мкмоль H_2O_2 /мг белка. В частности, у *B. pendula* var. *pendula* при переходе листа из первой стадии во вторую активность КАТ возрастала в 3.8 раза; между II и III стадиями она увеличивалась в 1.8 раза, а между III и IV стадиями значимо не изменялась. У сеянцев *B. pendula* var. *carelica* активность КАТ между стадиями развития листа I и II, II и III, III и IV возрастала в 4.7, 2.5 и 2.1 раза соответственно (рис. 38).

Сравнительный анализ полученных результатов позволил установить, что активность КАТ в листьях *B. pendula* var. *pendula* на всех стадиях развития, кроме IV, была значимо выше, чем у сеянцев *B. pendula* var. *carelica*. При этом увеличение каталазной активности от молодого к зрелому листу у *B. pendula* var. *carelica* происходило более динамично. В частности, активность фермента в листьях длиной 1-2 см, по сравнению с листьями длиной 7-8 см, у *B. pendula* var. *carelica* была ниже в 24.5 раз, а у *B. pendula* var. *pendula* – всего в 9.8 раза. При увеличении размеров листа отмеченная разница между *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* снижалась. Так на первой стадии активность КАТ у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* была выше, чем у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* в 3.6 раза, на второй стадии – в 2.9 раза, на третьей стадии – в 2.1 раза, а на четвертой стадии и вовсе значимо не отличалась.

Рассмотрим закономерности изменения пероксидазной активности. В результате проведенных измерений установлено, что у обеих изучаемых форм *B. pendula* пероксидазная активность в листьях убывала с увеличением длины листовой пластинки: у сеянцев *B. pendula* var. *pendula* $r = -0.56$ ($p = 0.015$), у сеянцев *B. pendula* var. *carelica* $r = -0.45$ ($p = 0.044$). У сеянцев *B. pendula* var. *pendula* она изменялась в диапазоне от 93 до 22 мкмоль ТГ/мг белка, а у *B. pendula* var. *carelica* – от 35 до 16 мкмоль ТГ/мг белка. В частности, у *B. pendula* var. *pendula* активность ПО значимо снижалась в 3 раза только при переходе от I стадии листа к III и в 4.2 раза от I стадии листа к IV, а у *B. pendula* var. *carelica* – только от I стадии к IV – в 2.2 раза (рис. 39). Остальные переходы между стадиями были не значимы.

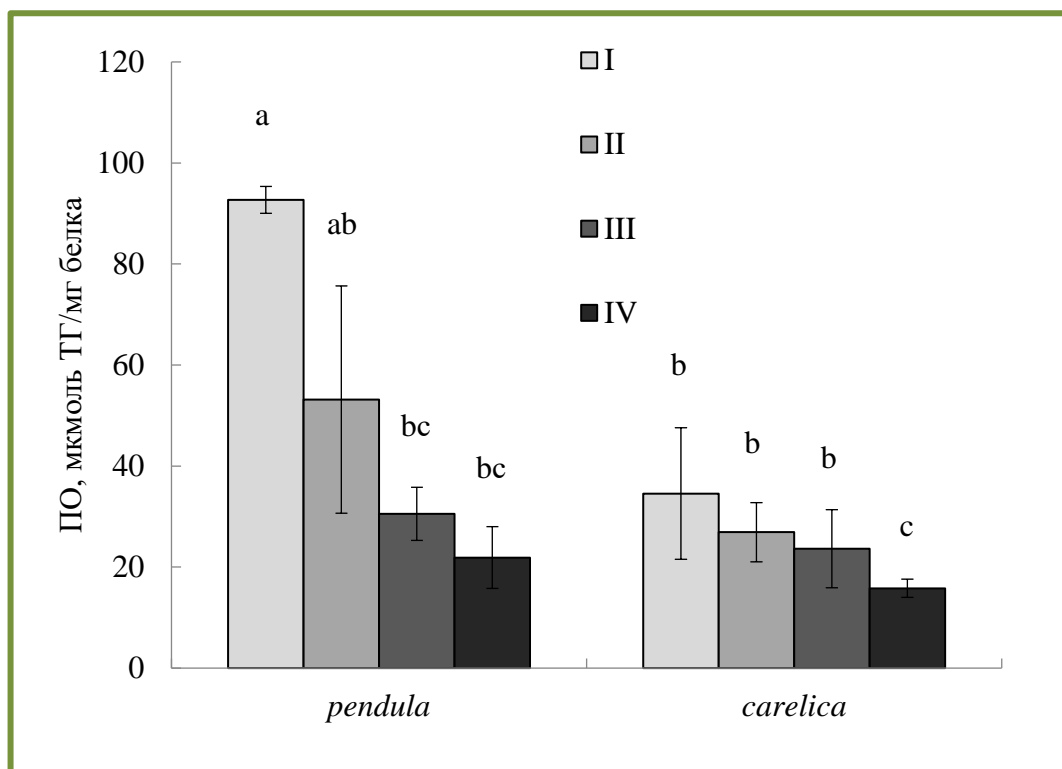


Рис. 39. Активность ПО в листьях, отличающихся стадией развития (I-IV) ($n(I)=5$; $n(II)=8$; $n(III)=8$; $n(IV)=6$), у 10-месячных сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica*. I стадия – лист 1-2 см, II стадия – лист 3-4 см, III стадия – лист 5-6 см, IV стадия – лист 7-8 см. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Активность ПО в листьях *V. pendula* var. *pendula* была значимо выше, чем у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* только на I стадии. Уменьшение пероксидазной активности от молодого к зрелому листу более динамично происходило, напротив, у сеянцев *V. pendula* var. *pendula*, по сравнению с активностью КАТ.

При увеличении размеров листа отмеченная разница между *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* снижалась, как и при изучении активности КАТ. Так на первой стадии активность ПО у сеянцев *V. pendula* var. *pendula* была значимо выше, чем у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* в 2.7 раза.

Анализируя полученные данные по активности КАТ и ПО в листьях сеянцев, можно заключить, что наилучшую индикаторную роль показала КАТ. Различия между изучаемыми формами *V. pendula* и стадиями развития листа по ее активности в большинстве сравниваемых пар достоверные. У многих растений активности ферментов АОС возрастают от молодого листа к зрелому (Prochazkova

et al., 2001), что связано с увеличением уровня дыхания и затрат энергии на метаболизм (Мазей и др., 2009; Sairam et al., 2003). Известно, что на ранних этапах онтогенеза, особенно важна роль КАТ (Willekens et al., 1995). Высокие показатели активности этого фермента наблюдали именно в молодых жизнеспособных органах и тканях растений (Карасев и др., 2015).

В результате нашего исследования установлено, что у сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* возрастание активности КАТ коррелировало с увеличением длины листа. С одной стороны, это может свидетельствовать об интенсификации процессов дыхания и фотосинтеза, а с другой стороны, логично связано с накоплением АФК, содержание которых увеличивается по мере старения листа.

Определение каталазной активности в листовом аппарате имеет особое значение с точки зрения функционирования листа в целостной системе ДАО. На уровне целого организма ДАБ регулируется за счет усиления потребления акцепторами ассимилятов на разных уровнях структурной организации (Климов, 1987, 1997; Климов и др., 1990). Акцепторные зоны (зоны роста или запасаения), в нашем случае – это формирующиеся ствольные ткани, получают ассимиляты, которые образовались в листе в ходе фотосинтеза и дыхания (Шелякин и др., 2016).

Тот факт, что разница в активности каталазы между I и IV стадиями развития листа у сеянцев *V. pendula* var. *carelica* значительно превышает таковую у сеянцев *V. pendula* var. *pendula*, может свидетельствовать о более интенсивном протекании у нее метаболических процессов в связи с донорной функцией листа. Визуально изученные сеянцы *V. pendula* var. *carelica* имели больше листьев, особенно молодых, по сравнению с сеянцами *V. pendula* var. *pendula*. К тому же онтогенез листа у *V. pendula* var. *carelica* протекал быстрее, чем у *V. pendula* var. *pendula*. У сеянцев *V. pendula* var. *pendula* и *V. pendula* var. *carelica* в возрасте нескольких месяцев в стебле выявлены различия моделей распределения активности СС и АпИнв, главных ферментов утилизации сахарозы (Мощенская, 2016). Так, во флоэме 2-летних сеянцев *V. pendula* var. *carelica*, по сравнению с *V. pendula* var. *pendula*, содержание сахарозы было выше (Галибина и др., 2014).

Отметим, что в растениях связь между образованием АФК и фотосинтетическим метаболизмом очень важна (Rossel et al., 2002). Активная

фотосинтетическая деятельность в листьях может индуцировать аккумуляцию растворимых сахаров и АФК. Процессы старения листа связаны с временными высокими уровнями растворимых сахаров, сопровождающих высокие темпы окислительных реакций (Couée et al., 2006; Ramel et al., 2009).

Таким образом, *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* на начальных стадиях онтогенеза различаются по активности ПО и, особенно, по активности КАТ в листовом аппарате. Данные закономерности могут лечь в основу ферментативной диагностики признака узорчатости древесины у *B. pendula* в раннем онтогенезе, когда внешние признаки отсутствуют. Высказано предположение, что лист может использоваться как орган первичной диагностики для выявления предрасположенности к возникновению структурных аномалий у *B. pendula*. Однако особенно стоит обратить внимание на то, что сравнивать активность ферментов в листовом аппарате представляется возможным только, если лист находится на одной стадии развития.

3.5.2. Активность АОС в листовом аппарате у взрослых безузорчатых и узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*

Ранее было экспериментально показано и обосновано то, что листовой аппарат, участвующий в формировании ДАО с тканями ствола, также отражает различный метаболический статус сеянцев *B. pendula* двух форм – *B. pendula* var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica*. Поэтому встал вопрос, сохраняется ли данная метаболическая закономерность в листовом аппарате у взрослых растений?

Для ответа на этот вопрос в листьях с укороченных побегов (брахибластов) у 25-летних безузорчатых и узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* в период активного роста изучили активность всего комплекса исследуемых ферментов АОС. В отличие от ауксибластов, которые вынуждены тратить большую часть ресурсов на собственный рост, брахибласты имеют быстрые скорости листообразования. Их основная их роль заключается в обеспечении ассимилятами вторичного камбиального роста ветвей и тканей ствола (Николаева, Новицкая, 2007; Nikolaeva, Novitskaya, 2009). Узорчатые растения *B. pendula* var. *carelica* при исследовании не разделяли по баллам узорчатости.

Активность СОД у безузорчатых растений составила 8.1 усл. ед./мг белка, при этом у узорчатых 6.5 усл. ед./мг белка. Активность КАТ имела значения 573 и 457 мкмоль H_2O_2 /мг белка у безузорчатых и узорчатых растений соответственно. Активность ПО составила 4.3 и 2.5 мкмоль ТГ/мг белка у безузорчатых и узорчатых растений соответственно. Активность ПФО у узорчатых растений (2149 усл. ед./мг белка) была примерно в 2 раза выше, чем у безузорчатых растений (1049 усл. ед./мг белка) (рис. 40).

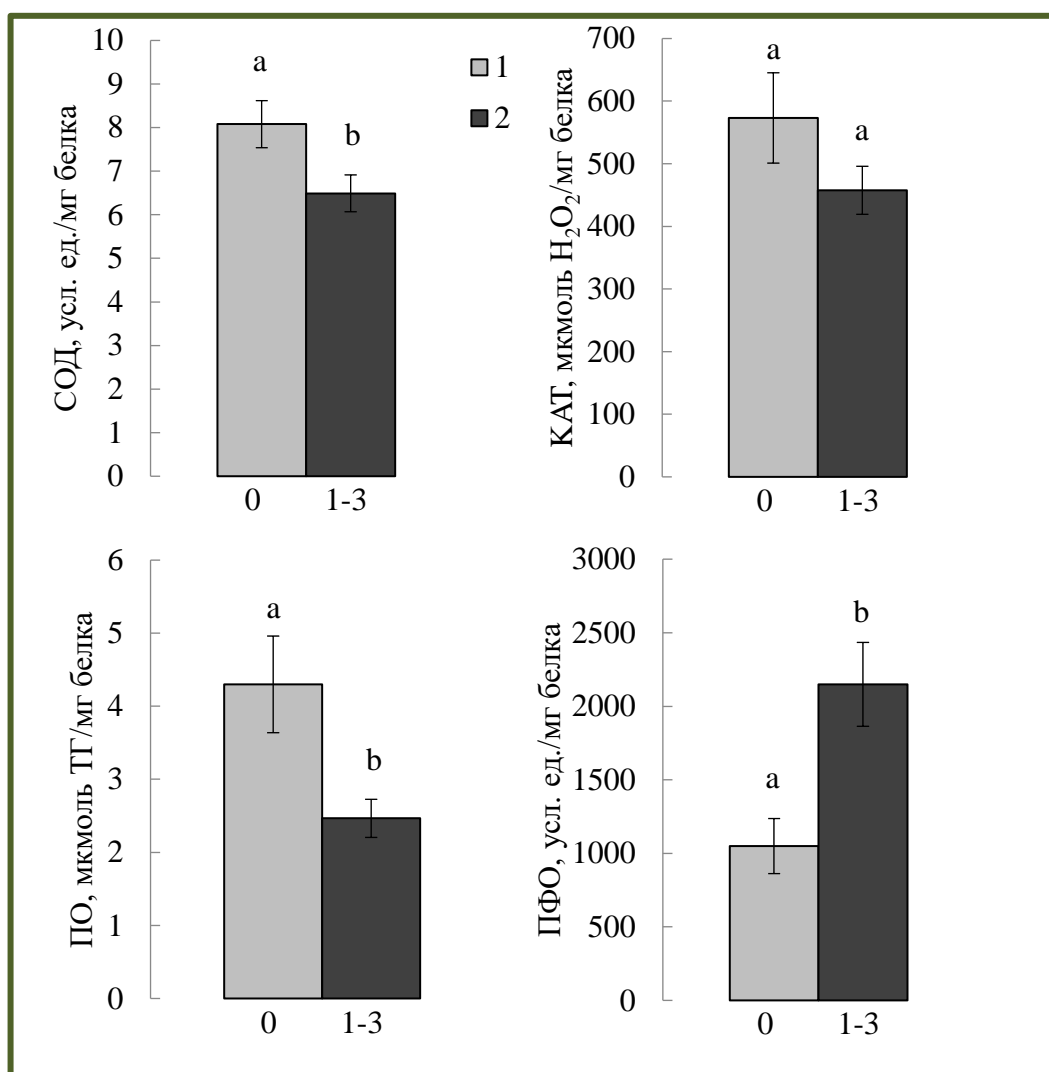


Рис. 40. Активность СОД, КАТ, ПО и ПФО в листьях брахибластов у безузорчатых (0 баллов) (1) (n=25) и узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica* (1–3 балла) (2) (n=45) в период камбиального роста. Баллы указаны по оси абсцисс. Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Проведенное исследование активности ферментов в листовом аппарате выявило достоверные отличия в активности СОД, ПО и ПФО в листьях с укороченных побегов у узорчатых и безузорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*.

Полученные данные показали, что если у 3-4 месячных сеянцев снижение активности СОД и ПО и некоторое повышение ПФО наблюдалось лишь на уровне тенденции в изменении средних значений (рис. 34), то у взрослых растений эти отличия становятся явными. При рассмотрении активности ПО на разных стадиях листа достоверная разница была отмечена только у самых молодых листьев на I стадии развития (рис. 39).

У взрослых растений наблюдаются те же биохимические закономерности в активности ферментов АОС в листовом аппарате, что и у сеянцев. Кроме индикаторной роли ПО, которая имеет более низкие значения в листьях брахибластов у узорчатых растений, такую же зависимость имеет и СОД, являющаяся пусковым механизмом для образования перекиси водорода, которая в свою очередь нейтрализуется ПО и КАТ. Для КАТ отмечена тенденция на понижение активности в листьях с укороченных побегов у узорчатых растений *B. pendula* var. *carelica*.

Таким образом, у взрослых безузорчатых и узорчатых растений B. pendula var. carelica активность СОД, ПО и ПФО в листьях брахибластов, которые связаны ДАО с тканями ствола, имеет индикаторную роль. Развитие структурных аномалий связано с понижением активности СОД и ПО и повышением ПФО у узорчатых растений B. pendula var. carelica.

3.6. Участие ферментов АОС в формировании косослойной древесины у *P. sylvestris*

Понимание процессов ксилогенеза необходимо как с научной, так и с практической точки зрения. Результаты исследования показали, что формирование узорчатой древесины у *B. pendula* var. *carelica* на разных этапах онтогенеза сопровождалось изменением активности некоторых ферментов АОС. Однако узорчатость – это лишь частный случай аномального ксилогенеза у древесных растений.

Чтобы понять, насколько универсальными могут являться обнаруженные диагностические свойства изученных ферментов АОС, было проведено исследование их активности при формировании косослойной древесины у *P. sylvestris*. На рисунке 41 представлены фотографии окоренных частей ствола деревьев *P. sylvestris* без признаков аномалий и с развитой косослойной древесиной.

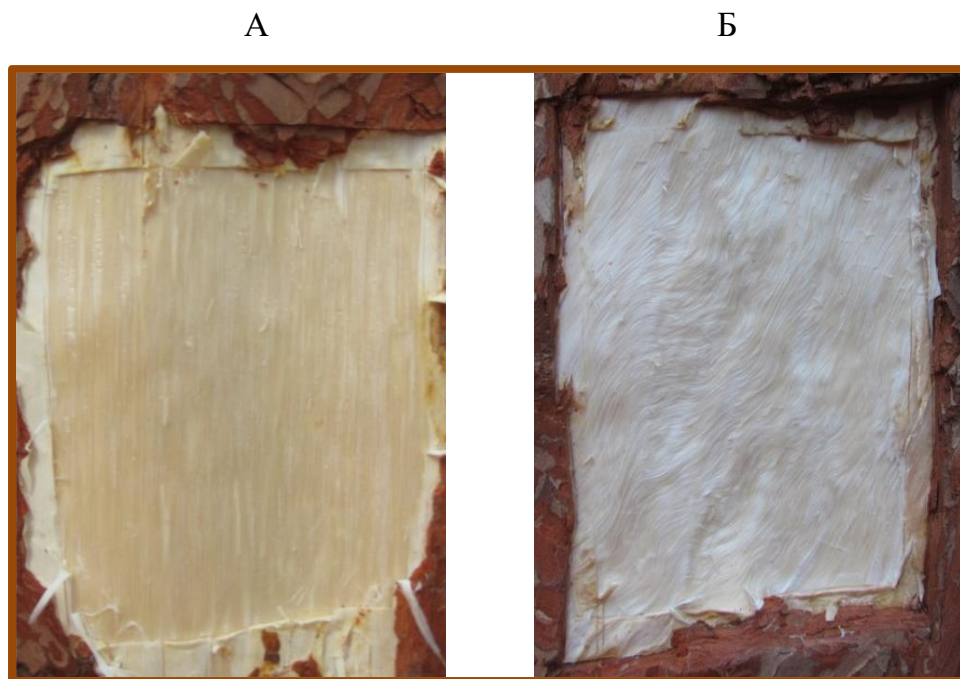


Рис. 41. Деревья *P. sylvestris* с прямослойной (А) и косослойной (Б) древесиной.

В ксилеме активность СОД значимо не отличалась у прямослойных и косослойных растений *P. sylvestris*, значения ее достигали 5.4 и 4.2 усл. ед./мг белка. Активность КАТ была соответственно 441 и 512 мкмоль H_2O_2 /мг белка у растений с нормальной и аномальной древесиной. Активность основных ферментов фенольного метаболизма была выше у растений, которые проявляли признаки косослойной древесины. Так ПО у косослойных растений повышалась по сравнению с растениями без признаков структурных аномалий и составила 0.8 и 3.2 мкмоль ТГ/мг белка соответственно, а ПФО была значимо выше у растений с косослойной древесиной в 1.6 раза и достигла значений 80 и 131 усл. ед.*1000/мг белка соответственно (рис. 42).

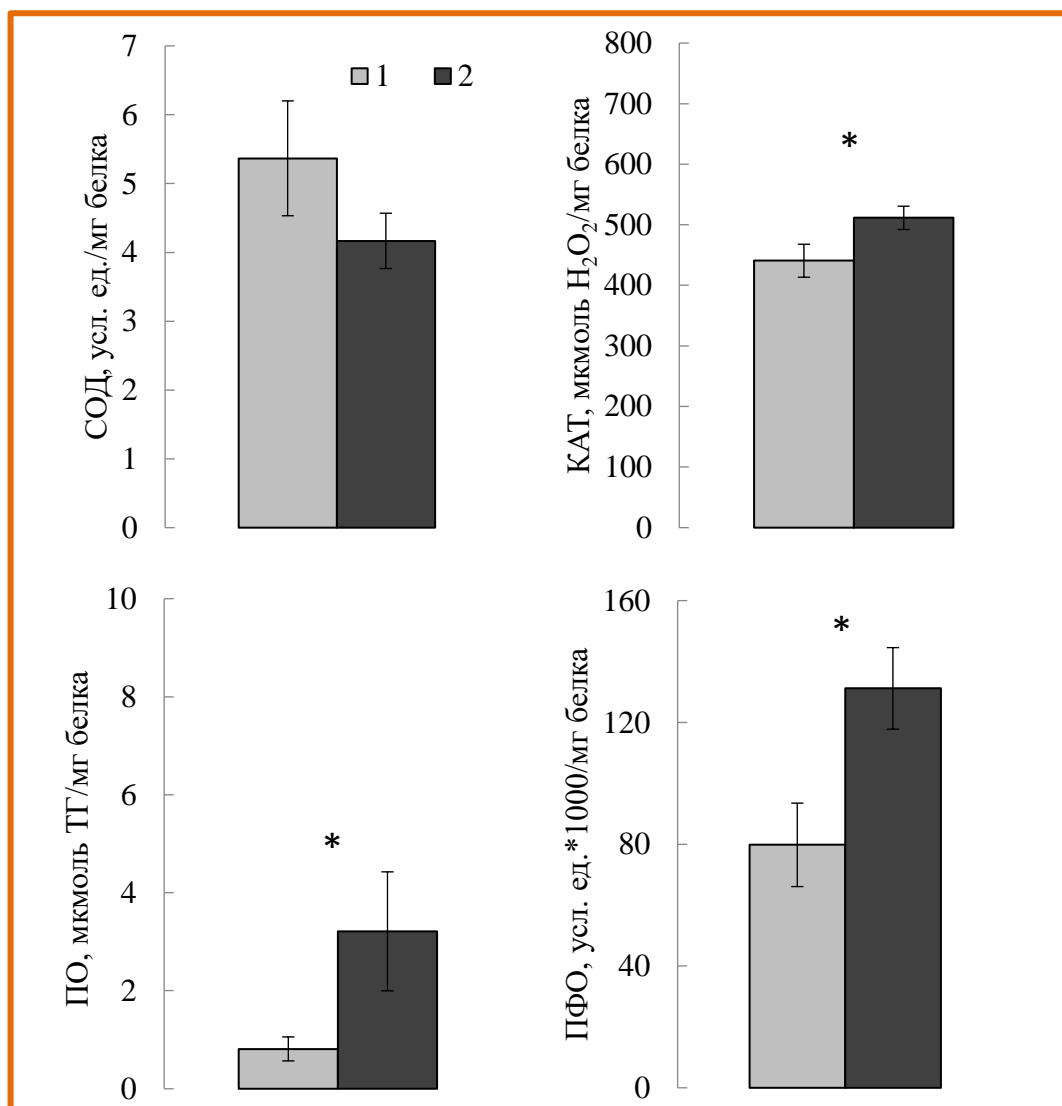


Рис. 42. Активность СОД, КАТ, ПО и ПФО в ксилеме у растений *P. sylvestris* с прямослойной (1) (n=30) и косослойной (2) (n=35) древесиной. Статистическая значимость различий при $p < 0.05$ отмечена символом (*).

Во флоэме активность СОД также значимо не отличалась у прямослойных и косослойных растений *P. sylvestris*, значения достигали 5.2 и 5.7 усл. ед./мг белка. Активность КАТ была соответственно 639 и 672 мкмоль H₂O₂/мг белка у растений с нормальной и аномальной древесиной. Активность ПО во флоэме также значимо не отличалась. Так ПО у прямослойных и косослойных растений составила 46 и 45 мкмоль ТГ/мг белка соответственно, а ПФО была значимо выше у растений с признаками структурных аномалий в 1.6 раза по сравнению с прямослойными растениями: значения составили 39 и 64 усл. ед.*1000/мг белка соответственно (рис. 43).

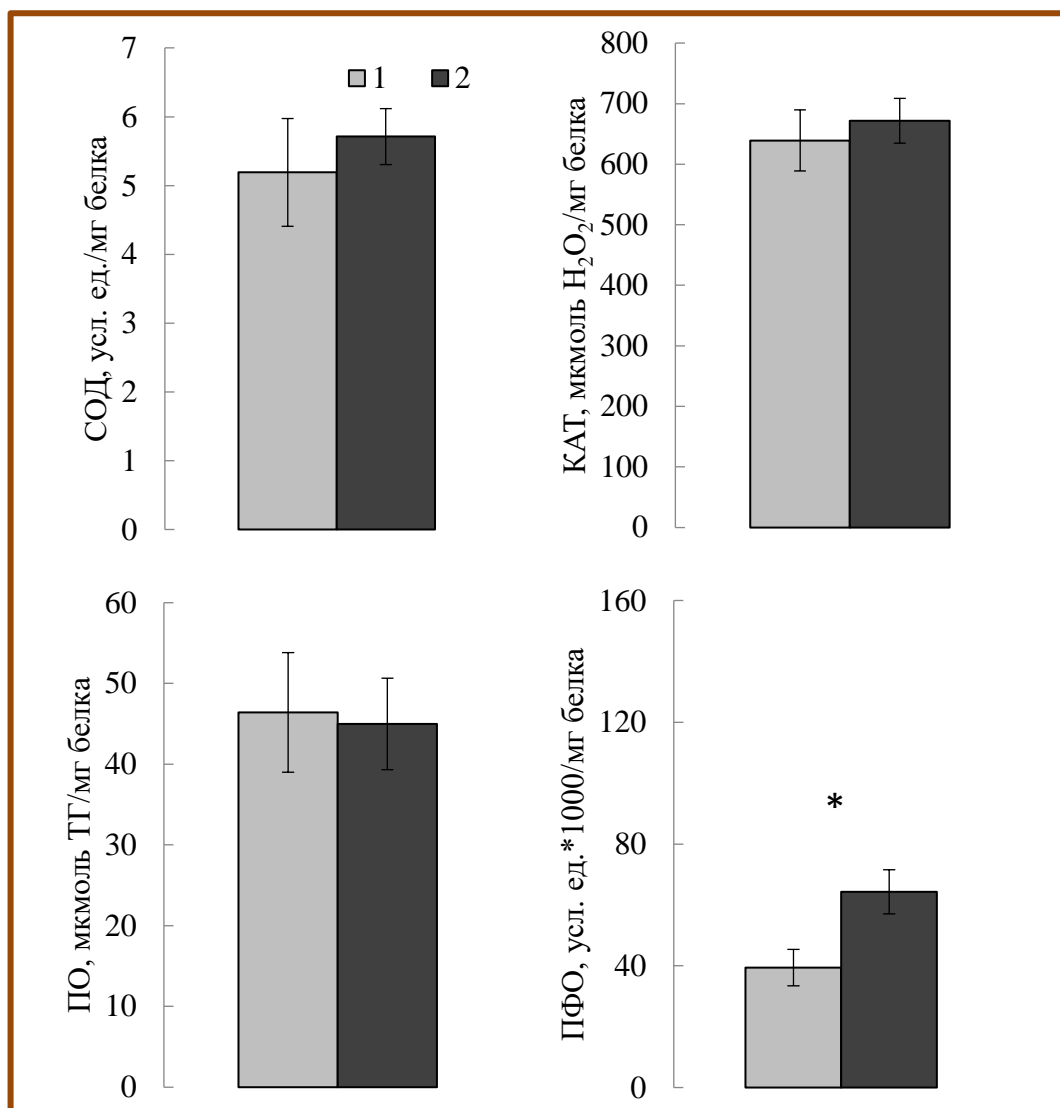


Рис. 43. Активность СОД, КАТ, ПО и ПФО во флоэме у растений *P. sylvestris* с прямослойной (1) (n=30) и косослойной (2) (n=35) древесиной. Статистическая значимость различий при $p < 0.05$ отмечена символом (*).

При определении содержания фенолов в исследуемых образцах было обнаружено, что их содержание во флоэме больше в 29 раз по сравнению с ксилемой. Содержание фенолов в ксилеме у растений *P. sylvestris* составило 0.12 %, а во флоэме 3.5 % (рис. 44).

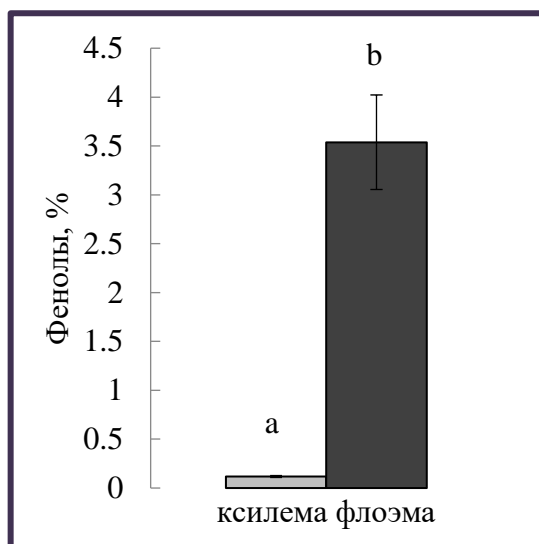


Рис. 44. Содержание фенолов у растений *P. sylvestris* в ксилеме (n=65) и во флоэме (n=65). Латинскими буквами указаны статистически значимые различия при $p < 0.05$.

Для косослойной древесины *P. sylvestris* биохимическими индикаторами проявили себя активности КАТ, ПО и ПФО в ксилеме и ПФО во флоэме. Отметим, что прямослойные деревья имели среднюю ширину годичного кольца больше, чем деревья с выраженным косослоем, что говорит о большем приросте (рис. 45).

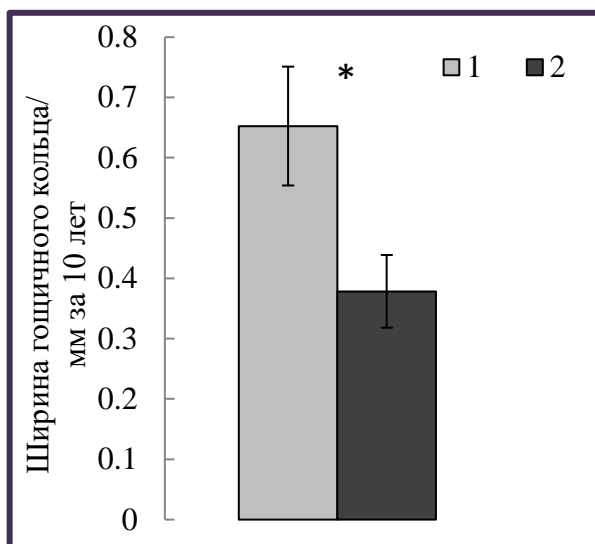


Рис. 45. Средняя ширина годичного кольца (за 10 лет) у растений *P. sylvestris* с прямослойной (1) (n=65) и косослойной (2) (n=65) древесиной. Статистическая значимость различий при $p < 0.05$ отмечена символом (*).

Можно предположить, что у деревьев без признаков аномалий интенсивнее протекали ростовые процессы, а у косослойных растений преобладали процессы вторичного метаболизма.

Исследования ферментов, утилизирующих сахарозу (СС и АПИИв), которые также были проведены в растительных образцах *P. sylvestris* позволили обнаружить некоторые отличия в их активности у деревьев с прямослойной древесиной и наличием косослоя (рис. 46).

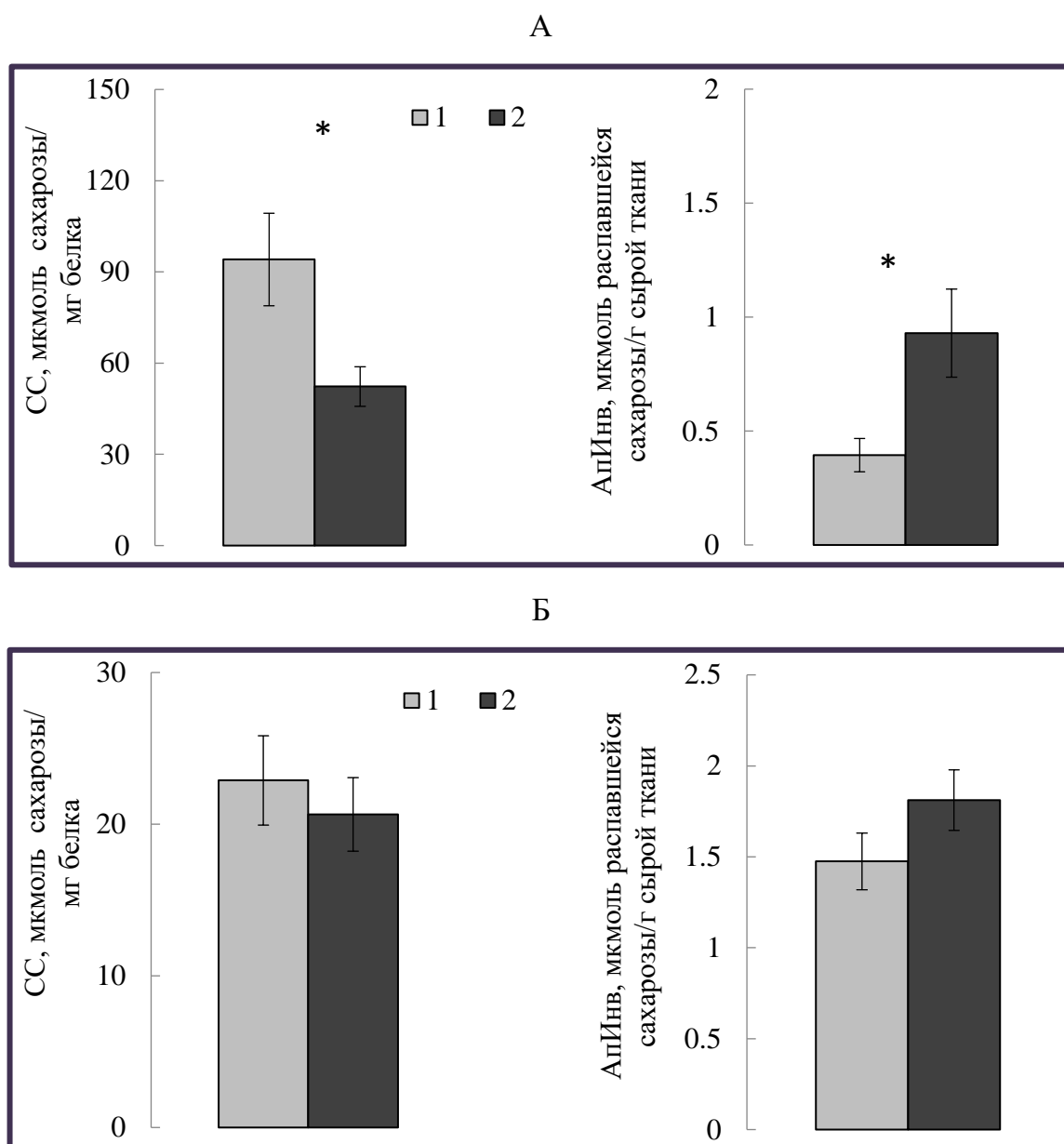


Рис. 46. Активность СС и АПИИв в ксилеме у растений *P. sylvestris* с прямослойной (1) (n=30) и косослойной (2) (n=35) древесиной в ксилеме (А) и во флоэме (Б). Статистическая значимость различий при $p < 0.05$ отмечена символом (*).

У растений с признаками косослоя в ксилеме ниже активность СС (52 мкмоль сахарозы/мг белка) по сравнению с таковой у растений с прямослойной древесиной (94 мкмоль сахарозы/мг белка), что говорит об уменьшении роли СС в утилизации сахарозы. При этом у косослойных растений наблюдается более высокая метаболизация сахарозы в апопласте, активность АпИндв 0.9 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани против 0.4 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани у прямослойных растений (рис. 46 А).

Во флоэме можно отметить те же тенденции (рис. 46 Б), однако различия не значимы. Возрастание при формировании косослойной древесины сосны метаболизации сахарозы в апопласте и активности ПО и ПФО, схоже с таковым при формировании узорчатой древесины. Можно предположить, что альтернативный путь метаболизации сахарозы, являющийся индикатором аномального ксилогенеза у растений *B. pendula* var. *carelica* и влекущий за собой перестройку работы ферментов АОС, имеет те же биохимические закономерности и при образовании косослойной древесины у *P. sylvestris*.

В тканях ствола между сосной и березой выявлены некоторые отличия в работе ферментов АОС. Во-первых, у *P. sylvestris* наблюдается более высокая активность СОД как в ксилеме, так и во флоэме (табл. 6). Вероятно, высокая активность СОД, приводящая к образованию большего количества перекиси водорода, является причиной большей активности КАТ у сосны по сравнению с березой.

При анализе взаимосвязи между активностями СОД и КАТ в совокупности у разных пород была обнаружена корреляция: как в тканях ксилемы ($r = 0.93$; $p = 0.0072$), так и в тканях флоэмы ($r = 0.96$; $p < 0.0028$). Это еще раз подтверждает известные данные о том, что работа КАТ значительно зависит от того количества перекиси водорода, которое образуется в супероксиддисмутазной реакции. Причиной корреляции между активностью КАТ и СОД, которые даже могут быть локализованы в разных частях клетки может быть переключение потока электронов (Колупаев, 2007).

Таблица 6. Средние значения активностей СОД, КАТ, ПО и ПФО у растений *B. pendula* var. *carelica* (безузорчатых и с разной степенью узорчатости) и *P. sylvestris* (с прямослойной и косослойной древесиной) в ксилеме (А) и во флоэме (Б) в период активного вторичного утолщения клеточных стенок в ксилеме.

А

	СОД, усл. ед. /мг белка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /мг белка	ПО, мкмоль ТГ /мг белка	ПФО, усл. ед. /мг белка
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (безузорчатые)	0.19	188	46	158
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (1-3 балл узорчатости)	0.30-0.89	225-293	135-398	324-724
<i>P. sylvestris</i> (прямослойные)	5.4	441	0.8	80*1000
<i>P. sylvestris</i> (косослойные)	4.2	512	3.2	131*1000

Б

	СОД, усл. ед. /мг белка	КАТ, мкмоль H ₂ O ₂ /мг белка	ПО, мкмоль ТГ /мг белка	ПФО, усл. ед. /мг белка
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (безузорчатые)	1.8	334	95	428
<i>B. pendula</i> var. <i>carelica</i> (1-3 балл узорчатости)	2.8-2.5	345-368	581-1382	1168-2438
<i>P. sylvestris</i> (прямослойные)	5.2	639	46	39*1000
<i>P. sylvestris</i> (косослойные)	5.7	672	45	64*1000

Активность ПО у сосны, по сравнению с березой, в сотни раз меньше: как во флоэме, так в ксилеме (табл. 6). Нейтрализация основного пула перекиси водорода КАТ – это второе отличие сосны от березы. Поскольку ПО могут нейтрализовывать перекись, недоступную для КАТ (константа Михаэлиса у КАТ намного более высокая, чем у ПО (Mittler, Zilinskas, 1991; Creissen et al., 1994; König et al., 2002), можно предположить, что меньшая активность КАТ в тканях узорчатых растений *B. pendula* (разделы 3.2., 3.3.2.) является следствием более низкого у них содержания перекиси водорода.

Отметим, что переключение на более интенсивный ПО-путь может контролироваться активностью АпИнв после включения образующихся гексоз в реакции цикла Кребса и ПФЦ с последующим образованием АФК и фенольных соединений. Так, активность АпИнв у узорчатой *B. pendula* var. *carelica* в ксилеме находилась в диапазоне 0.8 – 4.1 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой ткани (рис. 30, Галибина, 2018), в то время у *P. sylvestris* ее значения не превышали 0.9 мкмоль распавшейся сахарозы/г сырой (рис. 46 А).

Вероятно, в этом случае перекись водорода может быть сигнальной молекулой, которая обеспечивает взаимосвязь ферментов АОС и АпИнв, в том числе, через уровень экспрессии *PR*-генов (Bi et al., 1995; Pellinen et al., 2002), кодирующих, среди прочего, и ПО (Kinkema et al., 2000; Van Loon et al., 2006; Almagro et al., 2009). На трансгенных растениях *Populus tremula* L. × *P. alba* L. было показано, что у растений со сверхэкспрессией генов, кодирующих АпИнв, увеличивается уровень экспрессии *PR*-генов (Zhang et al., 2014).

Еще одна отличительная особенность тканей ствола у *P. sylvestris* – это высокая активность ПФО, значения ее превосходят таковую у березы в сотни раз (табл. 6). Высокая активность ПФО может быть связана, с одной стороны, с накоплением АФК (Thiryarong et al., 2004; Mayer, 2006) и изменением окислительно-восстановительного статуса (Webb et al., 2014). Известно, что ПФО может участвовать в буферном распределении кислорода (Vaughn, Duke, 1984). С другой стороны, высокая активность фермента может быть связана с увеличением субстратов фенольной природы, таких как кофейная кислота и ее производные; производные пирокатехина или дигидроксифенилаланина; галловая кислота и др. (Constabel et al., 1996; Guyot et al., 1996; Shin et al. 1997; Jimenez, Garcia-Carmona,

1999; Li, Steffens, 2002; Melo et al., 2006; Wuyts et al., 2006). Накопление этих компонентов обычно наблюдается при формировании ядровой древесины, некоторые из них, такие как хлорогеновая кислота, являются предшественниками лигнина (Humphreys, Chapple, 2002).

Вероятно, высокая активность ПФО может свидетельствовать об интенсивных процессах образования ядровой древесины у *P. sylvestris*. Кроме того, содержание лигнина у *P. sylvestris*, составившее, в среднем, 24 % (отличий между прямослойной и косослойной древесиной не обнаружено) превышает таковое у *B. pendula* var. *carelica* (18.7 % в среднем). Вероятно, этому способствуют реакции, запускаемые более высокой активностью СОД, которая участвует в процессе генерации перекиси водорода и последующей лигнификации (Karpinska et al., 2001). Известно, что гибридный *Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx. с увеличенными внеклеточными концентрациями перекиси водорода вследствие экспрессии СОД был более лигнифицирован (Srivastava et al., 2007). А образующаяся перекись водорода является контролирующим фактором в лигнификации (Gabaldón et al., 2005). Так, при изъятии перекиси водорода из формирующейся культуры у *P. abies* образование лигнина замедлялось или прекращалось (Kärkönen et al., 2002).

Таким образом, метаболические закономерности, обнаруженные при исследовании комплекса ферментов АОС при формировании косослойной древесины, не противоречат тем, что были обнаружены при формировании структурных аномалий у *B. pendula* var. *carelica*. Повышение активности КАТ, ПО и ПФО в ксилеме и ПФО во флоэме при образовании косослойной древесины может служить биохимическим маркером развития данного вида структурных аномалий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило выявить закономерности в изменении активности ферментов АОС при разных сценариях ксилогенеза у древесных растений. Объектами исследования были две формы *B. pendula* – var. *pendula*, у которой формируется типичная для вида прямослойная древесина, и var. *carelica*, у которой в пределах одного дерева, наряду с формированием нормальной по строению древесины, происходит образование узорчатой древесины.

Показано, что у взрослых растений изучаемых форм различается путь утилизации перекиси водорода: у растений *B. pendula* var. *pendula* выше активность КАТ, а у растений с проявившимися признаками структурных аномалий – выше активность ПО. Вероятно, более низкое содержание перекиси водорода в тканях узорчатых растений может быть причиной меньшей у них активности КАТ, у которой сродство к перекиси водорода ниже, чем у ПО. Выявленные между двумя формами *B. pendula* отличия в утилизации перекиси водорода наблюдаются и в пределах одного дерева *B. pendula* var. *carelica*: в безузорчатых участках ствола наблюдается тенденция на повышение активности КАТ, в узорчатых участках того же ствола – выше активность ПО.

Исследования комплекса ферментов АОС, проведенные в период активного камбиального роста, показали, что увеличение степени узорчатости древесины у *B. pendula* var. *carelica* коррелирует с возрастанием активности СОД, КАТ, ПО и ПФО. Между изученными ферментами выявлена высокая степень корреляции, что свидетельствует о взаимосвязанной каскадной работе ферментов АОС при изменении сценария ксилогенеза. Высказано предположение, что причиной увеличения активности ферментов АОС является преобладание в узорчатых участках апопластного пути метаболизма сахарозы. Образующиеся в результате него гексозы через гликолиз, пентозофосфатный путь, шикиматный путь используются для синтеза запасных компонентов, в том числе фенольной природы, которые, в свою очередь, могут быть субстратами ПО и ПФО.

Важным результатом проведенного исследования является обнаружение выявленных во взрослом состоянии закономерностей в раннем онтогенезе. Уже в возрасте нескольких месяцев, когда видимые признаки узорчатости древесины отсутствуют, в стебле сеянцев *B. pendula* var. *carelica* наблюдались более высокие

активности ПО и ПФО, по сравнению с таковыми у *B. pendula* var. *pendula*. Показано, что активность изучаемых ферментов АОС в листе у сеянцев может иметь диагностическое значение. Предложено рассматривать лист в качестве органа ранней диагностики структурных аномалий.

Результаты, полученные в ходе изучения *B. pendula* var. *carelica*, использовали в качестве фундаментальной основы для выявления механизмов развития структурных аномалий осевых органов у *P. sylvestris*. Исследование активности ферментов АОС при образовании косослойной древесины у *P. sylvestris* показало, что возрастание активности ПО и ПФО, на фоне увеличения метаболизма сахарозы в апопласте, схоже с таковым при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica*.

Таким образом, формирование структурных аномалий древесины тесно сопряжено с процессами вторичного метаболизма у древесного растения, что отражается в изменении активности ферментов АОС. Полученные данные показали возможность использовать ферменты АОС в качестве биохимических маркеров разных сценариев ксилогенеза.

ВЫВОДЫ

1. У растений *B. pendula* var. *carelica* в местах формирования структурных аномалий в течение всего сезона выше активность пероксидазы и ниже активность каталазы, по сравнению с таковой у растений *B. pendula* var. *pendula*.
2. Активность пероксидазы и полифенолоксидазы, участвующих в метаболизации фенольных компонентов, в 3.7 и 2.3 раза соответственно выше в зонах формирования узорчатой древесины (высокое содержание паренхимных клеток), по сравнению с зонами формирования нормальной по строению древесины (структурную основу составляют сосуды и волокна).
3. В период камбиального роста активность супероксиддисмутазы, каталазы, пероксидазы и полифенолоксидазы коррелирует с возрастанием степени узорчатости древесины, что позволяет считать ферменты АОС биохимическими маркерами структурных аномалий ствола.
4. Активность ферментов АОС в стебле имеет диагностическое значение для обнаружения аномального ксилогенеза у *B. pendula* var. *carelica* уже на самых ранних этапах онтогенеза.
5. Лист на определенных стадиях развития может рассматриваться как орган первичной диагностики формирования узорчатой древесины у *B. pendula*.
6. При формировании косослойной древесины у *P. sylvestris* наблюдаются те же закономерности, что и при формировании узорчатой древесины *B. pendula* var. *carelica*, – возрастание активности пероксидазы и полифенолоксидазы на фоне увеличения метаболизации сахарозы в апопласте.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аверьянов, А. А., Лапикова, В. П. Генерация кислородных радикалов фенольными соединениями в связи с иммунитетом растений. Кислородные радикалы в химии, биологии и медицине. Рига: Рижский медицинский институт, 1988. 203-222.
2. Алехина, Н. Д., Балнокин, Ю. В., Гавриленко, В. Ф., Жигалова, Т. В., Мейчик, Н. Р., Носов, А. М., Полесская, О. Г., Харитонашвили, Е. В., Чуб, В. В. Физиология растений. М.: Академия, 2005. 640 с.
3. Андреева, В. А. Фермент пероксидаза: Участие в защитном механизме растений (от вирусной инфекции). М.: Наука, 1991. 129 с.
4. Антонова, Г. Ф., Стасова, В. В. (2006). Сезонное развитие флоэмы в стволах сосны обыкновенной. *Онтогенез*, 37(5), 368-383.
5. Антонова, Г. Ф., Стасова, В. В. (2008). Сезонное развитие флоэмы в стволах лиственницы сибирской. *Онтогенез*, 39(4), 259-272.
6. Бараненко, В. В. (2006). Супероксиддисмутаза в клетках растений. *Цитология*, 48(6), 465-474.
7. Барильская, Л. А. (1978). Структурный анализ узорчатой древесины карельской березы. *Ботанический журнал*, 63(6), 805-811.
8. Вакин, А. Т., Полубояринов, О. И., Соловьев, В. А. Альбом пороков древесины. М.: Лесная промышленность, 1980. 112 с.
9. Васильева, Г. Г., Миронова, Н. В., Лузова, Г. Б., Глянько, А. К. (2004). Влияние инокуляции азотфиксирующими бактериями разной эффективности и совместимости на содержание перекиси водорода и активность каталазы в проростках гороха. *Агрехимия*, 6, 68-73.
10. Ветчинникова, Л. В. Карельская береза и другие редкие представители рода *Betula* L. М.: Наука. 2005. 269 с.
11. Вольнец, А. П. Фенольные соединения в жизнедеятельности растений. Минск: Беларуская навука, 2013. 283 с.
12. Газарян, И. Г., Хушпульян, Д. М., Тишков, В. И. (2006). Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений. *Успехи биологической химии*, 46, 303-322.

13. Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Софронова, И. Н. (2012). Динамика сахаров в тканях ствола *Betula pendula* (*Betulaceae*) при выходе из зимнего покоя. *Растительные ресурсы*, 48(4), 554-564.
14. Галибина, Н. А., Целищева, Ю. Л., Андреев, В. П., Софронова, И. Н., Никерова, М. (2013). Активность пероксидазы в органах и тканях деревьев березы повислой. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета*, 133(4), 7-13.
15. Галибина, Н. А., Терехова, Е. Н. (2014). Физико-химические свойства клеточных стенок тканей ствола деревьев *Betula pendula* Roth. *Ученые записки Петрозаводского государственного университета. Серия Естественные и технические науки*. 141(4), 19-25.
16. Галибина, Н. А., Терехова, Е. Н., Новицкая, Л. Л., Софронова, И. Н. (2014). Динамика неструктурных углеводов в органах и тканях двухлетних сеянцев *Betula pendula* и *Betula pubescens* в период вегетации. *Труды Карельского научного центра Российской академии наук, Серия Экспериментальная биология*, 5, 108–116.
17. Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Красавина, М. С., Мощенская, Ю. Л. (2015а). Активность сахарозсинтазы в тканях ствола карельской березы в период камбиального роста. *Физиология растений*, 62(3), 410-410.
18. Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Красавина, М. С., Мощенская, Ю. Л. (2015б). Активность инвертазы в тканях ствола карельской березы. *Физиология растений*, 62(6), 804-804.
19. Галибина, Н. А., Мошкина, Е. В., Никерова, К. М., Мощенская, Ю. Л., Знаменский, С. Р. (2016а). Активность пероксидазы как индикатор степени узорчатости древесины карельской березы. *Лесоведение*, 4, 294–304.
20. Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Никерова, К. М. (2016б). Избыток экзогенных нитратов подавляет формирование аномальной древесины у карельской березы. *Онтогенез*, 47(2), 83-91.
21. Галибина, Н. А., Никерова, К. М. Способ диагностики узорчатой текстуры древесины карельской березы: Пат. 2596013, № 2015114510/13; Заявл. 17.04.2015, Опубл. 27.08.2016, Бюл. № 24.
22. Галибина, Н. А. Эндогенные механизмы регуляции ксилогенеза у древесных

- растений на примере двух форм березы повислой: автореф. дис... д-ра биол. наук: 03.01.05 - физиология и биохимия растений. Санкт-Петербург, 2018. 48 с.
23. Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Никерова, К. М., Мощенская, Ю. Л., Бородина, М. Н., Софронова, И. Н. (2019а). Регуляция активности апопластной инвертазы в камбиальной зоне карельской березы. *Онтогенез*, 50(1), 53-64.
24. Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Никерова, К. М. (2019б). Донорно-акцепторные отношения органов и тканей березы повислой при альтернативных сценариях ксилогенеза. *Физиология растений*, 66(2), 128-136.
25. Гамалей, И. А., Клюбин, И. В., Арнаутова, И. П., Кирпичникова, К. М. (1999). Пострецепторное образование активных форм кислорода в клетках, не являющихся профессиональными фагоцитами. *Цитология*, 41(5), 394-399.
26. Гарифзянов, А. Р., Жуков, Н. Н., Иванищев, В. В. (2011). Образование и физиологические реакции активных форм кислорода в клетках растений. *Современные проблемы науки и образования*, 2. URL: www.science-education.ru/96-4600.
27. Гелес, И. С. Древесная биомасса и основы экологически приемлемых технологий ее химико-механической переработки. Петрозаводск: Карельский научный центр РАН, 2001. 383 с.
28. Гольдштейн, Н. И. (2002). Активные формы кислорода как жизненно необходимые компоненты воздушной среды. *Биохимия*, 67(2), 194-204.
29. Горшкова, Т. А. Растительная клеточная стенка как динамичная система. М.: Наука, 2007. 429 с.
30. Долгодворова, С. Я., Черняева Г. Н. (1977). Экстрактивные вещества древесных пород Средней Сибири: сборник статей, Красноярск, 26-38.
31. Донцов, В. И., Крутько, В. Н., Мрикаев, Б. М., Уханов, С. В. (2006). Активные формы кислорода как система: значение в физиологии, патологии и естественном старении. *Труды института системного анализа российской академии наук*, 19, 50-69.

32. Ермаков, В. И. Механизмы адаптации березы к условиям Севера. Л.: Наука, 1986. 144 с.
33. Жолнин, А. В. Общая химия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2012. 400 с.
34. Жукова, Л. А., Воскресенская, О. Л., Грошева, Н. П. (1996). Морфологические и физиологические особенности онтогенеза календулы лекарственной (*Calendula officinalis* L.) в посевах разной плотности. *Экология*, 2, 104–110.
35. Загоскина, Н. В., Катанская, В. М., Назаренко, Л. В., Николаева Т. Н. (2015). Изменения роста проростков и содержания низкомолекулярных антиоксидантов после обработки семян пшеницы биофлавоноидами. *Вестник МГПУ. Серия «Естественные науки»*. 2(18), 26-34.
36. Загоскина, Н. В., Назаренко, Л. В. (2016). Активные формы кислорода и антиоксидантная система растений. *Вестник Московского городского педагогического университета. Серия «Естественные науки»*, 22, 9-23.
37. Запрометов, М. Н. Фенольные соединения: Распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.
38. Зенков, Н. К., Ланкин, В. З., Меньщикова, Е. Б. (2001). Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: МАИК «Наука / Интерпериодика», 2001. 343 с.
39. Исаева, Е. В., Рязанова, Т. В. (2006). Групповой состав углеводов почек тополя. *Химия растительного сырья*, 1, 33–36.
40. Карасев, В. Н., Карасева, М. А., Серебрякова, Н. Е., Абрамова, Д. А. (2015). Активность каталазы как показатель жизненного состояния древесных растений в городских условиях. *Актуальные проблемы лесного комплекса*, 43, 88–90.
41. Климов, С. В. (1987). Биоэнергетические аспекты адаптации и устойчивости зимующих злаков к морозу. *Успехи современной биологии*, 104, 251-264.
42. Климов, С. В. (1997). Биоэнергетическая концепция устойчивости растений к низким температурам. *Успехи современной биологии*, 117(2), 153-160.
43. Климов, С. В., Трунова, Т. И., Мокроносов, А. Т. (1990). Механизм адаптации растений к неблагоприятным условиям окружающей среды через изменение донорно-акцепторных отношений. *Физиология растений*, 37(5),

1024-1035.

44. Колупаев, Ю. Е. (2007). Активные формы кислорода в растениях при действии стессоров: образование и возможные функции. *Вестник Харьковского национального аграрного университета. Серия Биология*, 3, 6-26.
45. Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В. (2008). Окислительный стресс и состояние антиоксидантной системы в coleoptilyakh пшеницы при действии пероксида водорода и нагрева. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*, 2, 42-52.
46. Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В. Формирование адаптивных реакций растений на действие абиотических стрессоров. К.: Основа, 2010. 352 с.
47. Колупаев, Ю. Е., Карпец, Ю. В., Обозный, А. И. (2011). Антиоксидантная система растений: участие в клеточной сигнализации и адаптации к действию стрессоров. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*, 1, 6-34.
48. Кордюм, Е. Л., Сытник, К. М., Бараненко, В. В., Белявская, Н. А., Климчук, Д. А., Недуха, Е. М. Клеточные механизмы адаптации растений к неблагоприятным воздействиям экологических факторов в естественных условиях. К.: Наукова думка, 2003. 277 с.
49. Коровин, В. В., Курносков, Г. А. (2000). Капы. *Лесной вестник*, (4), 29-34.
50. Коровин, В. В., Новицкая, Л. Л., Курносков, Г. А. Структурные аномалии стебля древесных растений. М.: МГУЛ, 2003. 280 с.
51. Крамер, П. Д., Козловский, Т. Т. Физиология древесных растений. М.: Лесная промышленность, 1983. 464 с.
52. Крицкий, М. С., Телегина, Т. А. (2004). Коферменты и эволюция мира РНК. *Успехи биологической химии*, 44, 341-364.
53. Ксенжек, О. С., Петрова, С. А. Электрохимические свойства обратимых биологических редокс-систем. М.: Наука, 1986. 152 с.
54. Лукьянова, Л. Д., Балмуханов, Б. С., Уголев, А. Т. Кислородзависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние. М.: Наука, 1982. 301 с.
55. Лушак, В. И. (2010). Окислительный стресс у дрожжей (обзор). *Биохимия*, 75(3), 346-364.

56. Любавская, А. Я. Карельская береза. М: Лесная промышленность, 1978. 158 с.
57. Любавская, А. Я. Карельская береза: монография – 2-е изд. М.: МГУЛ, 2006. 128 с.
58. Мазей, Н. Г., Шиленков, А. В., Вяль, Ю. А. (2009). Влияние низких температур на дыхание прорастающих семян гречихи. *Известия Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского*, 18, 36–38.
59. Максимов, И. В., Черепанова, Е. А., Бурханова, Г. Ф., Сорокань, А. В., Кузьмина, О. И. (2011). Структурно-функциональные особенности изопероксидаз растений. *Биохимия*, 76(6), 749-764.
60. Мартинович, Г. Г., Черенкевич, С. Н. (2008). Окислительно-восстановительные процессы в клетках. Минск: БГУ, 2008. 159 с.
61. Машкина, О. С., Табацкая, Т. М., Исаков, Ю. Н. (2000). Клональное размножение березы карельской. *Лесное хозяйство*, 4, 33-34.
62. Меньщикова, Е. Б., Зенков, Н. К. (1993). Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов. *Успехи современной биологии*, 113(4), 442-455.
63. Мерзляк, М. Н. (1999). Активированный кислород и жизнедеятельность растений. *Соросовский образовательный журнал*, 9, 20-26.
64. Минибаева, Ф. В., Гордон, Л. Х. (2003). Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе. *Физиология растений*, 50(3), 459-464.
65. Мирошниченко, О. С. (1992). Биогенез, физиологическая роль и свойства каталазы. *Biopolymers and Cell*, 8(6), 3–25.
66. Мощенская, Ю. Л., Галибина, Н. А., Никерова, К. М., Новицкая Л. Л. (2016). Активность ферментов диссимиляции сахарозы в раннем онтогенезе разных форм березы повислой. *Труды КарНЦ РАН, Серия Экспериментальная биология*, 11, 78–87.
67. Мощенская, Ю. Л., Галибина, Н. А., Топчиева, Л. В., Новицкая, Л. Л. (2017). Экспрессия генов, кодирующих изоформы сахарозосинтазы, в ходе

- аномального ксилогенеза карельской березы. *Физиология растений*, 64(3), 301-310.
68. Мощенская, Ю. Л., Галибина, Н. А., Новицкая, Л. Л., Никерова, К. М. (2019). Роль сахарозосинтазы в акцепторных органах древесных растений. *Физиология растений*, 67(3), 13-25.
69. Никерова, К. М., Галибина, Н. А., Мощенская, Ю. Л., Новицкая, Л. Л., Подгорная, М. Н., Софронова, И. Н. (2016). Каталазная активность в листовом аппарате у сеянцев березы повислой разных форм (*Betula pendula* Roth): var. *pendula* и var. *carelica* (Mercklin). *Труды Карельского научного центра Российской академии наук, Серия Экспериментальная биология*, 11, 68–77.
70. Никерова, К. М., Галибина, Н. А. (2017). Влияние нитратного азота на пероксидазную активность в тканях *Betula pendula* Roth var. *pendula* и *B. pendula* var. *carelica* (Mercklin). *Сибирский лесной журнал*, 1, 15–24.
71. Никерова, К. М., Галибина, Н. А., Мощенская, Ю. Л., Новицкая, Л. Л., Подгорная, М. Н., Софронова, И. Н. (2018). Ферменты антиоксидантной системы - индикаторы разных сценариев ксилогенеза: в раннем онтогенезе и во взрослом состоянии (на примере *Betula pendula* Roth). *Труды Карельского научного центра Российской академии наук, Серия Экспериментальная биология*, 6, 68–80.
72. Никерова, К. М., Галибина, Н. А., Мощенская, Ю. Л., Новицкая, Л. Л., Подгорная, М. Н., Софронова, И. Н. (2019а). Участие каталазы и пероксидазы в процессах ксилогенеза у карельской березы. *Лесоведение*, 2, 115–127.
73. Никерова, К. М., Галибина, Н. А., Мощенская, Ю. Л., Бородина, М. Н., Софронова, И. Н. (2019б). Определение активности супероксиддисмутазы и полифенолоксидазы в древесине *Betula pendula* var. *carelica* (*Betulaceae*) при разной степени нарушения ксилогенеза. *Растительные ресурсы*. 55(2). 213-230
74. Никишов, В. Д. (1985). Комплексное использование древесины: учебник для вузов. М: Лесная пром-сть. 264 с.

75. Николаева, Н. Н., Новицкая, Л. Л. (2007). Структурные особенности ассимиляционного аппарата и формирование аномальной древесины карельской березы. *Лесоведение*, 1, 70-73.
76. Новицкая, Л. Л. Карельская береза: механизмы роста и развития структурных аномалий. Петрозаводск: Verso, 2008. 144 с.
77. Оболенская, А. В., Ельницкая, З. П., Леонович, А. А. Лабораторные работы по химии древесины и целлюлозы. М.: Экология, 1991. 320 с
78. Павлова, В. А., Нефедьева, Е. Э., Лысак, В. И., Шайхиев, И. Г. (2014). Влияние импульсного давления на некоторые биохимические процессы семян гречихи при прорастании. *Вестник Казанского технологического университета*, 17(21), 199–203.
79. Полесская, О. Г. (2007). Растительная клетка и активные формы кислорода. М: КДУ, 2007. 139 с.
80. Половникова, М. Г., Воскресенская, О. Л. (2008). Активность компонентов антиоксидантной защиты и полифенолоксидазы у газонных растений в онтогенезе в условиях городской среды. *Физиология растений*, 55(5), 777-785.
81. Прадедова, Е. В., Ишеева, О. Д., Саляев, Р. К. (2009). Супероксиддисмутаза вакуолей клеток растений. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*, 26(1), 21-30.
82. Прадедова, Е. В., Ишеева, О. Д., Саляев, Р. К. (2011а). Ферменты антиоксидантной защиты вакуолей клеток корнеплодов столовой свеклы. *Физиология растений*, 58(1), 40-48.
83. Прадедова, Е. В., Ишеева, О. Д., Саляев, Р. К. (2011б). Классификация системы антиоксидантной защиты как основа рациональной организации экспериментального исследования окислительного стресса у растений. *Физиология растений*, 58(2), 177-185.
84. Рогожин, В. В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов. СПб.: ГИОРД, 2004. 240 с.
85. Савич, И. М. (1989). Пероксидазы – стрессовые белки растений. *Успехи современной биологии*, 107(3), 406-417.

86. Самусева, Л. В. Пороки и защита древесины: учебное пособие. Гомель: БелГУТ, 2019. 101 с.
87. Семчишин, Г. М., Луцк, В. І. (2004). Оксидативний стрес і регуляція активності каталази у *Esherichia coli*. *Український біохімічний журнал*, 76(2), 31-41.
88. Серенко, Е. К., Баранова, Е. Н., Балахнина, Т. И., Куренина, Л. В., Гулевич, А. А., Кособрюхов, А. А., Майсурян, А. Н., Поляков, В. Ю. (2011). Структурная организация хлоропластов растений томата *Solanum lycopersicum*, трансформированных геном Fe-зависимой супероксиддисмутазы. *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*, 28(3), 215-223.
89. Синькевич, М. С., Дерябин, А. Н., Трунова, Т. И. (2005). Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом. *Физиология растений*, 56(2), 186-192.
90. Синькевич, М. С., Дерябин, А. Н., Трунова, Т. И. (2009). Особенности окислительного стресса у растений картофеля с измененным углеводным метаболизмом. *Физиология растений*, 56(2), 186-192.
91. Синькевич, М. С., Нарайкина, Н. В., Трунова, Т. И. (2010). Участие сахаров в системе антиоксидантной защиты от индуцированного паракватом окислительного стресса у картофеля, трансформированного геном инвертазы дрожжей. *Доклады Академии наук*, 434(4), 570-573.
92. Тиунов, Л. А. (1995). Механизмы естественной детоксикации и антиоксидантной защиты. *Вестник РАМН*, 3, 9-13.
93. Федорков, А. Л. (2007). Адаптация хвойных пород к бореальному климату Северной Европы. *Лесоведение*, 3, 46-51.
94. Хавинсон, В. К., Баринов, В. А., Арутюнян, А. В., Малинин, В. В. Свободнорадикальное окисление и старение. СПб.: Наука, 2003. 198 с.
95. Часов, А. В., Колесников, О. П., Минибаева Ф. В., Гордон, Л. Х. (2005) Моненсин и циклогексимид не ингибируют высвобождение пероксидазы и продукцию супероксид-иона в корнях пшеницы при раневом стрессе. *Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія*, 2(7). 29-34.

96. Часов, А. В., Минибаева, Ф. В. (2014). Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 1. Механизмы высвобождения пероксидаз. *Физиология растений*, 61(4), 594-594.
97. Черенкевич, С. Н., Мартинович, Г. Г., Мартинович, И. В., Горудко, И. В., Шамова, Е. В. (2014). Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы. *Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі*, 1. 92-108.
98. Чеснокова, Н. П., Понукалина, Е. В., Бизенкова, М. Н. (2006). Общая характеристика источников образования свободных радикалов и антиоксидантных систем. *Успехи современного естествознания*, (7), 37-41.
99. Чупахина, Г. Н. Система аскорбиновой кислоты растений. Монография. Калининград: КГУ, 1997. 119 с.
100. Шарова, Е. И., Медведев, С. С. (2017). Редокс-реакции в апопласте растущих клеток. *Физиология растений*, 64(1), 3-18.
101. Шарова, Е. Н. (1999) Роль пероксида водорода в регуляции растяжимости первичных клеточных стенок. Физиология растений – наука 3-го тысячелетия. Мат-лы Междунар. конф. 4-й Съезд Общества физиологов растений России. 2. 738-739.
102. Шелякин, М. А., Захожий, И. Г., Головкин, Т. К. (2016). Онтогенетические аспекты дыхания растений (на примере *Rubus chamaemorus* L.). *Физиология растений*, 63(1), 98-107.
103. Щетинкин, С. В. Гистогенез узорчатой древесины березы (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Merkl. и *Betula pendula* Roth): автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.05. Воронеж, 1988. 24 с.
104. Abdalla, M. M. (2011). Beneficial effects of diatomite on growth, the biochemical contents and polymorphic DNA in *Lupinus albus* plants grown under water stress. *Agriculture and Biology Journal of North America*, 2(2), 207-220.
105. Albenne, C., Canut, H., Jamet, E. (2013). Plant cell wall proteomics: the leadership of *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 4, article 111, 1–17.
106. Alfonso, M., Perewoska, I., Kirilovsky, D. (2000). Redox control of psbA gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. Involvement of the cytochrome b6/fComplex. *Plant physiology*, 122(2), 505-516.

107. Alici, E. H., Arabaci, G. (2016). Determination of SOD, POD, PPO and CAT enzyme activities in *Rumex obtusifolius* L. *Annual Research & Review in Biology*, 11(3), 1-7.
108. Allen, R. G., Balin, A. K. (1989). Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radical Biology and Medicine*, 6(6), 631-661.
109. Allison, S. D., Schultz, J. C. (2004). Differential activity of peroxidase isozymes in response to wounding, gypsy moth, and plant hormones in northern red oak (*Quercus rubra* L.). *Journal of chemical ecology*, 30(7), 1363-1379.
110. Almagro, L., Gómez Ros, L. V., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Ros Barceló, A., Pedreno, M. A. (2009). Class III peroxidases in plant defence reactions. *Journal of experimental botany*, 60(2), 377-390.
111. Aloni, R. (2010). The induction of vascular tissues by auxin. In *Plant hormones* (pp. 485-518). Springer, Dordrecht.
112. Aloni, R. (2015). Ecophysiological implications of vascular differentiation and plant evolution. *Trees*, 29(1), 1-16.
113. Alscher, R. G., Erturk, N., Heath, L. S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 53(372), 1331-1341.
114. Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.
115. Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum*, 85(2), 235-241.
116. Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.
117. Averillbates, D. A., Przybytkowski, E. (1994). The role of glucose in cellular defenses against cytotoxicity of hydrogen peroxide in Chinese hamster ovary cells. *Archives of biochemistry and biophysics*, 312(1), 52-58.
118. Bais, H. P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M., Vivanco, J. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 301(5638), 1377-1380.

119. Bajguz, A., Piotrowska, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70(8), 957-969.
120. Bakalova, S., Nikolova, A., Nedeva, D. (2004). Isoenzyme profiles of peroxidase, catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. *Bulgarian Journal of Plant Physiology*, 30(1-2), 64-77.
121. Bannister, J. V., Bannister, W. H., Rotilio, G. (1987). Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry*, 22(2), 111-180.
122. Barceló, A. R. (1998). Hydrogen peroxide production is a general property of the lignifying xylem from vascular plants. *Annals of Botany*, 82(1), 97-103.
123. Barceló, A. R. (1999). Some properties of the H₂O₂/O₂⁻ generating system from the lignifying xylem of *Zinnia elegans*. *Free radical research*, 31(1), 147-154.
124. Barceló, A. R. (2005). Xylem parenchyma cells deliver the H₂O₂ necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta*, 220(5), 747-756.
125. Barnes, D., Mayfield, S. P. (2003). Redox control of posttranscriptional processes in the chloroplast. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(1), 89-94.
126. Barnett, J., Jeronimidis, G. (2003). Wood quality and its biological basis. *Blackwell Publishing Ltd.*, 226 p.
127. Barra, L., Pica, N., Gouffi, K., Walker, G. C., Blanco, C., Trautwetter, A. (2003). Glucose 6-phosphate dehydrogenase is required for sucrose and trehalose to be efficient osmoprotectants in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS microbiology letters*, 229(2), 183-188.
128. Barros, J., Serk, H., Granlund, I., Pesquet, E. (2015). The cell biology of lignification in higher plants. *Annals of botany*, 115(7), 1053-1074.
129. Barros, M. H., Bandy, B., Tahara, E. B., Kowaltowski, A. J. (2004). Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(48), 49883-49888.

130. Bartwal, A., Mall, R., Lohani, P., Guru, S. K., Arora, S. (2013). Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses. *Journal of plant growth regulation*, 32(1), 216-232.
131. Bashandy, T., Guillemintot, J., Vernoux, T., Caparros-Ruiz, D., Ljung, K., Meyer, Y., Reichheld, J. P. (2010). Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *The Plant Cell*, 22(2), 376-391.
132. Beauchamp, C., Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*, 44(1), 276-287.
133. Beckman, K. B., Ames, B. N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2), 547-581.
134. Bernards, M. A., Razem, F. A. (2001). The poly (phenolic) domain of potato suberin: a non-lignin cell wall bio-polymer. *Phytochemistry*, 57(7), 1115-1122.
135. Bestwick, C. S., Brown, I. R., Bennett, M. H., Mansfield, J. W. (1997). Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv phaseolicola. *The Plant Cell*, 9(2), 209-221.
136. Beyer Jr, W. F., Fridovich, I. (1987). Assaying for superoxide dismutase activity: some large consequences of minor changes in conditions. *Analytical biochemistry*, 161(2), 559-566.
137. Bi, Y. M., Kenton, P., Mur, L., Darby, R., Draper, J. (1995). Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression. *The Plant Journal*, 8(2), 235-245.
138. Bindschedler, L. V., Dewdney, J., Blee, K. A., Stone, J. M., Asai, T., Plotnikov, J., Denoux, C., Hayes, T., Gerrish, C., Davies, D. R., Ausubel, F. M., Bolwell, G. P. (2006). Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance. *The Plant Journal*, 47(6), 851-863.
139. Blackman, L. M., Hardham, A. R. (2008). Regulation of catalase activity and gene expression during *Phytophthora nicotianae* development and infection of tobacco. *Molecular plant pathology*, 9(4), 495-510.

140. Blee, K. A., Choi, J. W., O'Connell, A. P., Schuch, W., Lewis, N. G., Bolwell, G. P. (2003). A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry*, *64*(1), 163-176.
141. Bligny, R., Douce, R. (1983). Excretion of laccase by sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) cells. Purification and properties of the enzyme. *Biochemical Journal*, *209*(2), 489-496.
142. Blinda, A., Koch, B., Ramanjulu, S., Dietz, K. J. (1997). De novo synthesis and accumulation of apoplastic proteins in leaves of heavy metal-exposed barley seedlings. *Plant, Cell & Environment*, *20*(8), 969-981.
143. Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K. V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of botany*, *91*(2), 179-194.
144. Blomster, T., Salojärvi, J., Sipari, N., Brosché, M., Ahlfors, R., Keinänen, M., Overmyer, K., Kangasjärvi, J. (2011). Apoplastic reactive oxygen species transiently decrease auxin signaling and cause stress-induced morphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *157*(4), 1866-1883.
145. Boada, J., Roig, T., Perez, X., Gamez, A., Bartrons, R., Cascante, M., Bermúdez, J. (2000). Cells overexpressing fructose-2, 6-bisphosphatase showed enhanced pentose phosphate pathway flux and resistance to oxidative stress. *FEBS letters*, *480*(2-3), 261-264.
146. Bocock, P. N., Morse, A. M., Dervinis, C., Davis, J. M. (2008). Evolution and diversity of invertase genes in *Populus trichocarpa*. *Planta*, *227*(3), 565-576.
147. Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual review of plant biology*, *54*(1), 519-546.
148. Bolouri-Moghaddam, M. R., Le Roy, K., Xiang, L., Rolland, F., Van den Ende, W. (2010). Sugar signalling and antioxidant network connections in plant cells. *The FEBS journal*, *277*(9), 2022-2037.
149. Bolwell, G. P., Bindschedler, L. V., Blee, K. A., Butt, V. S., Davies, D. R., Gardner, S. L., Gerrish, C., Minibayeva, F. (2002). The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of experimental botany*, *53*(372), 1367-1376.

150. Borges, C. V., Minatel, I. O., Gomez-Gomez, H. A., Lima, G. P. P. (2017). Medicinal plants: Influence of environmental factors on the content of secondary metabolites. In *Medicinal Plants and Environmental Challenges* (pp. 259-277). Springer, Cham.
151. Borland, A., Elliott, S., Patterson, S., Taybi, T., Cushman, J., Pater, B., Barnes, J. (2005). Are the metabolic components of crassulacean acid metabolism up-regulated in response to an increase in oxidative burden? *Journal of Experimental Botany*, 57(2), 319-328.
152. Boudet, A. M., Kajita, S., Grima-Pettenati, J., Goffner, D. (2003). Lignins and lignocellulosics: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends in plant science*, 8(12), 576-581.
153. Boutros, T., Chevet, E., Metrakos, P. (2008). Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer. *Pharmacological reviews*, 60(3), 261-310.
154. Bowler, C., Alliotte, T., De Loose, M., Van Montagu, M., Inzé, D. (1989). The induction of manganese superoxide dismutase in response to stress in *Nicotiana plumbaginifolia*. *The EMBO journal*, 8(1), 31-38.
155. Bowler, C., Montagu, M. V., Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*, 43(1), 83-116.
156. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
157. Brownleader, M. D., Hopkins, J., Mobasheri, A., Dey, P. M., Jackson, P., Trevan, M. (2000). Role of extensin peroxidase in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) seedling growth. *Planta*, 210(4), 668-676.
158. Brunow, G., Kilpelainen, I., Sipila, J., Syrjanen, K., Karhunen, P., Setala, H., Rummakko, P. (1998). Oxidative coupling of phenols and the biosynthesis of lignin.
159. Buchanan-Wollaston, V., Morris, K. (2000). Senescence and cell death in *Brassica napus* and *Arabidopsis*. In *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 52, 163-174.

160. Cakmak I., Römheld V. (1997). Boron deficiency-induced impairments of cellular functions in plants. *Plant Soil*, 193(1-2), 71-84.
161. Caliskan, M., Cuming, A. C. (1998). Spatial specificity of H₂O₂-generating oxalate oxidase gene expression during wheat embryo germination. *The Plant Journal*, 15(2), 165-171.
162. Cannon, R. E., White, J. A., Scandalios, J. G. (1987). Cloning of cDNA for maize superoxide dismutase 2 (SOD2). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(1), 179-183.
163. Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T., Raikhel, N. V. (2004). The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The plant cell*, 16(12), 3285-3303.
164. Castillo, F. J., Greppin, H. (1988). Extracellular ascorbic acid and enzyme activities related to ascorbic acid metabolism in *Sedum album* L. leaves after ozone exposure. *Environmental and Experimental Botany*, 28(3), 231-238.
165. Cazalé, A. C., Droillard, M. J., Wilson, C., Heberle-Bors, E., Barbier-Brygoo, H., Laurière, C. (1999). MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cell suspensions: towards the oxidative burst response? *The Plant Journal*, 19(3), 297-307.
166. Chaudière, J., Ferrari-Iliou, R. (1999). Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 37(9-10), 949-962.
167. Chaves, M. M., Maroco, J. P., Pereira, J. S. (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional plant biology*, 30(3), 239-264.
168. Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192-208.
169. Chen, J. H., Hales, C. N., Ozanne, S. E. (2007). DNA damage, cellular senescence and organismal ageing: causal or correlative? *Nucleic acids research*, 35(22), 7417-7428.

170. Chen, J. W., Cao, K. F. (2008). Changes in activities of antioxidative system and monoterpene and photochemical efficiency during seasonal leaf senescence in *Hevea brasiliensis* trees. *Acta Physiologiae Plantarum*, 30(1), 1-9.
171. Chen, S. X., Schopfer, P. (1999). Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase. *European Journal of Biochemistry*, 260(3), 726-735.
172. Chen, Y., Zhang, M., Chen, T., Zhang, Y., An, L. (2006). The relationship between seasonal changes in anti-oxidative system and freezing tolerance in the leaves of evergreen woody plants of *Sabina*. *South African Journal of Botany*, 72(2), 272-279.
173. Cheng, W. H., Taliercio, E. W., Chourey, P. S. (1999). Sugars modulate an unusual mode of control of the cell-wall invertase gene (*Incw1*) through its 3' untranslated region in a cell suspension culture of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10512-10517.
174. Cheynier, V., Souquet, J. M., Kontek, A., Moutounet, M. (1994). Anthocyanin degradation in oxidising grape musts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 66(3), 283-288.
175. Chinnusamy, V., Schumaker, K., Zhu, J. K. (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of experimental botany*, 55(395), 225-236.
176. Christensen, J. H., Bauw, G., Welinder, K. G., Van Montagu, M., Boerjan, W. (1998). Purification and characterization of peroxidases correlated with lignification in poplar xylem. *Plant physiology*, 118(1), 125-135.
177. Christensen, J. H., Overney, S., Rohde, A., Diaz, W. A., Bauw, G., Simon, P., Van Montagu, M., Boerjan, W. (2001). The syringaldazine-oxidizing peroxidase PXP 3-4 from poplar xylem: cDNA isolation, characterization and expression. *Plant molecular biology*, 47(5), 581-593.
178. Christov, K., Bakardjieva, N. (1999). BIOLOGY-Subcellular Distribution of Superoxide Dismutase Isoforms in Lucerne Leaves (*Medicago rigidula*) and Effect of Calcium and Zinc Ions. *Dokladi na Bulgarskata Akademia na Naukite*, 52(3-4), 89-92.

179. Clausen, T. P., Reichardt, P. B., Bryant, J. P., Werner, R. A., Post, K., Frisby, K. (1989). Chemical model for short-term induction in quaking aspen (*Populus tremuloides*) foliage against herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15(9), 2335-2346.
180. Constabel, C. P., Bergey, D. R., Ryan, C. A. (1996). Polyphenol oxidase as a component of the inducible defense response in tomato against herbivores. In *Phytochemical diversity and redundancy in ecological interactions* (pp. 231-252). Springer, Boston, MA.
181. Constabel, C. P., Yip, L., Patton, J. J., Christopher, M. E. (2000). Polyphenol oxidase from hybrid poplar. Cloning and expression in response to wounding and herbivory. *Plant physiology*, 124(1), 285-296.
182. Constantinides, S. M., Bedford, C. L. (1967). Multiple forms of phenoloxidase. *Journal of Food Science*, 32(4), 446-450.
183. Contento, A. L., Kim, S. J., Bassham, D. C. (2004). Transcriptome profiling of the response of Arabidopsis suspension culture cells to Suc starvation. *Plant physiology*, 135(4), 2330-2347.
184. Cosgrove, D. J. (2005). Growth of the plant cell wall. *Nature reviews molecular cell biology*, 6(11), 850-861.
185. Cosio, C., Vuillemin, L., De Meyer, M., Kevers, C., Penel, C., Dunand, C. (2009). An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity. *Planta*, 229(4), 823-836.
186. Couée, I., Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A. (2006). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *Journal of experimental botany*, 57(3), 449-459.
187. Coupe, S. A., Palmer, B. G., Lake, J. A., Overy, S. A., Oxborough, K., Woodward, F. I., Gray, J. E., Quick, W. P. (2005). Systemic signalling of environmental cues in Arabidopsis leaves. *Journal of Experimental Botany*, 57(2), 329-341.
188. Crawford, N. M. (2005). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of experimental botany*, 57(3), 471-478.

189. Creissen, G. P., Edwards, E. A., Mullineaux, P. M. (1994). Glutathione reductase and ascorbate peroxidase. *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*, 343, 364.
190. Cui, K., Xing, G., Zhou, G., Liu, X., Wang, Y. (2000). The induced and regulatory effects of plant hormones in somatic embryogenesis. *Hereditas*, 22(5), 349-354.
191. Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 57(5), 779-795.
192. de Marco, A., Roubelakis-Angelakis, K. A. (1996). The complexity of enzymic control of hydrogen peroxide concentration may affect the regeneration potential of plant protoplasts. *Plant Physiology*, 110(1), 137-145.
193. de Marco, A., Guzzardi, P., Jamet, É. (1999). Isolation of tobacco isoperoxidases accumulated in cell-suspension culture medium and characterization of activities related to cell wall metabolism. *Plant physiology*, 120(2), 371-382.
194. Debnam, P. M., Fernie, A. R., Leisse, A., Golding, A., Bowsher, C. G., Grimshaw, C., Knight, J. S., Emes, M. J. (2004). Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *The Plant Journal*, 38(1), 49-59.
195. del Río, L. A., Pastori, G. M., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Sevilla, F., Corpas, F. J., Jiménez, A., López-Huertas, E., Hernández, J. A. (1998). The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, 116(4), 1195-1200.
196. del Río, L. A., Sandalio, L. M., Altomare, D. A., Zilinskas, B. A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence. *Journal of Experimental Botany*, 54(384), 923-933.
197. Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M. B., Vinh, J., Toledano, M. B. (2002). A thiol peroxidase is an H₂O₂ receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*, 111(4), 471-481.

198. Delledonne, M., Polverari, A., Murgia, I. (2003). The functions of nitric oxide-mediated signaling and changes in gene expression during the hypersensitive response. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(1), 33-41.
199. Demura, T., Tashiro, G., Horiguchi, G., Kishimoto, N., Kubo, M., Matsuoka, N., Minami, A., Nagata-Hiwatashi, M., Nakamura, K., Okamura, Y., Sassa, N., Suzuki, S., Yazaki, J., Kikuchi, S., Fukuda, H. (2002). Visualization by comprehensive microarray analysis of gene expression programs during transdifferentiation of mesophyll cells into xylem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15794-15799.
200. Desikan, R., Soheila, A. H., Hancock, J. T., Neill, S. J. (2001). Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress. *Plant physiology*, 127(1), 159-172.
201. Devi, S. R., Prasad, M. N. V. (1998). Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. *Plant science*, 138(2), 157-165.
202. Dharanishanthi, V., Dasgupta, M. G. (2016). Construction of co-expression network based on natural expression variation of xylogenesis-related transcripts in *Eucalyptus tereticornis*. *Molecular biology reports*, 43(10), 1129-1146.
203. Dietz, K. J. (1997). Functions and responses of the leaf apoplast under stress. In *Progress in Botany* (pp. 221-254). Springer, Berlin, Heidelberg.
204. Dietz, K. J. (2003). Plant peroxiredoxins. *Annual review of plant biology*, 54(1), 93-107.
205. Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085-1097.
206. Doudican, N. A., Song, B., Shadel, G. S., Doetsch, P. W. (2005). Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 25(12), 5196-5204.
207. Dumas, B., Bottin, A., Gaulin, E., Esquerré-Tugayé, M. T. (2008). Cellulose-binding domains: cellulose associated-defensive sensing partners? *Trends in plant science*, 13(4), 160-164.

208. Egley, G. H., Paul, R. N., Vaughn, K. C., Duke, S. O. (1983). Role of peroxidase in the development of water-impermeable seed coats in *Sida spinosa* L. *Planta*, 157(3), 224-232.
209. El Mansouri, I., Mercado, J. A., Santiago-Dómenech, N., Pliego-Alfaro, F., Valpuesta, V., Quesada, M. A. (1999). Biochemical and phenotypical characterization of transgenic tomato plants overexpressing a basic peroxidase. *Physiologia Plantarum*, 106(4), 355-362.
210. Elfstrand, M., Sitbon, F., Lapierre, C., Bottin, A., von Arnold, S. (2002). Altered lignin structure and resistance to pathogens in spi 2-expressing tobacco plants. *Planta*, 214(5), 708-716.
211. El-Mashad, A. A. A., Mohamed, H. I. (2012). Brassinolide alleviates salt stress and increases antioxidant activity of cowpea plants (*Vigna sinensis*). *Protoplasma*, 249(3), 625-635.
212. Espín, J. C., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., Varón, R., García-Cánovas, F. (1998). Monophenolase and diphenolase reaction mechanisms of apple and pear polyphenol oxidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(8), 2968-2975.
213. Es-Safi, N. E., Cheynier, V., Moutounet, M. (2003). Implication of phenolic reactions in food organoleptic properties. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(5), 535-553.
214. Essmann, J., Schmitz-Thom, I., Schön, H., Sonnewald, S., Weis, E., Scharte, J. (2008). RNA interference-mediated repression of cell wall invertase impairs defense in source leaves of tobacco. *Plant physiology*, 147(3), 1288-1299.
215. Fagerstedt, K., Saranpää, P., Piispanen, R. (1998). Peroxidase activity, isoenzymes and histological localisation in sapwood and heartwood of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Journal of Forest Research*, 3(1), 43-47.
216. Feinbaum, R. L., Storz, G., Ausubel, F. M. (1991). High intensity and blue light regulated expression of chimeric chalcone synthase genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. *Molecular and General Genetics MGG*, 226(3), 449-456.

217. Felton, G. W., Donato, K., Del Vecchio, R. J., Duffey, S. S. (1989). Activation of plant foliar oxidases by insect feeding reduces nutritive quality of foliage for noctuid herbivores. *Journal of Chemical Ecology*, 15(12), 2667-2694.
218. Fernández-García, N., Carvajal, M., Olmos, E. (2004). Graft union formation in tomato plants: peroxidase and catalase involvement. *Annals of Botany*, 93(1), 53-60.
219. Ferrer, M. A., Ros Barceló, A. (1999). Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell & Environment*, 22(7), 891-897.
220. Fotopoulos, V., Gilbert, M. J., Pittman, J. K., Marvier, A. C., Buchanan, A. J., Sauer, N., Hall, J.L., Williams, L. E. (2003). The monosaccharide transporter gene, AtSTP4, and the cell-wall invertase, Atβfruct1, are induced in Arabidopsis during infection with the fungal biotroph *Erysiphe cichoracearum*. *Plant physiology*, 132(2), 821-829.
221. Foucart, C., Paux, E., Ladouce, N., San-Clemente, H., Grima-Pettenati, J., Sivadon, P. (2006). Transcript profiling of a xylem vs phloem cDNA subtractive library identifies new genes expressed during xylogenesis in Eucalyptus. *New Phytologist*, 170(4), 739-752.
222. Foyer, C. H., Alschei, R. C., Hess, J. L. (1993). Ascorbic acid. In antioxidants in higher plants. *RG Alscher and JL Hess (eds) CRC Press, Boca Raton* 31, 58.
223. Foyer, C. H., Noctor, G. (2009). Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & redox signaling*, 11(4), 861-905.
224. Fry, S. C. (2004a). Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: intra-and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 97-111.
225. Fry, S. C. (2004b). Primary cell wall metabolism: tracking the careers of wall polymers in living plant cells. *New phytologist*, 161(3), 641-675.

226. Fukuda, H., Komamine, A. (1982). Lignin synthesis and its related enzymes as markers of tracheary-element differentiation in single cells isolated from the mesophyll of *Zinnia elegans*. *Planta*, 155(5), 423-430.
227. Fukuda, H. (1996). Xylogenesis: initiation, progression, and cell death. *Annual review of plant biology*, 47(1), 299-325.
228. Gabaldón, C., López-Serrano, M., Pomar, F., Merino, F., Cuello, J., Pedreño, M. A., Barceló, A. R. (2006). Characterization of the last step of lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* suspension cell cultures. *FEBS letters*, 580(18), 4311-4316.
229. Gaetani, G. F., Galiano, S., Canepa, L., Ferraris, A. M., Kirkman, H. N. (1989). Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, 73(1), 334-339.
230. Gapper, C., Dolan, L. (2006). Control of plant development by reactive oxygen species. *Plant physiology*, 141(2), 341-345.
231. Gaspar, T., Penel, C. L., Thorpe, T., Greppin, H. (1982). Peroxidases. A survey of their biochemical and physiological roles in higher plants, *Universite de Geneve, Geneve*, 89-112.
232. Gaspar, T., Penel, C., Castillo, F. J., Greppin, H. (1985). A two-step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia plantarum*, 64(3), 418-423.
233. Gaspar, T. H. (1991). Peroxidases in plant growth, differentiation and development processes. *Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases*, 249-280.
234. Gawlik-Dziki, U., Szymanowska, U., Baraniak, B. (2007). Characterization of polyphenol oxidase from broccoli (*Brassica oleracea* var. *botrytis italica*) florets. *Food chemistry*, 105(3), 1047-1053.
235. Gechev, T., Willekens, H., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Camp, W., Toneva, V., Minkov, I. (2003). Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *Journal of Plant Physiology*, 160(5), 509-515.
236. Geigenberger, P., Kolbe, A., Tiessen, A. (2005). Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1469-1479.

237. Gill, T., Sreenivasulu, Y., Kumar, S., Ahuja, P. S. (2010). Over-expression of superoxide dismutase exhibits lignification of vascular structures in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 167(9), 757-760.
238. Grace, S. C., Logan, B. A. (2000). Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 355(1402), 1499-1510.
239. Graham, I. A., Denby, K. J., Leaver, C. J. (1994). Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle gene expression in cucumber. *The Plant Cell*, 6(5), 761-772.
240. Grigoras, A. G. (2017). Catalase immobilization—A review. *Biochemical engineering journal*, 117, 1-20.
241. Grün, S., Lindermayr, C., Sell, S., Durner, J. (2006). Nitric oxide and gene regulation in plants. *Journal of Experimental Botany*, 57(3), 507-516.
242. Guan, L. M., Scandalios, J. G. (2000). Hydrogen peroxide-mediated catalase gene expression in response to wounding. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(8), 1182-1190.
243. Guo, H., Sun, Y., Li, Y., Liu, X., Zhang, W., Ge, F. (2014). Elevated CO₂ decreases the response of the ethylene signaling pathway in *Medicago truncatula* and increases the abundance of the pea aphid. *New Phytologist*, 201(1), 279-291.
244. Guyot, S., Vercauteren, J., Cheynier, V. (1996). Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)-catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase. *Phytochemistry*, 42(5), 1279-1288.
245. Haagensohn, K. K., Wu, G. S. (2010). The role of MAP kinases and MAP kinase phosphatase-1 in resistance to breast cancer treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 29(1), 143-149.
246. Halliwell, B. (2006). Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant physiology*, 141(2), 312-322.
247. Halloin, J. M. (1982). Localization and changes in catechin and tannins during development and ripening of cottonseed. *New Phytologist*, 90(4), 651-657.
248. Hammond-Kosack, K. E., Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *The Plant Cell*, 8(10), 1773-1791.

249. Harel, E., Mayer, A. M., Shain, Y. (1965). Purification and multiplicity of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry*, 4(6), 783-790.
250. Harel, E., Mayer, A. M. (1968). Interconversion of sub-units of catechol oxidase from apple chloroplasts. *Phytochemistry*, 7(2), 199-204.
251. Harkin, J. M., Obst, J. R. (1973). Lignification in trees: indication of exclusive peroxidase participation. *Science*, 180(4083), 296-298.
252. Harman, D. (1972). The biologic clock: the mitochondria? *Journal of the American Geriatrics Society*, 20(4), 145-147.
253. Harman, E. (1956). Protein oxidation in aging and age-related diseases. *Gerontology*, 11, 298-300.
254. Harris, J. M. (1967) The causes of spiral grain in the corewood of radiata pine. Proc 14th Congr IUFRO, Munich 1967 Pt IX Sect 22/41, pp 363- 383.
255. Harris, J. M. (1973). *Spiral grain and xylem polarity in radiata pine: microscopy of cambial reorientation*. New Zealand Forest Service.
256. Harris, J. M. (2012). *Spiral grain and wave phenomena in wood formation*. Springer Science & Business Media.
257. Harris, R. Z., Newmyer, S. L., De Montellano, P. O. (1993). Horseradish peroxidase-catalyzed two-electron oxidations. Oxidation of iodide, thioanisoles, and phenols at distinct sites. *Journal of Biological Chemistry*, 268(3), 1637-1645.
258. Hartig, R. (1895). Über den Drehwuchs der Kiefer. *Forst Naturwiss Z*, 4, 313-326.
259. Haruta, M., Pedersen, J. A., Constabel, C. P. (2001). Polyphenol oxidase and herbivore defense in trembling aspen (*Populus tremuloides*): cDNA cloning, expression, and potential substrates. *Physiologia Plantarum*, 112(4), 552-558.
260. Hatzios, K. K. (2000). Herbicide safeners and synergists. *Metabolism of agrochemicals in plants*. New York: John Wiley, 259-294.
261. Hauschild, R., von Schaewen, A. (2003). Differential regulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase isoenzyme activities in potato. *Plant physiology*, 133(1), 47-62.
262. Hejnowicz, Z. (1990). Phenomena of orientation in the cambium. *The vascular cambium. Research Studies*, Taunton, 127-137.

263. Henmi, K., Demura, T., Tsuboi, S., Fukuda, H., Iwabuchi, M., Ogawa, K. I. (2005). Change in the redox state of glutathione regulates differentiation of tracheary elements in *Zinnia* cells and *Arabidopsis* roots. *Plant and cell physiology*, 46(11), 1757-1765.
264. Henzler, T., Steudle, E. (2000). Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H₂O₂ across water channels. *Journal of experimental botany*, 51(353), 2053-2066.
265. Hernandez, J. A., Campillo, A., Jimenez, A., Alarcon, J. J., Sevilla, F. (1999). Response of antioxidant systems and leaf water relations to NaCl stress in pea plants. *The New Phytologist*, 141(2), 241-251.
266. Hernández, J. A., Ferrer, M. A., Jiménez, A., Barceló, A. R., Sevilla, F. (2001). Antioxidant systems and O₂⁻/H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. *Plant Physiology*, 127(3), 817-831.
267. Hernández-Ruiz, J., Rodríguez-López, J. N., García-Cánovas, F., Acosta, M., Arnao, M. B. (2000). Characterization of isoperoxidase-B2 inactivation in etiolated *Lupinus albus* hypocotyls. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1478(1), 78-88.
268. Hérouart, D., Van Montagu, M., Inzé, D. (1993). Redox-activated expression of the cytosolic copper/zinc superoxide dismutase gene in *Nicotiana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(7), 3108-3112.
269. Hérouart, D., Baudouin, E., Frenedo, P., Harrison, J., Santos, R., Jamet, A., Van de Syde, G., Touati, D., Puppo, A. (2002). Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume–Rhizobium symbiosis? *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 619-624.
270. Hintikka, T. J. (1941) Visakoivusta ja niiden anatomista. Suomalaisen kirjallisuuden seuran kirjapainon Oy, Helsinki
271. Hippeli, S., Ingrid H., Erich F. Elstner (1999). «Activated oxygen and free oxygen radicals in pathology: New insights and analogies between animals and plants». *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(3), 167-178.

272. Hitchler, M. J., Domann, F. E. (2007). An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(7), 1023-1036.
273. Hothorn, M., Van den Ende, W., Lammens, W., Rybin, V., Scheffzek, K. (2010). Structural insights into the pH-controlled targeting of plant cell-wall invertase by a specific inhibitor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(40), 17427-17432.
274. Hu, M., Li, H., Zhang, Y., Liu, Q. (2009). Photosynthesis and related physiological characteristics affected by exogenous glucose in wheat seedlings under water stress. *Acta Agronomica Sinica*, 35(4), 724-732.
275. Hu, M., Shi, Z., Zhang, Z., Zhang, Y., Li, H. (2012). Effects of exogenous glucose on seed germination and antioxidant capacity in wheat seedlings under salt stress. *Plant growth regulation*, 68(2), 177-188.
276. Huang, H., Jian, Q., Jiang, Y., Duan, X., Qu, H. (2016). Enhanced chilling tolerance of banana fruit treated with malic acid prior to low-temperature storage. *Postharvest Biology and Technology*, 111, 209-213.
277. Humphreys, J. M., Chapple, C. (2002). Rewriting the lignin roadmap. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 224-229.
278. Iakimova, E. T., Woltering, E. J. (2017). Xylogenesis in zinnia (*Zinnia elegans*) cell cultures: unravelling the regulatory steps in a complex developmental programmed cell death event. *Planta*, 245(4), 681-705.
279. Iglesias, M. J., Terrile, M. C., Bartoli, C. G., D'Ippólito, S., Casalongué, C. A. (2010). Auxin signaling participates in the adaptative response against oxidative stress and salinity by interacting with redox metabolism in *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 74(3), 215-222.
280. Inzé, D., Van Montagu, M. (1995). Oxidative stress in plants. *Current opinion in Biotechnology*, 6(2), 153-158.
281. Iqbal, A., Yabuta, Y., Takeda, T., Nakano, Y., Shigeoka, S. (2006). Hydroperoxide reduction by thioredoxin-specific glutathione peroxidase isoenzymes of *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS journal*, 273(24), 5589-5597.
282. Iqbal, A., Wang, T., Wu, G., Tang, W., Zhu, C., Wang, D., Y, L., Wang, H. (2017). Physiological and transcriptome analysis of heteromorphic leaves and

- hydrophilic roots in response to soil drying in desert *Populus euphratica*. *Scientific reports*, 7(1), article 12188.
283. Ivanov, S., Konstantinova, T., Parvanova, D., Todorova, D., Djilianov, D., Alexieva, V. (2001). Effect of high temperatures on the growth, free proline content and some antioxidants in tobacco plants. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences*, 54(7), 7-71.
284. Jackson, R. G., Kowalczyk, M., Li, Y., Higgins, G., Ross, J., Sandberg, G., Bowles, D. J. (2002). Over-expression of an Arabidopsis gene encoding a glucosyltransferase of indole-3-acetic acid: phenotypic characterisation of transgenic lines. *The Plant Journal*, 32(4), 573-583.
285. Jajic, I., Sarna, T., Strzalka, K. (2015). Senescence, stress, and reactive oxygen species. *Plants*, 4(3), 393-411.
286. Jakovljevic, Z. D., Stankovic, S. M., Topuzovic, D. M. (2013). Seasonal variability of *Chelidonium majus* L. secondary metabolites content and antioxidant activity. *EXCLI journal*, 12, 260-268.
287. Jamet, E., Albenne, C., Boudart, G., Irshad, M., Canut, H., Pont-Lezica, R. (2008). Recent advances in plant cell wall proteomics. *Proteomics*, 8(4), 893-908.
288. Jiang, W., Ding, M., Duan, Q., Zhou, Q., Huang, D. (2012). Exogenous glucose preserves the quality of watermelon (*Citrullus lanatus*) plug seedlings for low-temperature storage. *Scientia horticulturae*, 148, 23-29.
289. Jiménez, A., Hernández, J. A., Pastori, G., del Río, L. A., Sevilla, F. (1998). Role of the ascorbate-glutathione cycle of mitochondria and peroxisomes in the senescence of pea leaves. *Plant physiology*, 118(4), 1327-1335.
290. Jiménez, M., García-Carmona, F. (1999). Myricetin, an antioxidant flavonol, is a substrate of polyphenol oxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(14), 1993-2000.
291. Jing, H. C., Hebel, R., Oeljeklaus, S., Sitek, B., Stühler, K., Meyer, H. E., Sturre, M. J. G., Hille, J., Warscheid, B., Dijkwel, P. P. (2008). Early leaf senescence is associated with an altered cellular redox balance in Arabidopsis *cpr5/old1* mutants. *Plant Biology*, 10, 85-98.

292. Jones, B. E., Jones, B. D. (1963). Cell adjustments accompanying the development of spiral grain in a specimen of *Pseudotsuga taxifolia* Brit. *The Commonwealth Forestry Review*, 151-158.
293. Jones, D. P. (2006). Redefining oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1865-1879.
294. Joo, J., Bae, Y., Lee, J. (2000). Generation of reactive oxygen species is essential for gravitropism in primary root of maize. Abstract presented at the Plant Biology 2000 Meeting, San Diego, CA, July 15–19, 2000 (No. 22004).
295. Juhnke, H., Krems, B., Kötter, P., Entian, K. D. (1996). Mutants that show increased sensitivity to hydrogen peroxide reveal an important role for the pentose phosphate pathway in protection of yeast against oxidative stress. *Molecular and General Genetics MGG*, 252(4), 456-464.
296. Junghans, U., Langenfeld-Heyser, R., Polle, A., Teichmann, T. (2004). Effect of auxin transport inhibitors and ethylene on the wood anatomy of poplar. *Plant Biology*, 7(01), 22-29.
297. Kärkönen, A., Koutaniemi, S., Mustonen, M., Syrjänen, K., Brunow, G., Kilpeläinen, I., Teeri, T. H., Simola, L. K. (2002). Lignification related enzymes in *Picea abies* suspension cultures. *Physiologia Plantarum*, 114(3), 343-353.
298. Kärkönen, A., Fry, S. C. (2006). Effect of ascorbate and its oxidation products on H₂O₂ production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1633-1644.
299. Kärkönen, A., Koutaniemi, S. (2010). Lignin biosynthesis studies in plant tissue cultures. *Journal of integrative plant biology*, 52(2), 176-185.
300. Karlsson, M., Melzer, M., Prokhorenko, I., Johansson, T., Wingsle, G. (2005). Hydrogen peroxide and expression of hipI-superoxide dismutase are associated with the development of secondary cell walls in *Zinnia elegans*. *Journal of Experimental Botany*, 56(418), 2085-2093.
301. Karpinska, B., Wingsle, G., Karpinski, S. (2000). Antagonistic effects of hydrogen peroxide and glutathione on acclimation to excess excitation energy in *Arabidopsis*. *IUBMB life*, 50(1), 21-26.
302. Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel, H., Steller, S., Süß, K. H., Melzer, M., Wingsle, G. (2001). A novel superoxide dismutase with a high isoelectric

- point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiology*, 126(4), 1668-1677.
303. Kawano, T. (2003). Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant cell reports*, 21(9), 829-837.
304. Keunen, E. L. S., Peshev, D., Vangronsveld, J., Van Den Ende, W. I. M., Cuypers, A. N. N. (2013). Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, cell & environment*, 36(7), 1242-1255.
305. Khanna-Chopra, R., Sabarinath, S. (2004). Heat-stable chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase in *Chenopodium murale*. *Biochemical and biophysical research communications*, 320(4), 1187-1192.
306. Kim, E. J., Kim, H. P., Hah, Y. C., Roe, J. H. (1996). Differential expression of superoxide dismutases containing Ni and Fe/Zn in *Streptomyces coelicolor*. *European Journal of Biochemistry*, 241(1), 178-185.
307. Kim, Y. H., Kim, C. Y., Song, W. K., Park, D. S., Kwon, S. Y., Lee, H. S., Bang, J. W., Kwak, S. S. (2008). Overexpression of sweetpotato swpa4 peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco. *Planta*, 227(4), 867-881.
308. King, R. S., Flurkey, W. H. (1987). Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 41(3), 231-240.
309. Kinkema, M., Fan, W., Dong, X. (2000). Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *The Plant Cell*, 12(12), 2339-2350.
310. Knight, H., Knight, M. R. (2001). Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in plant science*, 6(6), 262-267.
311. Knörzer, O. C., Burner, J., Boger, P. (1996). Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 97(2), 388-396.
312. Koch, K. E. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual review of plant biology*, 47(1), 509-540.

313. Koch, K. (2004). Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. *Current opinion in plant biology*, 7(3), 235-246.
314. König, J., Baier, M., Horling, F., Kahmann, U., Harris, G., Schürmann, P., Dietz, K. J. (2002). The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5738-5743.
315. Koutaniemi, S., Toikka, M. M., Kärkönen, A., Mustonen, M., Lundell, T., Simola, L. K., Kilpeläinen, I. A., Teeri, T. H. (2005). Characterization of basic p-coumaryl and coniferyl alcohol oxidizing peroxidases from a lignin-forming *Picea abies* suspension culture. *Plant molecular biology*, 58(2), 141-157.
316. Koutaniemi, S., Warinowski, T., Kärkönen, A., Alatalo, E., Fossdal, C. G., Saranpää, P., Laakso, T., Fagerstedt, K. V., Simola, L. K., Paulin, L., Rudd, S., Teeri, T. H. (2007). Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR. *Plant Molecular Biology*, 65(3), 311-328.
317. Kovtun, Y., Chiu, W. L., Tena, G., Sheen, J. (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the national academy of sciences*, 97(6), 2940-2945.
318. Kozlowski, T. T., Hughes, J. F., Leyton, L. (1967). Movement of injected dyes in gymnosperm stems in relation to tracheid alignment. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 40(2), 207-219.
319. Kozlowski, T.T., Pallardy, S.G. (1996) *Physiology of woody plants*, 2nd edn. Academic, San Diego
320. Kramer, E. M. (2002). A mathematical model of pattern formation in the vascular cambium of trees. *Journal of theoretical biology*, 216(2), 147-158.
321. Kramer, E. M. (2004). PIN and AUX/LAX proteins: their role in auxin accumulation. *Trends in plant science*, 9(12), 578-582.
322. Kramer, E. M. (2006). Wood grain pattern formation: a brief review. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(4), 290-301.
323. Kubler, H. (1988). Silvicultural control of mechanical stresses in trees. *Canadian Journal of Forest Research*, 18(10), 1215-1225.

324. Kubler, H. (1991). Function of spiral grain in trees. *Trees*, 5(3), 125-135.
325. Kuźniak, E., Skłodowska, M. (2004). The effect of *Botrytis cinerea* infection on the antioxidant profile of mitochondria from tomato leaves. *Journal of experimental botany*, 55(397), 605-612.
326. Lagrimini, L. M., Joly, R. J., Dunlap, J. R., Liu, T. T. Y. (1997). The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. *Plant molecular biology*, 33(5), 887-895.
327. Lam, E., Kato, N., Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature*, 411(6839), 848-853.
328. Lamb, C., Dixon, R. A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology*, 48(1), 251-275.
329. Landis, G. N., Abdueva, D., Skvortsov, D., Yang, J., Rabin, B. E., Carrick, J., Tavaré, S., Tower, J. (2004). Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(20), 7663-7668.
330. Lariguet, P., Ranocha, P., De Meyer, M., Barbier, O., Penel, C., Dunand, C. (2013). Identification of a hydrogen peroxide signalling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis. *Planta*, 238(2), 381-395.
331. Larson, P. R. (2012). *The vascular cambium: development and structure*. Springer Science & Business Media.
332. Laukkanen, H., Häggman, H., Kontunen-Soppela, S., Hohtola, A. (1999). Tissue browning of in vitro cultures of Scots pine: role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiologia Plantarum*, 106(3), 337-343.
333. Lavola, A., Julkunen-Tiitto, R., de la Rosa, T. M., Lehto, T., Aphalo, P. J. (2000). Allocation of carbon to growth and secondary metabolites in birch seedlings under UV-B radiation and CO₂ exposure. *Physiologia Plantarum*, 109(3), 260-267.
334. Lax, A. R., Vaughn, K. C. (1991). Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. *Plant physiology*, 96(1), 26-31.
335. Lee, T. M., Lin, Y. H. (1995). Changes in soluble and cell wall-bound peroxidase activities with growth in anoxia-treated rice (*Oryza sativa* L.) coleoptiles and roots. *Plant Science*, 106(1), 1-7.

336. Lerner, H. R., Mayer, A. M., Harel, E. (1972). Evidence for conformational changes in grape catechol oxidase. *Phytochemistry*, 11(8), 2415-2421.
337. Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell*, 79(4), 583-593.
338. Li, C., Xie, B. (2000). Evaluation of the antioxidant and pro-oxidant effects of tea catechin oxypolymers. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(12), 6362-6366.
339. Li, H., Sherman, L. A. (2000). A redox-responsive regulator of photosynthesis gene expression in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 182(15), 4268-4277.
340. Li, L., Steffens, J. C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239-247.
341. Li, Y., Kajita, S., Kawai, S., Katayama, Y., Morohoshi, N. (2003). Down-regulation of an anionic peroxidase in transgenic aspen and its effect on lignin characteristics. *Journal of plant research*, 116(3), 175-182.
342. Lim, P. O., Kim, H. J., Gil Nam, H. (2007). Leaf senescence. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 58, 115-136.
343. Link, G. (2003). Redox regulation of chloroplast transcription. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(1), 79-87.
344. Liskay, A., Kenk, B., Schopfer, P. (2003). Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta*, 217(4), 658-667.
345. Liskay, A., van der Zalm, E., Schopfer, P. (2004). Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂, and [•]OH) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant physiology*, 136(2), 3114-3123.
346. Liu, B., Zhang, J., Wang, L., Li, J., Zheng, H., Chen, J., Lu, M. (2014). A survey of *Populus* PIN-FORMED family genes reveals their diversified expression patterns. *Journal of experimental botany*, 65(9), 2437-2448.
347. Liu, C., Liu, Y., Guo, K., Fan, D., Li, G., Zheng, Y., Yu, L., Yang, R. (2011). Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant

- enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. *Environmental and Experimental Botany*, 71(2), 174-183.
348. Liu, L., Eriksson, K. E. L., Dean, J. F. (1999). Localization of hydrogen peroxide production in *Zinnia elegans* L. stems. *Phytochemistry*, 52(4), 545-554.
349. Liu, X., Bush, D. R. (2006). Expression and transcriptional regulation of amino acid transporters in plants. *Amino acids*, 30(2), 113-120.
350. Lopez, A. S., Dimick, P. S. (1991). Enzymes involved in cocoa curing. *Food enzymology*, 2, 211-236.
351. Loukili, A. E., Limam, F., Ayadi, A., Boyer, N., Ouelhazi, L. (1999). Purification and characterization of a neutral peroxidase induced by rubbing tomato internodes. *Physiologia Plantarum*, 105(1), 24-31.
352. Ludwig-Müller, J., Vertocnik, A., Town, C. D. (2005). Analysis of indole-3-butyric acid-induced adventitious root formation on Arabidopsis stem segments. *Journal of experimental botany*, 56(418), 2095-2105.
353. Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of experimental botany*, 62(6), 1757-1773.
354. Luwe, M. (1996). Antioxidants in the apoplast and symplast of beech (*Fagus sylvatica* L.) leaves: seasonal variations and responses to changing ozone concentrations in air. *Plant, Cell & Environment*, 19(3), 321-328.
355. Macheix, J. J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. *Fruit phenolics*, 149-221.
356. Maksimović, J. D., Maksimović, V., Živanović, B., Šukalović, V. H. T., Vuletić, M. (2008). Peroxidase activity and phenolic compounds content in maize root and leaf apoplast, and their association with growth. *Plant science*, 175(5), 656-662.
357. Mari, S., Marquès, L., Breton, F., Karamanos, Y., Macheix, J. J. (1998). Unfolding and refolding of active apple polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 49(5), 1213-1217.
358. Marjamaa, K., Hildén, K., Kukkola, E., Lehtonen, M., Holkeri, H., Haapaniemi, P., Koutaniemi, S., Teeri, T. H., Fagerstedt, K., Lundell, T. (2006a). Cloning, characterization and localization of three novel class III peroxidases in

- lignifying xylem of Norway spruce (*Picea abies*). *Plant molecular biology*, 61(4-5), 719-732.
359. Marjamaa, K., Kukkola, E., Lundell, T., Karhunen, P., Saranpää, P., Fagerstedt, K. V. (2006). Monolignol oxidation by xylem peroxidase isoforms of Norway spruce (*Picea abies*) and silver birch (*Betula pendula*). *Tree physiology*, 26(5), 605-611.
360. Marjamaa, K., Kukkola, E. M., Fagerstedt, K. V. (2007). Lignification in development. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 1(1), 160-169.
361. Marjamaa, K., Kukkola, E. M., Fagerstedt, K. V. (2009). The role of xylem class III peroxidases in lignification. *Journal of Experimental Botany*, 60(2), 367-376.
362. Marles, M. S., Ray, H., Gruber, M. Y. (2003). New perspectives on proanthocyanidin biochemistry and molecular regulation. *Phytochemistry*, 64(2), 367-383.
363. Marques, L., Fleuriet, A., Macheix, J. J. (1995). Characterization of multiple forms of polyphenoloxidase from apple fruit. *Plant Physiology and Biochemistry (France)*.
364. Marusek, C. M., Trobaugh, N. M., Flurkey, W. H., Inlow, J. K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *Journal of inorganic biochemistry*, 100(1), 108-123.
365. Matheis, G., Whitaker, J. R. (1984). Modification of proteins by polyphenol oxidase and peroxidase and their products. *Journal of Food Biochemistry*, 8(3), 137-162.
366. Maxwell, D. P., Wang, Y., McIntosh, L. (1999). The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(14), 8271-8276.
367. May, M. J., Vernoux, T., Leaver, C., Montagu, M. V., Inzé, D. (1998). Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *Journal of Experimental Botany*, 49(321), 649-667.
368. Mayer, A. M., Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18(2), 193-215.

369. Mayer, A. M. (1986). Polyphenol oxidases in plants-recent progress. *Phytochemistry*, 26(1), 11-20.
370. Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. *Phytochemistry*, 67(21), 2318-2331.
371. Mayer-Wegelin, H. (1956). Die biologische, technologische und forstliche Bedeutung des Drehwuchses der Waldbäume. *Forstarchiv*, 27(12), 265-271.
372. McCann, M. C., Bush, M., Milioni, D., Sado, P., Stacey, N. J., Catchpole, G., Defernez, M., Carpita, N. C., Hofte, H., Ulvskov, P., Wilson, R. H., Roberts, K. (2001). Approaches to understanding the functional architecture of the plant cell wall. *Phytochemistry*, 57(6), 811-821.
373. McDougall, G. J. (2001). Cell-wall-associated peroxidases from the lignifying xylem of angiosperms and gymnosperms: monolignol oxidation. *Holzforschung*, 55(3), 246-249.
374. McLellan, K. M., Robinson, D. S. (1983). Cabbage and Brussels sprout peroxidase isoenzymes separated by isoelectric focussing. *Phytochemistry*, 22(3), 645-647.
375. McLusky, S. R., Bennett, M. H., Beale, M. H., Lewis, M. J., Gaskin, P., Mansfield, J. W. (1999). Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal*, 17(5), 523-534.
376. Méchin, V., Baumberger, S., Pollet, B., Lapierre, C. (2007). Peroxidase activity can dictate the in vitro lignin dehydrogenative polymer structure. *Phytochemistry*, 68(4), 571-579.
377. Mehlhorn, H., Lelandais, M., Korth, H. G., Foyer, C. H. (1996). Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS letters*, 378(3), 203-206.
378. Mellerowicz, E. J., Sundberg, B. (2008). Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties. *Current opinion in plant biology*, 11(3), 293-300.
379. Mellon, J. E. (1991). Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures. *Plant physiology*, 95(1), 14-20.

380. Melo, G. A., Shimizu, M. M., Mazzafera, P. (2006). Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. *Phytochemistry*, 67(3), 277-285.
381. Mhamdi, A., Queval, G., Chaouch, S., Vanderauwera, S., Van Breusegem, F., Noctor, G. (2010). Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. *Journal of experimental botany*, 61(15), 4197-4220.
382. Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(4), 523-530.
383. Michalczyk, L., Bandurski, R. S. (1982). Enzymic synthesis of 1-O-indol-3-ylacetyl- β -D-glucose and indol-3-ylacetyl-myoinositol. *Biochemical Journal*, 207(2), 273-281.
384. Mika, A., Minibayeva, F., Beckett, R., L uthje, S. (2004). Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 173-193.
385. Minibayeva, F. V., Kolesnikov, O. P., Gordon, L. K. (1998). Contribution of a plasma membrane redox system to the superoxide production by wheat root cells. *Protoplasma*, 205(1-4), 101-106.
386. Minibayeva, F., Kolesnikov, O., Chasov, A., Beckett, R. P., L uthje, S., Vylegzhanina, N., Buck, F., B ottger, M. (2009). Wound-induced apoplastic peroxidase activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species. *Plant, cell & environment*, 32(5), 497-508.
387. Mitsuhara, I., Malik, K. A., Miura, M., Ohashi, Y. (1999). Animal cell-death suppressors Bcl-xL and Ced-9 inhibit cell death in tobacco plants. *Current Biology*, 9(14), 775-778, S1.
388. Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in plant science*, 7(9), 405-410.
389. Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends in plant science*, 22(1), 11-19.
390. Mittler, R., Zilinskas, B. A. (1991). Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Plant Physiology*, 97(3), 962-968.
391. Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, 9(10), 490-498.

392. Mittova, V., Volokita, M., Guy, M., Tal, M. (2000). Activities of SOD and the ascorbate-glutathione cycle enzymes in subcellular compartments in leaves and roots of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii*. *Physiologia plantarum*, 110(1), 42-51.
393. Mochizuki, M., Yamazaki, S. I., Kano, K., Ikeda, T. (2002). Kinetic analysis and mechanistic aspects of autoxidation of catechins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1569(1-3), 35-44.
394. Mohammadi, M., Kazemi, H. (2002). Changes in peroxidase and polyphenol oxidase activities in susceptible and resistant wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. *Plant Science*, 162(4), 491-498.
395. Møller, S. G., McPherson, M. J. (1998). Developmental expression and biochemical analysis of the Arabidopsis atao1 gene encoding an H₂O₂-generating diamine oxidase. *The Plant Journal*, 13(6), 781-791.
396. Møller, I. M. (2001). Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annual review of plant biology*, 52(1), 561-591.
397. Møller, I. M., Jensen, P. E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 459-481.
398. Morabito, D., Guerrier, G. (2000). The free oxygen radical scavenging enzymes and redox status in roots and leaves of *Populus x Euramericana* in response to osmotic stress, desiccation and rehydration. *Journal of plant physiology*, 157(1), 74-80.
399. Moran, J. F., Becana, M., Iturbe-Ormaetxe, I., Frechilla, S., Klucas, R. V., Aparicio-Tejo, P. (1994). Drought induces oxidative stress in pea plants. *Planta*, 194(3), 346-352.
400. Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., Lo Scalzo, R. (2003). Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(25), 7418-7425.
401. Mortain-Bertrand, A., Stammitti, L., Telef, N., Colardelle, P., Brouquisse, R., Rolin, D., Gallusci, P. (2008). Effects of exogenous glucose on carotenoid accumulation in tomato leaves. *Physiologia plantarum*, 134(2), 246-256.

402. Muchuweti, M., Mupure, C. H., Ndhala, A. R., Kasiyamhuru, A. (2006). Characterization of polyphenol oxidase from *Uapaca kirkiana* fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(2), 328-332.
403. Munné-Bosch, S., Alegre, L. (2004). Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Functional Plant Biology*, 31(3), 203-216.
404. Murata, M., Tsurutani, M., Hagiwara, S., Homma, S. (1997). Subcellular location of polyphenol oxidase in apples. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(9), 1495-1499.
405. Mutsuda, M., Ishikawa, T., Takeda, T., Shigeoka, S. (1996). The catalase-peroxidase of *Synechococcus* PCC 7942: purification, nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal*, 316(1), 251-257.
406. Nakagami, H., Soukupová, H., Schikora, A., Zárský, V., Hirt, H. (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(50), 38697-38704.
407. Nicolas, J., Cheynier, V., Fleuriet, A., Rouet-Mayer, M. A. (1993). Polyphenols and enzymatic browning. *Polyphenolic phenomena*, 165-175.
408. Nikolaeva, N. N., Novitskaya, L. L. (2009). Influence of Assimilative Apparatus on Birch Wood Formation. *Acta Horticulturae*. 835,109–116.
409. Nishizawa, A., Yabuta, Y., Shigeoka, S. (2008). Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology*, 147(3), 1251-1263.
410. Nomura, T., Shiozawa, M., Ogita, S., Kato, Y. (2013). Occurrence of hydroxycinnamoylputrescines in xylogenic bamboo suspension cells. *Plant Biotechnology*, 30(5), 447-453.
411. Normanly, J. (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a001594.
412. Northcott, P. L. (1965). The effects of spiral grain on the usefulness of wood.

413. Novitskaya, L. L., Kushnir, F. V. (2006). The role of sucrose in regulation of trunk tissue development in *Betula pendula* Roth. *Journal of Plant Growth Regulation*, 25(1), 18-29.
414. Novitskaya, L., Nikolaeva, N., Galibina, N., Tarelkina, T., Semenova, L. (2016). The greatest density of parenchyma inclusions in Karelian birch wood occurs at confluences of phloem flows. *Silva Fennica*, 50(3), 1461-1478.
415. Novitskaya, L. L., Tarelkina, T. V., Galibina, N. A., Moshchenskaya, Y. L., Nikolaeva, N. N., Nikerova, K. M., Podgornaya, M. N., Sofronova, I. N., Semenova, L. I. (2020). The Formation of Structural Abnormalities in Karelian Birch Wood is Associated with Auxin Inactivation and Disrupted Basipetal Auxin Transport. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39, 378-394.
416. Novo-Uzal, E., Fernández-Pérez, F., Herrero, J., Gutiérrez, J., Gómez-Ros, L. V., Bernal, M. Á., Díaz, J., Cuello, J., Pomar, F., Pedreño, M. Á. (2013). From *Zinnia* to *Arabidopsis*: approaching the involvement of peroxidases in lignification. *Journal of experimental botany*, 64(12), 3499-3518.
417. Núñez-Delicado, E., Serrano-Megías, M., Pérez-López, A. J., López-Nicolás, J. M. (2005). Polyphenol oxidase from Dominga table grape. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(15), 6087-6093.
418. Ogawa, K. I., Kanematsu, S., Asada, K. (1996). Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" CuZn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant and Cell Physiology*, 37(6), 790-799.
419. Ogawa, K. I., Kanematsu, S., Asada, K. (1997). Generation of superoxide anion and localization of CuZn-superoxide dismutase in the vascular tissue of spinach hypocotyls: their association with lignification. *Plant and cell physiology*, 38(10), 1118-1126.
420. Olson, P. D., Varner, J. E. (1993). Hydrogen peroxide and lignification. *The Plant Journal*, 4(5), 887-892.
421. Orozco-Cardenas, M., Ryan, C. A. (1999). Hydrogen peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6553-6557.
422. Ortega-García, F., Peragón, J. (2009). The response of phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase and phenols to cold stress in the olive tree

- (*Olea europaea* L. cv. Picual). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(9), 1565-1573.
423. Paiva, J. A., Garcés, M., Alves, A., Garnier-Géré, P., Rodrigues, J. C., Lalanne, C., Porcon, S., Le Provost, G., da Silva Perez, D., Brach, J., Frigerio, J. M. (2008). Molecular and phenotypic profiling from the base to the crown in maritime pine wood-forming tissue. *New Phytologist*, 178(2), 283-301.
424. Pallett, K. E., Young, A. J. 1993. Carotenoids. In: Alscher RG, Hess JL, eds. Antioxidants in higher plants. Boca Raton, FL: CRC Press, 91–110.
425. Palma, J. M., López-Huertas, E., Corpas, F. J., Sandalio, L. M., Gómez, M., Del Río, L. A. (1998). Peroxisomal manganese superoxide dismutase: purification and properties of the isozyme from pea leaves. *Physiologia Plantarum*, 104(4), 720-726.
426. Pandey, N. (2013). Antioxidant responses and water status in *Brassica* seedlings subjected to boron stress. *Acta physiologiae plantarum*, 35(3), 697-706.
427. Pandolfi, P. P., Sonati, F., Rivi, R., Mason, P., Grosveld, F., Luzzatto, L. (1995). Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress. *The EMBO journal*, 14(21), 5209-5215.
428. Passardi, F., Penel, C., Dunand, C. (2004). Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in plant science*, 9(11), 534-540.
429. Passardi, F., Cosio, C., Penel, C., Dunand, C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant cell reports*, 24(5), 255-265.
430. Pedreno, M. A., Barcelo, A. R., Sabater, F., Munoz, R. (1989). Control by pH of cell wall peroxidase activity involved in lignification. *Plant and cell physiology*, 30(2), 237-241.
431. Peer, W. A., Cheng, Y., Murphy, A. S. (2013). Evidence of oxidative attenuation of auxin signalling. *Journal of experimental botany*, 64(9), 2629-2639.
432. Pei, Z. M., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klüsener, B., Allen, G. J., Grill, E., Schroeder, J. I. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature*, 406(6797), 731-734.

433. Pellinen, R., Palva, T., Kangasjärvi, J. (1999). Subcellular localization of ozone-induced hydrogen peroxide production in birch (*Betula pendula*) leaf cells. *The Plant Journal*, 20(3), 349-356.
434. Pellinen, R. I., Korhonen, M. S., Tauriainen, A. A., Palva, E. T., Kangasjärvi, J. (2002). Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiology*, 130(2), 549-560.
435. Peñalver, M. J., Fenoll, L. G., Rodríguez-López, J. N., García-Ruiz, P. A., García-Molina, F., Varón, R., García-Cánovas, F., Tudela, J. (2005). Reaction mechanism to explain the high kinetic autoactivation of tyrosinase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 33(1-2), 35-42.
436. Perl-Treves, R., Nacmias, B., Aviv, D., Zeelon, E. P., Galun, E. (1988). Isolation of two cDNA clones from tomato containing two different superoxide dismutase sequences. *Plant molecular biology*, 11(5), 609-623.
437. Perl-Treves, R., Galun, E. (1991). The tomato Cu, Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant molecular biology*, 17(4), 745-760.
438. Philipson, W. R., Ward, J. M., Butterfield, B. G. (1971). The vascular cambium: its development and activity. *The vascular cambium: its development and activity*.
439. Pickett-Heaps, J. D. (1968). Xylem wall deposition. *Protoplasma*, 65(1-2), 181-205.
440. Piqueras, A., Olmos, E., Martínez-Solano, J. R., Hellin, E. (1999). Cd-induced oxidative burst in tobacco BY2 cells: time course, subcellular location and antioxidant response. *Free Radical Research*, 31(sup1), 33-38.
441. Polle, A., Chakrabarti, K., Schürmann, W., Renneberg, H. (1990). Composition and properties of hydrogen peroxide decomposing systems in extracellular and total extracts from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karst.). *Plant Physiology*, 94(1), 312-319.
442. Polle, A., Otter, T., Seifert, F. (1994). Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, 106(1), 53-60.

443. Polle, A., Otter, T., Sandermann, H. (1997). Biochemistry and physiology of lignin synthesis. *Trees: contributions to modern tree physiology*.
444. Pitzschke, A., Hirt, H. (2006). Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling in plants. *Plant physiology*, *141*(2), 351-356.
445. Polovnikova, M. G., Voskresenskaya, O. L. (2008). Activities of antioxidant system components and polyphenol oxidase in ontogeny of lawn grasses under megapolis conditions. *Russian Journal of Plant Physiology*, *55*(5), 699-705.
446. Pope, D. J., Marcroft, J. P., Whale, L. R. J. (2005). The effect of global slope of grain on the bending strength of scaffold boards. *Holz als Roh-und Werkstoff*, *63*(5), 321-326.
447. Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Palme, K. J., Jansen, M. A. (2007). Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in plant science*, *12*(3), 98-105.
448. Potters, G., Pasternak, T. P., Guisez, Y., Jansen, M. A. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, cell & environment*, *32*(2), 158-169.
449. Pourcel, L., Routaboul, J. M., Kerhoas, L., Caboche, M., Lepiniec, L., Debeaujon, I. (2005). TRANSPARENT TESTA10 encodes a laccase-like enzyme involved in oxidative polymerization of flavonoids in *Arabidopsis* seed coat. *The Plant Cell*, *17*(11), 2966-2980.
450. Powers, S. K., Lennon, S. L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proceedings of the Nutrition Society*, *58*(4), 1025-1033.
451. Prasad, T. K. (1996). Mechanisms of chilling-induced oxidative stress injury and tolerance in developing maize seedlings: changes in antioxidant system, oxidation of proteins and lipids, and protease activities. *The Plant Journal*, *10*(6), 1017-1026.
452. Preston, R. D. (1950). Spiral structure and spiral growth: the development of spiral grain in conifers. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, *23*(1), 48-55.

453. Price, J., Laxmi, A., Martin, S. K. S., Jang, J. C. (2004). Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 16(8), 2128-2150.
454. Prochazkova, D., Sairam, R. K., Srivastava, G. C., Singh, D. V. (2001). Oxidative stress and antioxidant activity as the basis of senescence in maize leaves. *Plant Science*, 161(4), 765-771.
455. Pyszyński, W. (1980). Pattern of ray arrangement on cross section of bark of *Aesculus*. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 49(4), 415-422.
456. Queiroz, C., Mendes Lopes, M. L., Fialho, E., Valente-Mesquita, V. L. (2008). Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control. *Food reviews international*, 24(4), 361-375.
457. Ramel, F., Sulmon, C., Bogard, M., Couée, I., Gouesbet, G. (2009). Differential patterns of reactive oxygen species and antioxidative mechanisms during atrazine injury and sucrose-induced tolerance in *Arabidopsis thaliana* plantlets. *BMC Plant Biology*, 9(1), 28.
458. Ramu, S. K., Peng, H. M., Cook, D. R. (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene rip1 in *Medicago truncatula*. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(6), 522-528.
459. Ranieri, A., D'urso, G., Nali, C., Lorenzini, G., Soldatini, G. F. (1996). Ozone stimulates apoplastic antioxidant systems in pumpkin leaves. *Physiologia Plantarum*, 97(2), 381-387.
460. Ranocha, P., McDougall, G., Hawkins, S., Sterjiades, R., Borderies, G., Stewart, D., Cabanes-Macheteau, M., Boudet, A. M., Goffner, D. (1999). Biochemical characterization, molecular cloning and expression of laccases—a divergent gene family—in poplar. *European Journal of Biochemistry*, 259(1-2), 485-495.
461. Ranocha, P., Chabannes, M., Chamayou, S., Danoun, S., Jauneau, A., Boudet, A. M., Goffner, D. (2002). Laccase down-regulation causes alterations in phenolic metabolism and cell wall structure in poplar. *Plant Physiology*, 129(1), 145-155.

462. Rathjen, A. H., Robinson, S. P. (1992). Aberrant processing of polyphenol oxidase in a variegated grapevine mutant. *Plant physiology*, 99(4), 1619-1625.
463. Rausch, T., Greiner, S. (2004). Plant protein inhibitors of invertases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1696(2), 253-261.
464. Raychaudhuri, S. S., Deng, X. W. (2000). The role of superoxide dismutase in combating oxidative stress in higher plants. *The Botanical Review*, 66(1), 89-98.
465. Raymond, J., Rakariyatham, N., Azanza, J. L. (1993). Purification and some properties of polyphenoloxidase from sunflower seeds. *Phytochemistry*, 34(4), 927-931.
466. Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Furtmüller, P. G., Rueker, F., Switala, J., Loewen, P. C., Obinger, C. (2001). The role of distal tryptophan in the bifunctional activity of catalase-peroxidases. *Biochemical Society Transactions*, 29(2), 99-105;
467. Regelsberger, G., Jakopitsch, C., Plasser, L., Schwaiger, H., Furtmüller, P. G., Peschek, G. A., Zámocký, M., Obinger, C. (2002). Occurrence and biochemistry of hydroperoxidases in oxygenic phototrophic prokaryotes (cyanobacteria). *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(6-8), 479-490.
468. Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. (2003). The water-water cycle is essential for chloroplast protection in the absence of stress. *Journal of Biological Chemistry*, 278(40), 38921-38925.
469. Robertson, D., Beech, I., Bolwell, G. P. (1995). Regulation of the enzymes of UDP-sugar metabolism during differentiation of French bean. *Phytochemistry*, 39(1), 21-28.
470. Rodrigues, L. C. A., Martins, J. P. R., de Almeida Júnior, O., Guilherme, L. R. G., Pasqual, M., de Castro, E. M. (2017). Tolerance and potential for bioaccumulation of *Alternanthera tenella* Colla to cadmium under in vitro conditions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 130(3), 507-519.
471. Rodriguez, A. A., Grunberg, K. A., Taleisnik, E. L. (2002). Reactive oxygen species in the elongation zone of maize leaves are necessary for leaf extension. *Plant Physiology*, 129(4), 1627-1632.
472. Rodríguez-López, J. N., Gilabert, M. A., Tudela, J., Thorneley, R. N., García-Cánovas, F. (2000). Reactivity of horseradish peroxidase compound II

- toward substrates: kinetic evidence for a two-step mechanism. *Biochemistry*, 39(43), 13201-13209.
473. Roitsch, T., González, M. C. (2004). Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. *Trends in plant science*, 9(12), 606-613.
474. Roitto, M., Ahonen-Jonnarth, U., Lamppu, J., Huttunen, S. (1999). Apoplastic and total peroxidase activities in Scots pine needles at subarctic polluted sites. *European journal of forest pathology*, 29(6), 399-410.
475. Rolland, F., Moore, B., Sheen, J. (2002). Sugar sensing and signaling in plants. *The plant cell*, 14(suppl 1), S185-S205.
476. Rolland, F., Baena-Gonzalez, E., Sheen, J. (2006). Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 675-709.
477. Ros Barceló, A. (2000). Peroxidase and H₂O₂ production by plant cells: truths and clues. *Curr Top Phytochem*, 3, 197-202.
478. Ros-Barceló, A., Pomar, F., López-Serrano, M., Martínez, P., Pedreño, M. A. (2002). Developmental regulation of the H₂O₂-producing system and of a basic peroxidase isoenzyme in the *Zinnia elegans* lignifying xylem. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(4), 325-332.
479. Ros-Barceló, A., Gómez-Ros, L. V., Ferrer, M. A., Hernández, J. A. (2006). The apoplastic antioxidant enzymatic system in the wood-forming tissues of trees. *Trees*, 20(2), 145-156.
480. Ros-Barceló, A., Gómez-Ros, L. V. (2009). Reactive Oxygen Species in Plant Cell Walls / Reactive Oxygen Species in Plant Signaling. Signaling and Communication in Plants. Eds. L. Rio, A. Pупpo. Springer, Berlin, Heidelberg, 73-93.
481. Ros, L. G., Paradiso, A., Gabaldón, C., Pedreño, M. A., De Gara, L., Barceló, A. R. (2006). Two distinct cell sources of H₂O₂ in the lignifying *Zinnia elegans* cell culture system. *Protoplasma*, 227(2-4), 175-183.
482. Rossel, J. B., Wilson, I. W., Pogson, B. J. (2002). Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130(3), 1109-1120.

483. Rouhier, N., Vlamis-Gardikas, A., Lillig, C. H., Berndt, C., Schwenn, J. D., Holmgren, A., Jacquot, J. P. (2003). Characterization of the redox properties of poplar glutaredoxin. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(1), 15-22.
484. Ruan, Y. L. (2014). Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annual review of plant biology*, 65, 33-67.
485. Rucińska, R., Wapłak, S., Gwóźdź, E. A. (1999). Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupin roots exposed to lead. *Plant Physiology and Biochemistry*, 37(3), 187-194.
486. Ryu, J. Y., Song, J. Y., Lee, J. M., Jeong, S. W., Chow, W. S., Choi, S. B., Pogson, B. J., Park, Y. I. (2004). Glucose-induced expression of carotenoid biosynthesis genes in the dark is mediated by cytosolic pH in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Journal of Biological Chemistry*, 279(24), 25320-25325.
487. Saab-Rincon, G., Valderrama, B. (2009). Protein engineering of redox-active enzymes. *Antioxidants & redox signaling*, 11(2), 167-192.
488. Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Changes in antioxidant activity in sub-cellular fractions of tolerant and susceptible wheat genotypes in response to long term salt stress. *Plant Science*, 162(6), 897-904.
489. Sairam, R. K., Singh, D. V., Srivastava G. C. (2003) Changes in activity of activity of antioxidant enzymes in sunflower leaves of different ages. *Biologia Plantarum*, 47(1), 61–66.
490. Sakihama, Y., Mano, J. I., Sano, S., Asada, K., Yamasaki, H. (2000). Reduction of phenoxyl radicals mediated by monodehydroascorbate reductase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279(3), 949-954.
491. Sakihama, Y., Yamasaki, H. (2002). Lipid peroxidation induced by phenolics in conjunction with aluminum ions. *Biologia Plantarum*, 45(2), 249-254.
492. Salvemini, F., Franzé, A., Iervolino, A., Filosa, S., Salzano, S., Ursini, M. V. (1999). Enhanced glutathione levels and oxidoresistance mediated by increased glucose-6-phosphate dehydrogenase expression. *Journal of Biological Chemistry*, 274(5), 2750-2757.

493. Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D., Puppo, A. (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Molecular plant-microbe interactions*, 14(1), 86-89.
494. Sasaki, S., Baba, K. I., Nishida, T., Tsutsumi, Y., Kondo, R. (2006). The cationic cell-wall-peroxidase having oxidation ability for polymeric substrate participates in the late stage of lignification of *Populus alba* L. *Plant molecular biology*, 62(6), 797-807.
495. Sato, Y., Sugiyama, M., Górecki, R. J., Fukuda, H., Komamine, A. (1993). Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia*. *Planta*, 189(4), 584-589.
496. Sato, Y., Sugiyama, M., Komamine, A., Fukuda, H. (1995). Separation and characterization of the isoenzymes of wall-bound peroxidase from cultured *Zinnia* cells during tracheary element differentiation. *Planta*, 196(1), 141-147.
497. Savidge, R. A., Farrar, J. L. (1984). Cellular adjustments in the vascular cambium leading to spiral grain formation in conifers. *Canadian journal of botany*, 62(12), 2872-2879.
498. Savidge, R. A. (1996). Xylogenesis, genetic and environmental regulation. *Iawa Journal*, 17(3), 269-310.
499. Savitsky, P. A., Gazaryan, I. G., Tishkov, V. I., Lagrimini, L. M., Ruzgas, T., Gorton, L. (1999). Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochemical journal*, 340(3), 579-583.
500. Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875-3883.
501. Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38(7), 995-1014.
502. Scheibe, R., Backhausen, J. E., Emmerlich, V., Holtgreffe, S. (2005). Strategies to maintain redox homeostasis during photosynthesis under changing conditions. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1481-1489.

503. Schopfer, P. (2001). Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal*, 28(6), 679-688.
504. Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G., Wagner, A. (2002). Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta*, 214(6), 821-828.
505. Schraudner, M., Moeder, W., Wiese, C., Camp, W. V., Inzé, D., Langebartels, C., Sandermann Jr, H. (1998). Ozone-induced oxidative burst in the ozone biomonitor plant, tobacco Bel W3. *The Plant Journal*, 16(2), 235-245.
506. Schuetz, M., Smith, R., Ellis, B. (2013). Xylem tissue specification, patterning, and differentiation mechanisms. *Journal of experimental botany*, 64(1), 11-31.
507. Schulgasser, K., Witzum, A. (2007). The mechanism of spiral grain formation in trees. *Wood Science and Technology*, 41(2), 133-156
508. Schürmann, P. (2003). Redox signaling in the chloroplast: the ferredoxin/thioredoxin system. *Antioxidants and Redox Signaling*, 5(1), 69-78.
509. Scioli, J. R., Zilinskas, B. A. (1988). Cloning and characterization of a cDNA encoding the chloroplastic copper/zinc-superoxide dismutase from pea. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(20), 7661-7665.
510. Sgherri, C., Cosi, E., Navari-Izzo, F. (2003). Phenols and antioxidative status of *Raphanus sativus* grown in copper excess. *Physiologia Plantarum*, 118(1), 21-28.
511. Shao, H. B., Guo, Q. J., Chu, L. Y., Zhao, X. N., Su, Z. L., Hu, Y. C., Cheng, J. F. (2007). Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 54(1), 37-45.
512. Shao, H. B., Chu, L. Y., Lu, Z. H., Kang, C. M. (2008a). Primary antioxidant free radical scavenging and redox signaling pathways in higher plant cells. *International Journal of Biological Sciences*, 4(1), 8-14.
513. Shao, H. B., Chu, L. Y., Shao, M. A., Jaleel, C. A., Hong-mei, M. (2008b). Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *Comptes rendus biologiques*, 331(6), 433-441.

514. Shaw, J. F., Chao, L. C., Chen, M. H. (1991). Isozymes of papaya polyphenol oxidase. *Bot. Bull. Acad. Sin*, 32, 259-263.
515. Sheptovitsky, Y. G., Brudvig, G. W. (1996). Isolation and characterization of spinach photosystem II membrane-associated catalase and polyphenol oxidase. *Biochemistry*, 35(50), 16255-16263.
516. Shin, R., Froderman, T., Flurkey, W. H. (1997). Isolation and characterization of a mung bean leaf polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, 45(1), 15-21.
517. Sipilä, A. J., Karhunen, P. P. T., Lahtinen, M. H. (2004). On the role of dibenzodioxocins in lignin biosynthesis. In *XXII International Conference on Polyphenols* (pp. 55-56).
518. Skatter, S., Kucera, B. (1998). The cause of the prevalent directions of the spiral grain patterns in conifers. *Trees*, 12(5), 265-273.
519. Skulachev, V. P. (2006). Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis*, 11(4), 473-485.
520. Smeeckens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 51(1), 49-81.
521. Smirnoff, N., Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
522. Smirnoff, N., Pallanca, J. E. (1996). Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochemical Society Transactions*, 24(2), 472-476.
523. Smirnoff, N. (2000). Ascorbic acid: metabolism and functions of a multifaceted molecule. *Current opinion in plant biology*, 3(3), 229-235.
524. Smirnoff, N., Conklin, P. L., Loewus, F. A. (2001). Biosynthesis of ascorbic acid in plants: a renaissance. *Annual review of plant biology*, 52(1), 437-467.
525. Sorce, C., Giovannelli, A., Sebastiani, L., Anfodillo, T. (2013). Hormonal signals involved in the regulation of cambial activity, xylogenesis and vessel patterning in trees. *Plant cell reports*, 32(6), 885-898.
526. Srivastava, O. P., Huystee, R. V. (1977). An interrelationship among peroxidase, IAA oxidase, and polyphenol oxidase from peanut cells. *Canadian Journal of Botany*, 55(20), 2630-2635.

527. Srivastava, V., Schinkel, H., Witzell, J., Hertzberg, M., Torp, M., Srivastava, M. K., Karpinska, B., Melzer, M., Wingsle, G. (2007). Downregulation of high-isoelectric-point extracellular superoxide dismutase mediates alterations in the metabolism of reactive oxygen species and developmental disturbances in hybrid aspen. *The Plant Journal*, 49(1), 135-148.
528. Steffens, J. C., Harel, E., Hunt, M. D. (1994). Polyphenol oxidase. In *Genetic engineering of plant secondary metabolism* (pp. 275-312). Springer, Boston, MA.
529. Streller, S., Karpinski, S., Hällgren, J. E., Wingsle, G. (1994). Four cytosolic-type CuZn-superoxide dismutases in germinating seeds of *Pinus sylvestris*. *Physiologia Plantarum*, 92(3), 443-450.
530. Steller, S., Wingsle, G. (1994). *Pinus sylvestris* L. needles contain extracellular CuZn superoxide dismutase. *Planta*, 192(2), 195-201.
531. Sturm, A., Tang, G. Q. (1999). The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. *Trends in plant science*, 4(10), 401-407.
532. Sudachkova, N. E., Milyutina, I. L., Romanova, L. I., Semenova, G. P. (2004). The Annual Dynamics of Reserve Compounds and Hydrolytic Enzymes Activity in the Tissues of *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb.: The Metabolism of Reserve Compounds in the Tissues of Siberian Conifers. *Eurasian Journal of Forest Research*, 7(1), 1-10.
533. Sulmon, C., Gouesbet, G., El Amrani, A., Couée, I. (2006). Sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis* seedlings involves activation of oxidative and xenobiotic stress responses. *Plant Cell Reports*, 25(5), 489-498.
534. Sundberg, B. (2000). Cambial growth and auxin gradients. *Cell and molecular biology of wood formation*, 169-188.
535. Suzuki, N., Mittler, R. (2006). Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia plantarum*, 126(1), 45-51.
536. Szerszen, J. B., Szczyglowski, K., Bandurski, R. S. (1994). *iaglu*, a gene from *Zea mays* involved in conjugation of growth hormone indole-3-acetic acid. *Science*, 265(5179), 1699-1701.

537. Sztein, A. E., Cohen, J. D., Slovin, J. P., Cooke, T. J. (1995). Auxin metabolism in representative land plants. *American journal of Botany*, 82(12), 1514-1521.
538. Takahama, U. (1989). A Role of Hydrogen Peroxide in the Metabolism of Phenolics in Mesophyll Cells of *Vicia faba* L. *Plant and cell physiology*, 30(2), 295-301.
539. Takahama, U. (2004). Oxidation of vacuolar and apoplastic phenolic substrates by peroxidase: physiological significance of the oxidation reactions. *Phytochemistry Reviews*, 3(1-2), 207-219.
540. Takahashi, S., Murata, N. (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in plant science*, 13(4), 178-182.
541. Takemoto, D., Tanaka, A., Scott, B. (2007). NADPH oxidases in fungi: diverse roles of reactive oxygen species in fungal cellular differentiation. *Fungal Genetics and Biology*, 44(11), 1065-1076.
542. TAPPI (T222 om-11). 2011. Acid-insoluble lignin in wood and pulp, TAPPI Press, Atlanta, GA.
543. Tausz, M., Wonisch, A., Grill, D., Morales, D., Jiménez, M. S. (2003). Measuring antioxidants in tree species in the natural environment: from sampling to data evaluation. *Journal of Experimental Botany*, 54(387), 1505-1510.
544. Tekchandani, S., Guruprasad, K. N. (1998). Modulation of a guaiacol peroxidase inhibitor by UV-B in cucumber cotyledons. *Plant science*, 136(2), 131-137.
545. Thipyapong, P., Hunt, M. D., Steffens, J. C. (2004). Antisense downregulation of polyphenol oxidase results in enhanced disease susceptibility. *Planta*, 220(1), 105-117.
546. Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y., Collinge, D. B. (1997). Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11(6), 1187-1194.
547. Tognetti, V. B., Mühlenbock, P. E. R., Van Breusegem, F. (2012). Stress homeostasis—the redox and auxin perspective. *Plant, cell & environment*, 35(2), 321-333.

548. Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288(1-2), 129-138.
549. Toivonen, P. M., Brummell, D. A. (2008). Biochemical bases of appearance and texture changes in fresh-cut fruit and vegetables. *Postharvest biology and technology*, 48(1), 1-14.
550. Torres, M. A., Dangl, J. L., Jones, J. D. (2002). Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), 517-522.
551. Torres, M. A., Dangl, J. L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current opinion in plant biology*, 8(4), 397-403.
552. Trebst, A., Depka, B. (1995). Polyphenol oxidase and photosynthesis research. *Photosynthesis Research*, 46(1-2), 41-44.
553. Treutter, D. (2006). Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 4(3), 147.
554. Tsutsumi, Y., Matsui, K., Sakai, K. (1998). Substrate-specific peroxidases in woody angiosperms and gymnosperms participate in regulating the dehydrogenative polymerization of syringyl and guaiacyl type lignins. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 52(3), 275-281.
555. Türkan, I., Bor, M., Özdemir, F., Koca, H. (2005). Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* L. subjected to polyethylene glycol mediated water stress. *Plant Science*, 168(1), 223-231.
556. Tuskan, G. A., Difazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U., Putnam, N., Ralph, S., Rombauts, S., Salamov, A. and Schein, J. (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793), 1596-1604.
557. Tzeng, D. D. S., Tzeng, H. C., Chen, R. S., Cheng, A. H., Tsai, C. C., Chen, C. W., Hwang, T. C., Yeh, Y., DeVay, J. E. (1996). The use of MR formulation as

- a novel and environmentally safe photodynamic fungicide for the control of powdery mildews. *Crop Protection*, 15(4), 341-347.
558. Ünal, M. Ü., Şener, A. (2006). Determination of some biochemical properties of polyphenol oxidase from Emir grape (*Vitis vinifera* L. cv. Emir). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(14), 2374-2379.
559. Vámos-Vigyázó, L., Haard, N. F. (1981). Polyphenol oxidases and peroxidases in fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 15(1), 49-127.
560. Van Breusegem, F., Vranová, E., Dat, J. F., Inzé, D. (2001). The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science*, 161(3), 405-414.
561. Van Camp, W., Bowler, C., Villarroel, R., Tsang, E. W., Van Montagu, M., Inze, D. (1990). Characterization of iron superoxide dismutase cDNAs from plants obtained by genetic complementation in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(24), 9903-9907.
562. Van Camp, W., Inzé, D., Van Montagu, M. (1997). The regulation and function of tobacco superoxide dismutases. *Free Radical Biology and Medicine*, 23(3), 515-520.
563. Van den Ende, W., Valluru, R. (2008). Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging? *Journal of experimental botany*, 60(1), 9-18.
564. Van Gelder, C. W., Flurkey, W. H., Wichers, H. J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry*, 45(7), 1309-1323.
565. Van Leeuwen, J., Wichers, H. J. (1999). Tyrosinase activity and isoform composition in separate tissues during development of *Agaricus bisporus* fruit bodies. *Mycological Research*, 103(4), 413-418.
566. Van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-162.
567. Van Montfort, R. L., Congreve, M., Tisi, D., Carr, R., Jhoti, H. (2003). Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. *Nature*, 423(6941), 773-777.

568. Vanacker, H., Carver, T. L., Foyer, C. H. (1998a). Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology*, 117(3), 1103-1114.
569. Vanacker, H., Harbinson, J., Ruisch, J., Carver, T. L. W., Foyer, C. H. (1998b). Antioxidant defences of the apoplast. *Protoplasma*, 205(1-4), 129-140.
570. Vasse, J., de Billy, F., Truchet, G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*—alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal*, 4(3), 555-566.
571. Vatankhah, E., Niknam, V., Ebrahimzadeh, H. (2010). Activity of antioxidant enzyme during in vitro organogenesis in *Crocus sativus*. *Biologia Plantarum*, 54(3), 509-514.
572. Vaughn, K. C., Duke, S. O. (1984). Function of polyphenol oxidase in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 60(1), 106-112.
573. Vaughn, K. C., Lax, A. R., Duke, S. O. (1988). Polyphenol oxidase: the chloroplast oxidase with no established function. *Physiologia Plantarum*, 72(3), 659-665.
574. Velling, P., Viherä-Aarnio, A., Hagqvist, R., Lehto, J. (2000). Valuable wood as a result of abnormal cambial activity—the case of *Betula pendula* var. *carelica*. *Cell and Molecular Biology of Wood Formation/Ed. Savidge, RA, Barnett, JR & Napier, R.*
575. Vernoux, T., Wilson, R. C., Seeley, K. A., Reichheld, J. P., Muroy, S., Brown, S., Maughan, S. C., Cobbett, C. S., Van Montagu, M., Inzé, D., May, M. J., Sung, Z. R. (2000). The ROOT MERISTEMLESS1/CADMIUM SENSITIVE2 gene defines a glutathione-dependent pathway involved in initiation and maintenance of cell division during postembryonic root development. *The Plant Cell*, 12(1), 97-109.
576. Vité, J. P., Rudinsky, J. A. (1959). The water-conducting systems in conifers and their importance to the distribution of trunk injected chemicals. *Contrib. Boyce Thompson Inst*, 20(1), 27-38.
577. Wagner, D., Przybyla, D., op den Camp, R., Kim, C., Landgraf, F., Lee, K. P., Wüsch, M., Laloi, C., Nater, M., Hideg, E. and Apel, K. (2004). The genetic

- basis of singlet oxygen–induced stress responses of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 306(5699), 1183-1185.
578. Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D. P., Mauch, F. (2002). Probing the diversity of the *Arabidopsis glutathione* S-transferase gene family. *Plant molecular biology*, 49(5), 515-532.
579. Walker, J. R., Ferrar, P. H. (1998). Diphenol oxidases, enzyme-catalysed browning and plant disease resistance. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 15(1), 457-498.
580. Wang, L., Cook, A., Patrick, J. W., Chen, X. Y., Ruan, Y. L. (2014). Silencing the vacuolar invertase gene GhVIN 1 blocks cotton fiber initiation from the ovule epidermis, probably by suppressing a cohort of regulatory genes via sugar signaling. *The Plant Journal*, 78(4), 686-696.
581. Wang, S. Y., Jiao, H. J., Faust, M. (1991). Changes in the activities of catalase, peroxidase, and polyphenol oxidase in apple buds during bud break induced by thidiazuron. *Journal of Plant Growth Regulation*, 10(1-4), 33-39.
582. Webb, K. J., Cookson, A., Allison, G., Sullivan, M. L., Winters, A. L. (2014). Polyphenol oxidase affects normal nodule development in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Frontiers in plant science*, 5, article 700.
583. Weir, I. E., Maddumage, R., Allan, A. C., Ferguson, I. B. (2005). Flow cytometric analysis of tracheary element differentiation in *Zinnia elegans* cells. *Cytometry Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 68(2), 81-91.
584. Welinder, K. G. (1992). Plant peroxidases: structure-function relationships. In *Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects* (pp. 1-24).
585. Wellen, K. E., Thompson, C. B. (2010). Cellular metabolic stress: considering how cells respond to nutrient excess. *Molecular cell*, 40(2), 323-332.
586. Wendel, A. (1988). Enzymes acting against reactive oxygen. *Enzymes: Tools and Targets.–Basel: Karger*, 161-167.
587. Werker, E., Marbach, I., Mayer, A. M. (1979). Relation between the anatomy of the testa, water permeability and the presence of phenolics in the genus *Pisum*. *Annals of botany*, 43(6), 765-771.

588. Whitaker, J. R., Stauffer, C. E. (1994). Principles of Enzymology for the Food Sciences (2nd edn). *Trends in Food Science and Technology*, 5(9), 304-304.
589. White, J. A., Plant, S., Cannon, R. E., Wadsworth, G. J., Scandalios, J. G. (1990). Developmental analysis of steady-state levels of Cu/Zn and Mn superoxide dismutase mRNAs in maize tissues. *Plant and cell physiology*, 31(8), 1163-1167.
590. White, J. A., Scandalios, J. G. (1988). Isolation and characterization of a cDNA for mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD-3) of maize and its relation to other manganese superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 951(1), 61-70.
591. Willekens, H., Inzé, D., Van Montagu, M., Van Camp, W. (1995). Catalases in plants. *Molecular Breeding*, 1(3), 207-228.
592. Wuyts, N., De Waele, D., Swennen, R. (2006). Extraction and partial characterization of polyphenol oxidase from banana (*Musa acuminata* Grande naine) roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, 44(5-6), 308-314.
593. Yamasaki, H., Grace, S. C. (1998). EPR detection of phytophenoxyl radicals stabilized by zinc ions: evidence for the redox coupling of plant phenolics with ascorbate in the H₂O₂-peroxidase system. *FEBS letters*, 422(3), 377-380.
594. Yang, H., Zhou, C., Wu, F., Cheng, J. (2010). Effect of nitric oxide on browning and lignification of peeled bamboo shoots. *Postharvest Biology and Technology*, 57(1), 72-76.
595. Yang, T. P. B. W., Poovaiah, B. W. (2002). Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(6), 4097-4102.
596. Yoshioka, H., Numata, N., Nakajima, K., Katou, S., Kawakita, K., Rowland, O., Jones, J. D. G., Doke, N. (2003). *Nicotiana benthamiana* gp91phox homologs *NbrbohA* and *NbrbohB* participate in H₂O₂ accumulation and resistance to *Phytophthora infestans*. *The Plant Cell*, 15(3), 706-718.
597. Zagórska-Marek, B., Little, C. H. A. (1986). Control of fusiform initial orientation in the vascular cambium of *Abies balsamea* stems by indol-3-ylacetic acid. *Canadian journal of botany*, 64(6), 1120-1128.

598. Zamocky, M., Furtmüller, P. G., Obinger, C. (2008). Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1527-1548.
599. Zawistowski, J. (1991). Polyphenol oxidase. *Oxidative enzymes in foods*, 217-274.
600. Zhang, C., Han, L., Slewinski, T. L., Sun, J., Zhang, J., Wang, Z. Y., Turgeon, R. (2014). Symplastic phloem loading in poplar. *Plant physiology*, 166(1), 306-313.
601. Zhao, H. J., Zou, Q. (2002). Protective effects of exogenous antioxidants and phenolic compounds on photosynthesis of wheat leaves under high irradiance and oxidative stress. *Photosynthetica*, 40(4), 523-527.
602. Zhu, D., Scandalios, J. G. (1993). Maize mitochondrial manganese superoxide dismutases are encoded by a differentially expressed multigene family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9310-9314.
603. Zhy, Z., Zhan, L. (2010). Characterization of polyphenol oxidase from water caltrop (*Trapa acornis* Nakano) fruits. *Journal of food biochemistry*, 34(6), 1125-1140.
604. Ziyani, E., Pekyardimci, Ş. (2004). Purification and characterization of pear (*Pyrus communis*) polyphenol oxidase. *Turkish Journal of Chemistry*, 28(5), 547-557.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Патент Российской Федерации № 2596013

«Способ диагностики узорчатой текстуры древесины карельской березы»

(Галибина Н. А., Никерова К. М.)

Формула изобретения. Способ диагностики узорчатой текстуры древесины карельской березы, включающий определение активности пероксидазы в ткани растений березы и выявление ее корреляции со степенью узорчатости древесины, отличающийся тем, что активность пероксидазы определяют у растений березы с признаками бугорчатости в возрасте >15 лет в период активного камбиального роста в ксилемной ткани в реакции окисления гваякола при рН 4.8, при этом активность пероксидазы прямо пропорционально коррелирует со степенью узорчатости древесины.

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2596013

**СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ УЗОРЧАТОЙ ТЕКСТУРЫ
ДРЕВЕСИНЫ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ**

Патентообладатель(ли): *Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт леса Карельского научного центра Российской академии наук (ИЛ КарНЦ РАН) (RU)*

Автор(ы): *см. на обороте*

Заявка № 2015114510

Принят изобретения 17 апреля 2015 г.

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 08 августа 2016 г.

Срок действия патента истекает 17 апреля 2035 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

 *Е.В. Нестеров*



РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



(19) **RU** (11) **2 596 013**⁽¹³⁾ **C1**

(51) МПК
A01G 2300 (2006.01)
A01G 700 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21)(22) Заявка: 2015114510/13, 17.04.2015

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.04.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 17.04.2015

(45) Опубликовано: 27.08.2016 Бюл. № 24

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: ГАЛИБИНА Н.А. и др. Активность
пероксидазы в органах и тканях деревьев
березы повислой//Ученые записки
Петрозаводского гос. ун-та, Биология, N4,
июнь, 2013, пост. в ред. 28.03.2013;RU 2063679
C1, 20.07.1996;НОВИЦКАЯ Л.Л. и др.
Узорчатая древесина карельской березы//
Природа, сер. Ботаника, N3, 2005, с.23-29;
MARJAMAA K. et al. The role of xylem (см.
прод.)

Адрес для переписки:

185910, Респ. Карелия, г. Петрозаводск, ул.
Пушкинская, 11, Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки Институт леса
Карельского научного центра Российской
академии наук (ИЛ КарНЦ РАН)

(72) Автор(ы):

Галибина Наталья Алексеевна (RU),
Никерова Ксения Михайловна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт леса
Карельского научного центра Российской
академии наук (ИЛ КарНЦ РАН) (RU)

RU 2 596 013 C 1

RU 2 596 013 C 1

(54) СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ УЗОРЧАТОЙ ТЕКСТУРЫ ДРЕВЕСИНЫ КАРЕЛЬСКОЙ БЕРЕЗЫ

(57) Формула изобретения

Способ диагностики узорчатой текстуры древесины карельской березы, включающий
определение активности пероксидазы в ткани растений березы и выявление ее
корреляции со степенью узорчатости древесины, отличающийся тем, что активность
пероксидазы определяют у растений березы с признаками бугорчатости в возрасте ≥ 15
лет в период активного камбиального роста в кисломной ткани в реакции окисления
гваякола при pH 4,8, при этом активность пероксидазы прямо пропорционально
коррелирует со степенью узорчатости древесины.

(56) (продолжение):

class III peroxidases in lignification // Journal of Experimental Botany, Vol. 60, No. 2, 2009, p. 367-;376.