

КАЗАНСКИЙ ИНСТИТУТ БИОХИМИИ И БИОФИЗИКИ – ОБОСОБЛЕННОЕ  
СТРУКТУРНОЕ ПОДРАЗДЕЛЕНИЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО  
БЮДЖЕТНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ НАУКИ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР «КАЗАНСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*

Онеле Алфред Обинна

**Биохимические и молекулярные особенности пероксидаз мха *Dicranum scoparium* Hedw.**

1.5.21. Физиология и биохимия растений

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Часов Андрей Васильевич

Казань – 2021

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ .....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1. Ботаническое описание <i>Dicranum scoparium</i> Hedw. ....	12
1.2. Стрессовая устойчивость бриофитов .....	13
1.2.1. Устойчивость к обезвоживанию .....	13
1.2.2. Устойчивость к неблагоприятной температуре.....	16
1.2.3. Устойчивость к тяжёлым металлам .....	17
1.3. Образование активных форм кислорода и роль при абиотическом стрессе .....	19
1.3.1. Система антиоксидантной защиты растений.....	22
1.4. Гем-содержащие пероксидазы .....	23
1.4.1. Классификация пероксидаз .....	23
1.4.1.1. Суперсемейство пероксидазы-циклооксигеназы.....	24
1.4.1.2. Суперсемейство пероксидазы-каталазы .....	24
1.4.1.2.1. Пероксидазы I класса .....	24
1.4.1.2.2. Пероксидазы II класса.....	24
1.4.1.2.3. Пероксидазы III класса .....	25
1.4.1.2.3.1. Гены пероксидаз III класса .....	28
1.4.1.2.3.2. Функции пероксидаз III класса .....	29
1.5. Аскорбатпероксидаза.....	32
1.5.1. Гены APX.....	34
1.5.2. Функции APX.....	35
1.6. Заключение к Обзору литературы .....	36
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	38
2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	38
2.1. Объекты исследования.....	38
2.2.1. Получение ферментативной вытяжки .....	38
2.2.2. Фракционирование белков клеточной стенки <i>D. scoparium</i> .....	38
2.3. Стрессовые воздействия .....	39
2.3.1. Обезвоживание .....	39
2.3.2. Воздействие CdCl <sub>2</sub> , параоквата и температуры (-20° С, +30° С, +50° С) .....	39
2.4. Определение сухой массы мхов.....	39
2.5. Определение активности окислительно-восстановительных ферментов.....	40
2.6. Электрофоретическое разделение белков.....	41

2.6.1. Визуализация активности пероксидаз .....	41
2.7. Образование активных форм кислорода .....	41
2.7.1. Интенсивность образования супероксидного анион-радикала.....	41
2.7.2. Определение образования гидроксильного радикала.....	42
2.7.3. Определение содержания перекиси водорода .....	42
2.8. Очистка белков .....	42
2.8.1. Ионообменная хроматография .....	42
2.9. Выделение РНК и синтез двухцепочечной кДНК.....	43
2.10. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле .....	43
2.11. Молекулярное клонирование ДНК.....	43
2.13. Биоинформатический анализ .....	44
2.13.1. Идентификация пероксидазы класса III в <i>D. scoparium</i> .....	44
2.13.2. Идентификация аскорбатпероксидазы в <i>D. scoparium</i> .....	45
2.13.3. Анализ последовательностей и предсказание субклеточной локализации пероксидаз	45
2.13.4. Анализ консервативных мотивов и доменов пероксидаз.....	46
2.13.5. Анализ функциональных сайтов и предсказание посттрансляционных модификаций пероксидаз.....	46
2.13.6. Анализ вторичной и третичной структуры белков .....	46
2.13.7. Филогенетический и сравнительный анализы последовательности белков пероксидаз .....	46
2.14. Анализ экспрессии генов.....	46
2.14.1. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК при помощи ОТ-ПЦР.....	46
2.14.2. Амплификация участков кДНК с помощью ПЦР-РВ.....	47
2.15. Статистическая обработка данных .....	48
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	49
3.1. Образование АФК в <i>D. scoparium</i> .....	49
3.2. Активность редокс-ферментов <i>D. scoparium</i> .....	51
3.2.1. Активность пероксидаз в цикле обезвоживание/регидратация в <i>D. scoparium</i> .....	54
3.2.2. Локализация пероксидазы класса III во фракции мха <i>D. scoparium</i> и возможная роль пероксидазы в образовании $O_2^{\cdot-}$ .....	58
3.2.3. Внутри- и внеклеточная активность пероксидазы при регидратации <i>D. scoparium</i> .....	61
3.2.4. Очистка пероксидаз из <i>D. scoparium</i> с помощью анионообменной хроматографии.....	62
3.2.5. Влияние неблагоприятных температур на активность пероксидазы III класса <i>D. scoparium</i> .....	65
3.2.6. Идентификация генов и характеристика белков пероксидаз III класса в <i>D. scoparium</i> ..	66

3.2.7. Экспрессия генов <i>DsPOD</i> при действии абиотических стрессоров: CdCl <sub>2</sub> , параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации .....	80
3.3. Аскорбатпероксидаза мха дикранума метловидного: идентификация гена, активность фермента.....	83
3.3.1. Влияние обезвоживания/регидратации на активность аскорбатпероксидазы .....	83
3.3.2. Влияние неблагоприятных температур на активность аскорбатпероксидазы в <i>D. scoparium</i> .....	86
3.3.3. Электрофоретическое разделение аскорбатпероксидаз <i>D. scoparium</i> .....	87
3.3.4. Идентификация гена и характеристика белка аскорбатпероксидазы <i>D. scoparium</i> .....	88
3.3.5. Экспрессия гена аскорбатпероксидазы <i>D. scoparium</i> при температурном воздействии, обезвоживании/регидратации, действии CdCl <sub>2</sub> и параквата .....	96
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	99
ВЫВОДЫ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

## ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ABTS – 2,2'-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоная кислота)

APX – аскорбатпероксидаза

ASC – аскорбиновая кислота

cAPX – цитозольная аскорбатпероксидаза

CDD – база данных консервативных доменов

chAPX – хлоропластная аскорбатпероксидаза

DHAR – дегидроаскорбатредуктаза

EST – маркерная экспрессирующаяся последовательность

GR – глутатионредуктаза

GSH – восстановленный глутатион

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – перекись водорода

HSP – белки теплового шока

LB – агаризованная среда Luria-Bertani

LEA – белки позднего эмбриогенеза

MAPK – митоген активируемая протеинкиназа

MDA – малоновый диальдегид

MDHAR – монодегидроаскорбатредуктаза

NBT – нитротетразолий синий хлорид

NCBI – Национальный центр биотехнологической информации медицинской библиотеки США

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – супероксидный анион-радикал

<sup>•</sup>OH – гидроксильный радикал

PFAM – база данных семейств белковых доменов

POD – пероксидаза III класса растений

SDS – додецилсульфат Na

SOD – супероксиддисмутаза

SRA – архив чтения последовательности

XTT – 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфобензил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид

АФК – активные формы кислорода

ИУК – индолил-3-уксусная кислота

ИЭФ – изоэлектрофокусирование

кДНК – комплементарная ДНК

ОВ – относительная влажность

ОСВ – относительное содержание воды

ОТ – обратная транскрипция

ПААГ – полиакриламидный гель

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени

ТЕМЕД – N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин

ФХ – фитохелатины

## ВВЕДЕНИЕ

Мохообразные (бриофиты), включающие в себя мхи, печеночники и антоцеротовые, являются древнейшими наземными растениями - потомками ранних расходящихся линий эмбриофитов (Rensing et al., 2008). Таким образом, бриофиты занимают оптимальную филогенетическую позицию для изучения древних эволюционных изменений в растениях в период одного из самых важных событий в истории Земли - колонизации ее растениями (Ponce de León, Montesano, 2013, 2017).

Известно, что мхи обладают высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям среды и зачастую используются исследователями в качестве модельных объектов для изучения реакций на действие стрессовых факторов (Turetsky et al., 2012). Среди модельных мхов наиболее часто используются виды семейства Funariaceae: *Funaria hygrometrica* и *Physcomitrella (Physcomitrium) patens*, семейства Ditrichaceae: *Ceratodon purpureus* и некоторые другие. В настоящее время наиболее распространённым объектом исследования, используемым в качестве ресурса для омиксных (omics) технологий, является *P. patens*, чей геном полностью секвенирован (Cove, 2005; Rensing et al., 2008). Секвенированные генные последовательности *P. patens* позволяют идентифицировать гены и выявлять метаболические пути, задействованные в механизмах адаптации в других бриофитах при защите от биотических и абиотических стрессоров (Rensing et al., 2007; Zimmer et al., 2013; Ponce de León, Montesano, 2017).

Одним из важнейших процессов при стрессе является изменение окислительно-восстановительного метаболизма. Эволюционное развитие аэробных метаболических процессов, таких как дыхание и фотосинтез, неизбежно привело к образованию активных форм кислорода (АФК) (Uarrota et al., 2016). АФК обладают высокой токсичностью, поскольку подвергают окислительным модификациям жизненно важные высокомолекулярные соединения, такие как белки, липиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, что влияет на их физико-химические свойства и функциональную активность (Das, Roouchoudhury, 2014). Время жизни АФК крайне невелико и составляет, в зависимости от типа АФК, от нескольких микросекунд до минут. Они быстро обезвреживаются с помощью различных клеточных ферментативных и неферментативных механизмов. Несмотря на то, что растения выработали механизмы для борьбы с повышенным уровнем АФК при стрессе, в некоторых случаях АФК функционируют в качестве сигнальных молекул для контроля различных процессов, например, защиты от патогенов, запрограммированной гибели клеток, движения замыкающих клеток устьиц (Apel, Hirt, 2004; Uarrota et al., 2016). Известно, что растения, которые могут выживать в стрессовых условиях, обладают эффективной антиоксидантной системой, защищающей их от токсичного действия АФК (Breusegem et al., 2001). Как и в клетках цветковых растений, антиоксидантная система бриофитов включает в себя антиоксидантные ферменты, такие как каталаза, пероксидаза (POD),

аскорбатпероксидаза (APX), супероксиддисмутаза (SOD), а также низкомолекулярные антиоксиданты (Deu, De, 2012). Роль антиоксидантных ферментов при действии различных абиотических стрессоров на бриофиты продемонстрирована в ряде работ. Например, Hirata с соавт. (2000) изучали пероксидазу в побегах печеночника *Marchantia polymorpha* после обработки борнилацетатом и охарактеризовали ее как гликопротеин. Paciolla и Tommasi (2003) изучали антиоксидантные системы во мхе *Brachythecium velutinum* и в печеночниках. Показана роль аскорбатпероксидазы в детоксикации  $H_2O_2$  при засухе и водном стрессе. Montenegro с соавт. (2009) обнаружили присутствие различных фенольных соединений, таких как кофейная, галловая, ванильная, хлорогеновая, *n*-кумаровая, 3,4-дигидроксибензойная и салициловая кислоты, во мхе *Sphagnum magellanicum*. Krishnan и Murugan (2013a, 2013b) показали наличие в печеночниках фенолов, флавоноидов, сапонинов, дубильных веществ и гликозидов. Наряду с распространенными антиоксидантами, бриофиты обладают уникальными метаболитами и белками с необычными свойствами. Так, во мхе дикрануме метловидном обнаружена необычная ацилированная жирная кислота, названная дикранин (Borel et al., 1993). Было показано, что дикранин обладает выраженным антимикробным эффектом против ряда бактерий.

Большинство мохообразных устойчивы к высыханию и способны выживать в воздушно-сухом состоянии при очень низком относительном содержании воды 5-20% (Cove, 2005; Rensing et al., 2008). Известно, что в цветковых растениях высокая активность пероксидаз может коррелировать с устойчивостью к действию неблагоприятных факторов. Вероятно, что пероксидазы несосудистых растений - бриофитов, как и пероксидазы сосудистых растений, - ключевые ферменты, принимающие участие в стрессовых реакциях. Свойства пероксидаз сосудистых растений и их роль при биотическом и абиотическом стрессе широко изучены с помощью различных биохимических и молекулярно-биологических методов. Несмотря на очевидную важность, биохимические свойства пероксидаз и гены, их кодирующие, у мохообразных изучены крайне недостаточно.

**Цель и задачи исследования.** Цель настоящей работы – исследовать биохимические и молекулярные характеристики пероксидаз мха дикранума метловидного (*Dicranum scoparium*).

Были поставлены следующие задачи:

1. Оценить интенсивность образования супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), перекиси водорода ( $H_2O_2$ ) и гидроксильного радикала ( $\cdot OH$ ) в *D. scoparium* в норме и при стрессе. Оценить возможный вклад пероксидаз в детоксикацию и образование АФК в *D. scoparium*.
2. Определить изоферментный состав и активность при абиотическом стрессе, индуцированном обезвоживанием/регидратацией и действием положительных и отрицательных температур, пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы в *D. scoparium*.

3. Идентифицировать гены и провести биоинформатический анализ физико-химических свойств и структуры белков пероксидаз III класса и аскорбатпероксидазы мха *D. scoparium*.
4. Проанализировать уровень экспрессии генов, кодирующих пероксидазы III класса (*DsPOD*) и аскорбатпероксидазу (*DsAPX*), при обезвоживании/регидратации, действии  $\text{CdCl}_2$ , параквата, положительных и отрицательных температур.

**Научная новизна работы.** Установлено, что все изоферменты пероксидазы класса III мха обладают как про-, так и антиоксидантной активностью. Впервые показано, что во мхе *D. scoparium* изоферменты пероксидаз принимают участие в образовании  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

Впервые идентифицированы 22 гена пероксидаз класса III (*DsPOD*) дикранума с использованием базы данных архива чтений последовательностей. С помощью биоинформатического анализа первичной структуры белков пероксидаз *D. scoparium* охарактеризованы *in silico* их физико-химические свойства, выявлены консервативные мотивы и домены, сайты пост-трансляционных модификаций, субклеточная локализация белков. Проанализированы вторичная и третичная структуры пероксидаз класса III дикранума. На основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей показана эволюционная взаимосвязь между пероксидазами дикранума и других видов растений.

Впервые идентифицирован ген аскорбатпероксидазы (*DsAPX*) дикранума. В результате клонирования и секвенирования последовательностей гена *DsAPX* выявлена высокая степень гомологии с *APX Grimmia pilifera* и *P. patens*. Проведен биоинформатический анализ первичной, вторичной и третичной структуры белка *DsAPX*, а также сравнение со структурой *APX* других мхов. Экспериментальные данные об изменении профиля экспрессии генов *DsPOD* и *DsAPX* при воздействии на побеги мха  $\text{CdCl}_2$ , параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации свидетельствуют о вовлечении этих антиоксидантных ферментов в ответы *D. scoparium* на действие абиотических стрессоров.

**Научно-практическая значимость.** Мох дикранум, обладающий высокой стрессовой устойчивостью, является удобной моделью для изучения роли пероксидаз в ответах высших растений на абиотические стрессовые воздействия. Совокупность биохимических и молекулярно-биологических методов и подходов, а также полученные результаты могут служить теоретической основой для фундаментальных исследований по выявлению механизмов устойчивости растений к различным стрессовым факторам, а также методологической основой для прикладных работ по экологическому мониторингу и мероприятиям по повышению устойчивости сельскохозяйственных растений. Данные, полученные в ходе работ, могут быть использованы в лекционных материалах при чтении курсов лекции по стрессологии, физиологии растений, биохимии и молекулярной биологии в ВУЗах.

**Связь работы с научными программами.** Работа проводилась с 2016 по 2021 г.г. в соответствии с планом научных исследований КИББ ФИЦ КазНЦ РАН по теме: «Развитие геномных и постгеномных исследований для выяснения молекулярных механизмов функционирования живых систем и создания организмов с заданными свойствами (государственный регистрационный № АААА-А18-118022790082-2). Исследования по теме диссертации были поддержаны грантами РФФИ и Правительства Республики Татарстан в рамках научных проектов № 17-44-160142 «Стрессовая устойчивость мхов как критерий выживания в экстремальных условиях среды» и № 18-44-160031 «Листостебельные мхи – биоиндикаторы загрязнения тяжелыми металлами окружающей среды Республики Татарстан». Научные положения и выводы диссертации базируются на результатах собственных исследований автора.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Во мхе *D. scoparium* абиотический стресс, индуцированный обезвоживанием и регидратацией побегов, вызывает повышение уровня АФК. Одним из основных источников образования  $O_2^{\cdot -}$  в клеточной стенке побегов *D. scoparium* являются пероксидазы III класса.

2. Во мхе *D. scoparium* пероксидазы III класса и аскорбатпероксидаза являются стрессовыми маркерами, что подтверждается повышением активности ферментов и стимуляцией экспрессии кодирующих их генов при действии абиотических стрессоров, таких как обезвоживание/регидратация, неблагоприятные температуры,  $CdCl_2$ , паракват.

3. Стресс-индуцируемая активность и наличие консервативных элементов в структуре генов и белков пероксидаз *D. scoparium* свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз III класса и аскорбатпероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса растений.

**Личное участие автора.** Автор принимал личное участие в планировании и проведении экспериментальной работы, в статистической обработке, анализе, интерпретации и обсуждении полученных результатов. Автор лично участвовал в написании статей, опубликованных по результатам работы и представлении результатов на научных конференциях. Диссертация написана автором самостоятельно.

**Апробация работы.** Материалы диссертации докладывались автором на IV Российском симпозиуме с международным участием «Фитоиммунитет и клеточная сигнализация у растений» (Казань, Россия, 2016); II Международном симпозиуме «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Международной научной школе «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Уфа, Россия, 2017); Годичном собрании ОФР, научной конференции и школе молодых ученых: «Экспериментальная биология растений: фундаментальные и прикладные аспекты» (Судак, Россия, 2017); X Всероссийском с международным участием Конгрессе молодых ученых-биологов "Симбиоз 2017" (Казань, Россия, 2017); IX Международной научной

конференции «Регуляция роста, развития и продуктивности растений» (Минск, Беларусь, 2018); III Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Материалы и технологии XXI века» (Казань, Россия, 2018); Научно-технической конференции по итогам совместного конкурса фундаментальных исследований РФФИ – РТ: (Казань, Россия, 2018); 14th International Conference on Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Plants (Munich, Germany, 2019); IX Съезде общества физиологов растений России «Физиология растений – основа создания растений будущего» (Казань, Россия, 2019); Итоговой научной конференции Кафедры биохимии, биотехнологии и фармакологии, КФУ (Казань, Россия, 2019); The 6th International Scientific Conference – Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology (PlantGen2021), (Novosibirsk, Russia, 2021); III Международный симпозиум «Молекулярные аспекты редокс-метаболизма растений» и Школа молодых учёных «Роль активных форм кислорода в жизни растений» (Екатеринбург, Россия, 2021); V Российский симпозиум с международным участием – Клеточная сигнализация: итоги и перспективы (Казань, Россия, 2021); а также на итоговых конференциях КИББ ФИЦ КазНЦ РАН (2017, 2019, 2021).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 17 работ, из которых 3 статьи в рецензируемых изданиях, рекомендуемых ВАК.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 136 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка литературы. В работе представлено 7 таблиц, 42 рисунок. Список литературы включает 417 источников, из которых 395 – иностранных.

**Благодарности.** Выражаю глубокую благодарность моему научному руководителю к.б.н. Часову Андрей Васильевичу за помощь в проведении экспериментов и плодотворное обсуждение результатов при выполнении данной работы. Искренне признателен д.б.н. Минибаевой Фариде Вилевне за всестороннюю поддержку, неоценимую помощь, огромное терпение и понимание. Выражаю огромную благодарность проф. Ричарду Бекетту за помощь в обсуждении результатов при выполнении данной работы. Особо хочу отметить своих коллег к.б.н. Викторovu Ларису Викторовну, к.б.н. Трифонову Татьяну Владимировну и Мазину Анастасию Борисовну за помощь в проведении экспериментов. Сердечно благодарю к.б.н. Ренкову Альбину Гарифулловну и к.б.н. Галееву Екатерину Инсафовну за помощь в приобретении экспериментальных навыков, к.б.н. Рахматуллину Данию Фаритовну, к.б.н. Валитову Юлию Наилевну, к.б.н. Чечеткина Ивана Руслановича за помощь в редактировании текста диссертации, а также всех сотрудников лаборатории окислительно-восстановительного метаболизма Казанского института биохимии и биофизики ФИЦ КазНЦ РАН.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Ботаническое описание *Dicranum scoparium* Hedw.

*Dicranum scoparium* (дикранум метловидный) - лесное растение, представитель наиболее широко распространенного отдела Настоящие мхи (*Bryophyta*). Род дикранум произрастает во всех регионах Российской Федерации. Дерновники – своеобразные моховые островки обычно рыхлые, от зеленого до буроватого цвета, блестящие. Мох растет на почве, часто на стволах деревьев, на их основаниях, на гниющей древесине, его можно обнаружить на скалах, покрытых мелкоземом, на болотах, в щебнистых, в травянистых и моховых тундрах. *D. scoparium* покрывает только небольшие участки, растет пятнами и не занимает всей поверхности. *D. scoparium* способен произрастать в непредназначенных для растений местах, например, на обочинах лесных дорог и в противопожарных канавах. Для *D. scoparium* неблагоприятно полное отсутствие затенения древостоем (Боголюбов и др., 1997).

Систематическое положение дикранума метловидного:

Отдел Bryophyta

Класс Bryopsida Horan.

Порядок Dicranales H.Philib. ex M.Fleisch.

Семейство Dicranaceae Schimp.

Род *Dicranum* Hedw.

Вид *scoparium* Hedw.



Рис. 1. Мох *D. scoparium* Hedw. в природной среде (цит. по Карелина, 2016; Шакула, 2018).

**Морфология:** Стебель мха достигает высоты в 3-15 см, он бывает простой или славетвистый, красновато-бурый, беловато- или буроватойлочный. Листья дикранума длиной до 8 мм обращены во все стороны равномерно, или прямоотстоящие, или обращены в одну сторону и напоминают метлу по внешнему виду. Листья серповидные, линейно- или яйцевидно-ланцетные, верхушка обычно длинная, желобчатая, остропильчатая. Жилка составляет 1/7-1/9 ширины основания листа, заканчивается в верхушке или коротко выступает,

вверху на спинке с 2-5 продольными зубчатыми пластиночками. Клетки листа толстостенные и сильнопористые (Yatskievych, 2018).

**Жизненный цикл:** *D. scorarium*, как и другие бриофиты, является несосудистым растением и отличается от сосудистых растений тем, что в его жизненном цикле гаплоидный гаметофит преобладает над диплоидным спорофитом. Функции гаметофита – фотосинтез и вегетативное размножение с помощью участков побега или при образовании выводковых почек. При половом процессе половые органы формируются на верхушке гаметофита, антеридии со сперматозоидами – у мужских экземпляров, архегонии с яйцеклетками – у женских. Для того, чтобы произошло оплодотворение, необходима влага, благодаря ей сперматозоиды проникают в архегонии, после оплодотворения образуется зигота, которая делится в ходе митоза и дает начало спорофиту (Yatskievych, 2018). Все развитие спорофита зависит от питательных веществ, поставляемых ему гаметофитом. Сформированный спорофит – это ножка с коробочкой, внутри которой развивается спорогенная ткань. Ее клетки делятся в результате мейоза, и образуются гаплоидные разнополые споры. Созревшие споры рассеиваются и прорастают в протолиальные нити, из которых формируются гаметофиты или сами зеленые растения бриофитов.

## **1.2. Стрессовая устойчивость бриофитов**

Повышение устойчивости растений к абиотическим стрессорам, особенно таким как обезвоживание, низкие и высокие температуры, загрязнение почвы солями тяжелых металлов, является одной из актуальных и долгосрочных задач сельского хозяйства (Ибрагимова и др., 2010). Понимание механизмов адаптации может способствовать разработке новых стратегий для выведения стрессоустойчивых сортов растений. С экологической точки зрения, важно постижение закономерностей взаимодействия растения с окружающей средой на клеточном уровне. Несосудистые растения, в частности мхи, вносят весомый вклад в формирование экологических ниш местообитания растительного сообщества, в целом (Oliver et al., 2000a). К сожалению, взаимодействие несосудистых растений с окружающей средой недостаточно изучено, в том числе из-за сложности подбора подходящих экспериментальных моделей для биохимических и генетических исследований механизмов ответов этих растений на различные стрессоры. В последние годы большое внимание стало уделяться изучению стрессовой устойчивости бриофитов на клеточном и молекулярном уровне (Wood et al., 2000).

### **1.2.1. Устойчивость к обезвоживанию**

Устойчивые к обезвоживанию растения представляют собой уникальную группу видов, которые, потеряв большую часть клеточной воды, могут находиться в воздушно-сухом состоянии в течение нескольких месяцев, но быстро возобновляют нормальную физиологическую деятельность после регидратации (Oliver et al., 2000a; Wood, 2007; Gechev et al., 2021). Защитная система устойчивых к обезвоживанию растений представляет собой

сложную сеть мультигенных и многофакторных процессов, которые модулируют широкий спектр физиологических, морфологических, клеточных, транскриптомных, протеомных и метаболических процессов, предназначенных для противодействия повреждениям, вызванным обезвоживанием, и необходимых для облегчения возвращения к нормальному гомеостазу после регидратации (Oliver et al., 2000a; Bewley et al., 2003; Gechev et al., 2021). Устойчивость к обезвоживанию может быть конститутивной или индуцибельной. Конститутивная устойчивость к обезвоживанию зависит от механизмов восстановления клеток, запускаемых после регидратации, что позволяет выживать даже после чрезвычайно быстрой потери воды (Oliver et al., 2000b). Напротив, растения с индуцибельной устойчивостью изменяют свои физиологические и биохимические процессы во время обезвоживания и, таким образом, нуждаются в достаточном времени для подготовки эффективного защитного ответа (Oliver et al., 2000b). Как правило, конститутивная устойчивость к обезвоживанию характерна для несосудистых растений, в том числе, мохообразных. Так, было изучено 210 видов (158 мхов, 51 печеночник и 1 антоцерос) из 21 000 известных видов мохообразных (1%) и показано, что они проявляют признаки устойчивости к обезвоживанию (Oliver et al., 2000a). У сосудистых растений (плаунообразные, папоротники и покрытосеменные) была обнаружена индуцибельная устойчивость к обезвоживанию. Такая дифференциация, вероятно, отражает влияние ранней колонизации наземных экосистем на эволюцию наземных растений (Oliver et al., 2000a; Wood, 2007; Gechev et al., 2021).

Выживаемость мхов зависит либо от конститутивного механизма устойчивости, который запускается сразу же при возникновении в клетках водного дефицита, либо от индуцируемого механизма, который запускается при поступлении воды и прекращении водного дефицита, либо от сочетания этих механизмов (Oliver et al., 2000a). Давно известно, что многие виды мхов способны выдерживать «обезвоживание» – это более тяжелое состояние дегидратации, чем засуха (Hu et al., 2016). Устойчивость к обезвоживанию отличается от устойчивости к засухе тем, что при снижении относительной влажности (ОВ) воздуха менее 50% в первом случае поддерживается внутриклеточная концентрация воды на низком уровне, а во втором – на высоком (Tobias, 2012; Bewley, 1979). Засухоустойчивые организмы, которые не являются устойчивыми к обезвоживанию, погибают, если они потеряют большое количество воды. Организмы, устойчивые к обезвоживанию, выживают при тех же условиях (Tobias, 2012). Известно, что «мохообразные не покрыты кутикулой или же кутикула очень нежная, поэтому у них ничто не препятствует потере (или поступлению) воды. Тем не менее, многие мохообразные приспособились выдерживать периоды засухи, используя для этой цели какие-то не совсем понятные механизмы. Так, например, было установлено, что такой хорошо известный ксерофитный мох, как *Grimmia pulvinata*, больше года остается живым при +20° С в абсолютно

высушенном состоянии. Сразу же после того, как растение попадает во влажную среду, у него восстанавливаются все функции» (цит. по Грин и др., 1990). Одним из модельных мхов, используемых в изучении механизмов стрессоустойчивости, является мох *Tortula ruralis* (Hedw.) Gaert., Meyer, & Scherb (Oliver et al., 2000a). Показано что *T. ruralis* выдерживает высокие потери воды с помощью конститутивной системы защиты и при регидратации индуцирует систему восстановления жизненных функций до нормального состояния (Bewley, Oliver, 1992; Bewley et al., 1993; Oliver, 1996; Oliver, Bewley, 1997).

Известно, что обезвоживание сопровождается усиленным образованием АФК, что может приводить к окислительному стрессу, который вызывает повреждение клеток, белков, фотосистем (особенно на свету), перекисное окисление липидов и накопление свободных жирных кислот в мембранах (McKersie, 1991; Smirnoff, 1993). В период обезвоживания из клеток бриофитов происходит выход электролитов и растворенных веществ (Bewley, 1979; Bates, 1997). Существует два типа синергетических механизмов защиты, которые включают механизмы уменьшения уровня свободных радикалов при обезвоживании (Smirnoff, 1993). Это происходит за счет антиоксидантных ферментов, таких как пероксидазы, каталаза и супероксиддисмутаза, а также низкомолекулярных антиоксидантов, таких как аскорбиновая кислота,  $\alpha$ -токоферол, каротиноиды и глутатион (GSH). Кроме того, белки позднего эмбриогенеза (LEA), такие как дегидрин, группы LEA\_2, LEA\_4 и LEA\_5, были активированы во время обезвоживания у устойчивых мохообразных, таких как *P. patens*, *Syntrichia caninervis*, *M. polymorpha*. Предполагается, что LEA-белки помогают защититься от стресса, связанного с потерей воды и действием АФК (Gechev et al., 2021). Было показано, что во мхах во время засухи и обезвоживания постоянно присутствуют олигогалактолипиды - гликолипиды, углеводный фрагмент («голова липида») которых образован 3-5 галактозами (Gasulla et al., 2021). Wood (2007) описал устойчивость к обезвоживанию среди наземных растений с акцентом на бриофиты, где были перечислены те виды мхов, печеночников и антоцеротовых, устойчивость которых экспериментально подтверждена. Виды растений, устойчивые к обезвоживанию, могут выживать в условиях, когда атмосферная засуха создается с умеренной влажностью (то есть с ОВ 70-80% или от -30 до -48 МПа) или воздухом с пониженной влажностью (то есть от 0 до 30% ОВ или менее -162 МПа). Они были идентифицированы среди классов бриофитов, к ним относятся мхи: Andreaeopsida (*Andreaea rothii*), Bryopsida (*Grimmia sp.*, *Grimmia anodon*, *Dicranum majus*, *D. scoparium*, *Dicranum viride*, *Brachythecium rivulare*, *Pleurozium schreberi*, *Hylocomium splendens* и другие) Polytrichopsida (*Atrichum androgynum*, *Atrichum undulatum*, *Polytrichum formosum* и другие) и Tetraphidopsida (*Tetraphis pellucida*), печеночники: Jungermanniopsida (*Frullania dilatata*, *Cololejeunea calcarea* и другие), Marchantiopsida (*Corsinia coriandrina*, *Exormotheca*

*holstii*, *Riccia fluitans* и другие) и антоцеротовые: Anthocerotopsida (*Dendroceros granulatus*) (Wood, 2007).

### 1.2.2. Устойчивость к неблагоприятной температуре

Температурные изменения бывают быстрыми, экстремальными и непредсказуемыми, в связи с чем растениям пришлось выработать эффективные механизмы температурной акклиматизации. Неудивительно, что эти механизмы сложны и включают в себя изменения физиологических и биохимических реакций, экспрессии генов и синтеза белка (Wang et al., 2009). Предполагается, что устойчивость к засухе и температуре у сосудистых растений связаны между собой (Levitt, 1981). Считается, что устойчивость к высокой температуре и обезвоживанию – это два аспекта единой ответной реакции (Norr, 1974). Установлено, что в сухом виде бриофиты кратковременно выдерживают высокую температуру, в некоторых случаях до +100° С или более (Lange, 1955, Norr, 1974). Фактически, некоторые бриофиты могут выживать в сухом виде в течение 30 минут при температуре до +110° С, но в гидратированном виде при +40-50° С происходит повреждение их клеток (Lange, 1955). Одним из последствий как теплового, так и низкотемпературного стресса сосудистых растений является повреждение мембраны, при котором происходит утечка растворенных веществ из клетки, что коррелирует со степенью повреждения (Zou, 1988; Earnshaw et al., 1990; Marcum, 1998).

Hanson с соавт. (1999) предположили, что термостойкость мхов может быть частично связана с изопрен-опосредованным механизмом термостойкости, который, по-видимому, был потерян у большинства сосудистых растений. Нет данных, позволяющих утверждать, что этот механизм универсален среди всех мохообразных, но, по крайней мере, некоторые мохообразные образуют изопрен в ответ на действие высоких температур или высокую интенсивность света, даже при значительных затратах углерода (при температурах выше +30° С на биосинтез изопрена затрачивается более 2% от поглощенного растением углерода) (Hanson et al., 1999). Большинство исследуемых мхов способны к образованию изопрена, но такая способность отсутствует у печеночников и антоцеротовых, среди сосудистых растений такой способностью обладают папоротники, хвойные и хвойниковые и 1/3 из 122 исследованных семейств покрытосеменных (Hanson et al., 1999). Предполагается, что изопрен защищает фотосинтетический аппарат растений при температурном стрессе (Fini et al., 2017).

Предполагается, что одним из механизмов, который помогает мохообразным выживать при обезвоживании, является стабильность пероксидаз при относительно высоких температурах (Glime, 2017). Так, у *Mnium sp.* активность пероксидаза оставалась относительно стабильной при повышении температуры до +70° С, но затем быстро снижалась с дальнейшим повышением температуры (Bakardjieva et al., 1996). Добавление ионов кальция стабилизировало пероксидазу при более высоких температурах. Ионы цинка также стабилизировали ее активность при высоких

температурах, но ингибировали при более низких температурах (Glime, 2017). Показано, что в условиях теплового стресса во мхах происходит активирование белков теплового шока (HSP) (Glime, 2017; Zhuo et al., 2020). У *P. patens* увеличение экспрессии генов *HSP* происходит уже при +25° С, при температуре +38° С экспрессия генов *HSP* увеличивается более, чем на три порядка (Glime, 2017). У водного мха *Fontinalis antipyretica* при повышении температуры от +20 до +30° С также индуцировалась выработка HSP (Glime, 2017). У мха *Bryum argenteum* при повышенной тепловой обработке в течение 30 минут экспрессия гена *HSP70* коррелировала с экспрессией гена *HSP33* – фактора экспрессии HSP (Zhuo et al., 2020).

При низкой температуре могут происходить модификации белков плазматической мембраны растений, например, у устойчивых к холоду видов растений адаптация к условиям замораживания достигается за счет изменения их состава и функций (Takahashi et al., 2013). У растений арабидопсиса обнаружено 38 белков, в том числе белки раннего ответа на обезвоживание (ERD10 и ERD14) и растительный синаптоагмин 1 (SYT1), предположительно обеспечивающие репарацию мембран после повреждения холодом (Shishova, Yemelyanov, 2021). С низкотемпературным стрессом мхи сталкиваются не только в зонах умеренного и холодного климата, но и субтропического (где в зимний период выпадает снег) и даже в тропической зоне, например, в горах (Олениченко и др., 2007). Изучение действия низких температур на проницаемость мембран показало, что ответы разных видов бриофитов различны. Было показано, что морозостойкость мхов увеличивается после обработки гормоном абсцизовой кислотой (Minami et al., 2003; Oldenhof et al., 2006). Кроме того, было высказано предположение, что их устойчивость связана с накоплением сахаров, например,  $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1 → 6)- $\alpha$ -D-глюкопиранозил-(1 → 2)- $\beta$ -D-фруктофуранозида (Nagao et al., 2006) или сахарозы (Oldenhof et al., 2006). Знание механизмов стрессовой устойчивости бриофитов к неблагоприятным температурам может способствовать пониманию физиологических изменений, индуцированных загрязнением окружающей среды (Liu et al., 2003).

### 1.2.3. Устойчивость к тяжёлым металлам

Бриофиты были первыми зелеными растениями, которые колонизировали сушу, вследствие чего, как считается, им пришлось выработать механизмы адаптации к действию тяжелых металлов, так как в отличие от водной среды на земной поверхности тяжелые металлы присутствуют в большом количестве (Nickrent et al., 2000; Degola et al., 2014). Данные механизмы способствовали заселению бриофитами территорий, загрязненных тяжелыми металлами (Shaw et al., 1989). Более того, эти растения, произрастающие в районах с повышенным содержанием тяжелых металлов в почве, могут накапливать их в большом количестве без какого-либо видимого негативного влияния на свой рост и развитие (Sassmann et al., 2010). Благодаря отсутствию слоя кутикулы, корневой системы и ионообменным свойствам, многие бриофиты

способны поглощать тяжелые металлы всей своей поверхностью (Little, Martin, 1974; Berg, Steinnes, 1997; Choudhury, Panda, 2005; Degola et al., 2014; Koz, Cevik, 2014).

Стратегия ответа бриофитов на воздействие тяжелых металлов представлена двумя механизмами: избеганием и устойчивостью. Избегание представляет собой все процессы, препятствующие проникновению тяжелых металлов в протопласт, в этом механизме клеточная стенка играет решающую роль (Basile et al., 2009). Модификация любого из параметров, влияющих на удерживающую, катионообменную способность или активность переносчиков металлов в плазматической мембране, может привести к изоляции тяжелых металлов (Boquete et al., 2014). Важность клеточной стенки в избегании стресса, вызванного тяжелыми металлами, у бриофитов была также продемонстрирована в работе Wells с соавт. (1995). Они показали, что на степень толерантности к кадмию может влиять связывание клеточной стенкой различных нетоксичных катионов, встречающихся в клетках или окружающей среде. Различные катионы могут создавать неблагоприятные условия для связывания тяжелых металлов с плазматической мембраны и, тем самым, предотвращать их проникновение в цитоплазму.

В отличие от избегания, механизм устойчивости предполагает нейтрализацию металлов или их токсических эффектов, а также перемещение этих металлов из цитоплазмы в такие компартменты, как вакуоль и клеточная стенка (Stanković et al., 2018). Хелатирование тяжелых металлов - одна из стратегий поддержания гомеостаза клеток в присутствии тяжелых металлов и детоксикации металлов внутри растительных клеток (Krzesłowska et al., 2013). В процессе внутриклеточного хелатирования тяжелых металлов в растениях решающую роль играют тиолы с низкой молекулярной массой, такие как глутатион и цистеин (Stanković et al., 2018). Глутатион является основной формой транспорта и хранения восстановленной серы, он может непосредственно участвовать в связывании тяжелых металлов или косвенно - в качестве субстрата для синтеза фитохелатинов (ФХ), которые имеют особенно высокое сродство к некоторым тяжелым металлам. Комплексы, которые образовались между ионами тяжелых металлов и ФХ, могут транспортироваться в вакуоль, уменьшая концентрацию металлов в цитоплазме и, таким образом, защищая растения от их вредного воздействия (Yadav, 2010). Эти механизмы действуют также во мхах, как было продемонстрировано в работе Carginale с соавт. (2004), и в печеночнике *Lunularia cruciata*, подвергнутом воздействию Cd (Degola et al., 2014). Результаты показали, что накопление Cd в вакуолях *L. cruciata* сопровождается увеличением концентрации серы в этих органеллах. Важно отметить, что большая часть внутриклеточного Cd была связана с богатыми тиолами соединениями, такими как ФХ, вероятно, представляющими основной механизм детоксикации тяжелых металлов. Кроме того, Degola с соавт. (2014) подтвердили, что соединения, обнаруженные в *L. cruciata*, являются фитохелатинами, некоторые из них (например, ФХ2) могут постоянно присутствовать в клетках бриофитов для поддержания

баланса питательных микроэлементов. Наряду с механизмами комплексообразования тяжелых металлов с ФХ, важную роль в детоксикации тяжелых металлов в клетках бриофитов играют и другие механизмы. Так, в ходе исследования, проведенном на мхе *F. antipyretica* и 19 других бриофитах, ФХ не были обнаружены ни у одного из исследованных видов, независимо от применяемого металла и концентрации, однако наблюдалось увеличение содержания глутатиона восстановленного (GSH), в первую очередь, при обработке Cd (Bruns et al., 2001). Одним из доминирующих механизмов устойчивости бриофитов к тяжелым металлам, по крайней мере, к Cd, является образование цитоплазматических комплексов GSH/Cd и их последующий транспорт в вакуоль, где они могут распадаться (Bruns et al., 2001; Carginale et al., 2004; Degola et al., 2014). Кроме того, в вакуолях бриофитов обнаруживались высокие концентрации S и P, а Cd накапливался в виде фосфата (Bruns et al., 2001). Было обнаружено, что аккумуляция тяжелых металлов из атмосферы вызывает образование HSP в таллеме печеночника *Conocephalum conicum* (Basile et al., 2013). Авторы считают, что именно HSP делают этот печеночник устойчивым к тяжелым металлам (Basile et al., 2013). Образование HSP также наблюдалось у водного мха *F. antipyretica* после воздействия тяжелых металлов (Glime, 2017). Считается, что небольшие HSP могут защищать клетки от тяжелых металлов и других стрессовых воздействий, модифицируя устойчивость мембран или улучшая механизмы восстановления клеточного гомеостаза (Basile et al., 2013; Glime, 2017).

В целом, тяжелые металлы чрезвычайно токсичны и могут вызывать множество изменений в физиологии и морфологии бриофитов (Wolterbeek, 2002; Voquete et al., 2014). В связи с этим, изучение воздействия тяжелых металлов на бриофиты имеет большое значение, так как может дать представление об эволюции защитных механизмов растений от данного типа загрязнения (Degola et al., 2014).

### **1.3. Образование активных форм кислорода и роль при абиотическом стрессе**

В настоящее время имеются экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что образование АФК является ключевой стрессовой реакцией растительных клеток в ответ на действие стрессоров, таких как засоление, засуха, интенсивное освещение, тяжелые металлы, патогенные микроорганизмы, и при других абиотических и биотических воздействиях (Alvarez et al., 1998; Neil et al., 2002; Benikhlef et al., 2013; Jayaraman et al., 2014; Landrein et al., 2015). В нормальных условиях в растениях АФК образуются как побочный продукт аэробных процессов в пероксисомах, митохондриях при дыхании, хлоропластах при фотосинтезе, в апопласте. Установлено, что ферментативное образование АФК связано с работой таких ферментов, как NAD(P)H-оксидаза, POD, липоксигеназа, APX и ряда других (Mayaba et al., 2002; Blokhina et al., 2003; Mittova et al., 2004; Gechev et al., 2006). В корнях *Triticum aestivum* (Minibayeva et al., 2009), в семенах *Castanea sativa* и *Trichilia* (Roach et al., 2010; Whitaker et al., 2010), в печеночнике (Li et

al., 2010), во мхе *D. scoparium* (Onele et al., 2018) и в лишайниках (Liers et al., 2011) было продемонстрировано участие пероксидазы в образовании  $O_2^{\cdot-}$ , а также перекиси водорода ( $H_2O_2$ , Elstner, Neupel, 1976). Неферментативное образование АФК происходит в результате разложения в клетках  $H_2O_2$  в присутствии металлов переменной валентности  $Fe^{2+}$  по реакции Фентона с образованием самой реакционноспособной АФК – гидроксильного радикала ( $HO^{\cdot}$ ) (реакция 1) (Matysik et al., 2002; Hasanuzzaman et al., 2020):



Традиционно АФК рассматриваются как радикалы, которые повреждают клеточные структуры. Избыточное образование АФК является фактором окислительной модификации многих клеточных структур. Активный кислород может окислять молекулы белков и липидов, в частности, мембранные липиды, которые содержат ненасыщенные двойные связи. Перекисное окисление липидов приводит к образованию липидных гидроперекисей и изменению физико-химических свойств клеточных мембран (Болдырев, 2001; Jeevan Kumar et al., 2015; Janků et al., 2019). Кроме того, АФК вызывают модификации в структуре нуклеиновых кислот, что может привести к глубоким повреждениям генетического аппарата (Choudhury, Panda, 2005; Foyer, 2018).

В ходе эволюции растения выработали уникальный механизм для активного контроля сверхобразования АФК и для эффективного использования их в качестве сигнальных молекул (König et al., 2012). На сегодняшний день имеется много данных о путях передачи сигналов, которые регулируются АФК (Foyer, Noctor, 2013; Mittler, 2017). Пути передачи сигналов АФК взаимодействуют с путями, контролируемые ионами  $Ca^{2+}$ , активными формами азота и фитогормонами (Mittler et al., 2011).

При водном дефиците и обезвоживании были идентифицированы АБК-зависимые и АБК-независимые сигнальные пути, которые дополнительно регулируются уровнем АФК, а также содержанием сахаров в клетках (Yu et al., 2003; Couée et al., 2006; Choudhury et al., 2013; Laha et al., 2019). Засуха и обезвоживание вызывают повышенное образование АФК, особенно при ярком освещении (Gasulla et al., 2021). С целью детоксикации АФК в клетках индуцируется достаточное количество ферментативных и неферментативных антиоксидантов (Jiang, Zhang, 2002b; Khanna-Chopra, Selote, 2007; Laha et al., 2019; Gasulla et al., 2021). Была продемонстрирована индукция антиоксидантных ферментов при осмотическом стрессе в растениях (Laha et al., 2019; Hasanuzzaman et al., 2020; Gasulla et al., 2021). Содержание антиоксидантов особенно важно при регидратации после засухи (Varoli et al., 1999). Если уровень АФК превышает определенный порог, то это может служить сигналом для индукции или усиления адаптации к водному дефициту (Foyer, 2018; Hasanuzzaman et al., 2020). Индуцированный обезвоживанием сигналинг представляет собой сложную сеть взаимодействий между нижележащими компонентами

передачи сигнала АБК и АФК (Choudhury et al., 2013; Laha et al., 2019). Известно, что АБК влияет на уровень АФК посредством повышения уровня систем детоксикации АФК, например, цитозольной APX (Yoshimura et al., 2000; Fryer et al., 2003). В свою очередь, также хорошо известно и влияние АФК на биосинтез АБК (Zhao et al., 2001) и передачу АБК-опосредованных сигналов (Jiang, Zhang, 2002a).

В ответ на повышенные температуры происходит активация ловушек АФК, факторов транскрипции HSP, а также усиление биосинтеза осмолитов (Morimoto, 1998; Kumar et al., 2013). Показана высокая корреляция между уровнем АФК, уровнями гормонов, накоплением сахара и синтезом HSP (Frank et al., 2009). Известно, что антиоксидантные системы, такие как аскорбат-зависимая и тиолпероксидазо-зависимая редокс системы, поддерживают окислительно-восстановительный гомеостаз и уровень АФК в стрессовых ситуациях, например, при воздействии высоких температур (Asada, 2006; Dietz et al., 2006; Dietz, 2016).

В фотосинтезирующих тканях повышенное образование и накопление АФК происходит как ранний ответ в течение нескольких минут после увеличения интенсивности света. При этом синглетный кислород образуется из возбужденных хлорофиллов.  $\beta$ -каротин считается очень важным компонентом тушения фотосистемы II. Его окисленные производные,  $\beta$ -циклоцитраль и дигидроактиниодиол, по-видимому, служат ретроградными сигналами от хлоропласта в цитозоль и ядро (Triantaphylidès, Navaux, 2009; Navaux, 2014). Анализ транскриптов *Chlamydomonas reinhardtii* при световом стрессе, показал, что эти окисленные соединения активируют сигнальные пути, которые действуют на палиндромные последовательности в промоторах, называемые элементами электрофильного ответа, для стрессовых ответов, связанных с  $^1\text{O}_2$  (Fischer et al., 2012). Перепрограммирование экспрессии генов в ответ на фотосинтетический световой стресс включает в себя активность протеинкиназы, с которой связана чувствительность к АФК, и последующая активация генов-мишеней. Кроме того, существует тесная связь между АФК и регуляторными путями, зависимыми от фосфорилирования и экспрессии генов, вовлеченных в световой стресс (Rentel et al., 2004; Laloi, Navaux, 2015). В *A. thaliana* более 500 аннотированных факторов транскрипции дифференциально экспрессировались при изменении уровня АФК (Gadjev et al., 2006). Предполагается, что в целом  $\text{H}_2\text{O}_2$  действует совместно с антиоксидантными системами при контроле реакций на световой стресс (Vandenabeele et al., 2004; Vanderauwera et al., 2005).

Засоление является серьезной угрозой для устойчивого производства сельскохозяйственных культур во всем мире. Эффективная акклиматизация к засолению направлена на биосинтез осмолитов, ионный гомеостаз, контроль транспирации и поддержание уровня АФК (Hasegawa et al., 2000; Flowers, Colmer, 2008). При солевом стрессе АФК запускают синтез митоген-активированной протеинкиназы (МАРК) (Kovtun et al., 2000; Wang, Song, 2008).

Повышение концентрации  $H_2O_2$  в апопласте и эндомембранных везикулах способствуют АБК-зависимому устьичному ответу на солевой стресс (Moon et al., 2003; Leshem et al., 2007). АФК, синтезируемые гомологом NAD(P)H-оксидазы из *A. thaliana*, стабилизируют *SOS1* (Salt Overly Sensitive 1) мРНК при стрессе, вызванном NaCl (Chung et al., 2008). При этом показано, что *SOS1* отвечает на солевой стресс, но не чувствителен к окислительному стрессу, вызванному метилвиологеном. Показана взаимосвязь между активностью гомологов NAD(P)H-оксидазы и гомеостазом ионов  $Na^+$  и  $Ca^{2+}$  и АФК, которые могут осуществлять передачу сигналов (Chung et al., 2008). Белок RВОН характеризуется наличием мотивов «EF-руки» для связывания  $Ca^{2+}$  и представляет собой мишень фосфорилирования под контролем MAPK, АФК и  $Ca^{2+}$  (Kurusu et al., 2015). Действие АФК напрямую связано с окислительно-восстановительным гомеостазом, клеточной редокс-чувствительностью и редокс-сигнальной сетью (Liebthal, Dietz, 2017).

Поддержание окислительно-восстановительного баланса необходимо для устойчивого роста при изменении условий окружающей среды. В стрессовых условиях может происходить повышение активности антиоксидантных ферментов и увеличение содержания неферментативных антиоксидантов для поддержания баланса между детоксикацией и образованием АФК (Liebthal, Dietz, 2017). Таким образом, метаболизм АФК, модуляция и экспрессия генов, кодирующих ферменты детоксикации АФК, являются важными факторами защитных процессов растений для обеспечения роста, развития и адаптации растений в стрессовых условиях.

### 1.3.1. Система антиоксидантной защиты растений

Система антиоксидантной защиты включает в себя низкомолекулярные неферментативные антиоксиданты и антиоксидантные ферменты (Hasanuzzaman et al., 2019). Неферментные антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота (ASC), GSH,  $\alpha$ -токоферол,  $\beta$ -каротин, фенольные соединения, флавоноиды, алкалоиды и небелковые аминокислоты, работают взаимосвязанно с антиоксидантными ферментами, такими как SOD, CAT, POD, APX, полифенолоксидаза, монодегидроаскорбатредуктаза (MDHAR), дегидроаскорбатредуктаза (DHAR), GR, глутатионпероксидаза, глутатион-S-трансфераза, для детоксикации АФК (Мерзляк, 1999; Октябрьский, Смирнова, 2007; Nath et al., 2018; Laha et al., 2019).

В растениях фермент SOD напрямую связан со стрессом, инициируя первую линию защиты. В результате работы фермента  $O_2^{\cdot-}$  превращается в  $H_2O_2$  (Kliebenstein et al., 1998; Biczak, 2016; Del Río et al., 2018). Образовавшаяся  $H_2O_2$  может превращаться в  $H_2O$  ферментами CAT, APX, GPX, POD или в цикле ASC-GSH. В растительной клетке основным путем антиоксидантной защиты для детоксикации  $H_2O_2$  и поддержания окислительно-восстановительного потенциала является цикл ASC-GSH, который состоит из неферментативных антиоксидантов ASC и GSH, а также четырех ферментов APX, MDHAR, DHAR и GR (Leshem, 1988; Smirnoff, 2000; Fotopoulos

et al., 2010; Foyer, Noctor, 2011; Hasanuzzaman et al., 2019). ASC и GSH играют жизненно важную роль в качестве доноров электронов и принимают участие в поглощении АФК непосредственно через ASC-GSH цикл (Foyer, Noctor, 2011; Hasanuzzaman et al., 2019).

Как уже было отмечено выше, различные стрессовые воздействия: экстремальные температуры, обезвоживание, ультрафиолетовое излучение, активируют в бриофитах целый ряд ферментов (Deu, De, 2012). Предполагается, что мохообразные представляют собой группу растений, обладающих антиоксидантной системой, позволяющей справляться им с экстремальными климатическими условиями и воздействиями стрессоров различной природы. Так, было обнаружено, что антарктические мхи *Sanionia uncinata* (Hedw.) Loeske и *Polytrichastrum alpinum* (Hedw.) G.L.Sm. обладают высокой антиоксидантной активностью, предполагается их использование в качестве возможных источников антиоксидантов в медицине и косметологии (Bhattarai et al., 2008, 2009). В целом, пероксидаза – один из наиболее востребованных антиоксидантных ферментов в биотехнологии, сельском хозяйстве, медицине, ремедиации. Эти ферменты используются как биосенсоры для определения перекисей и органических гидропероксидов (Jia et al., 2002). В химической промышленности пероксидазы применяют для экологически чистого разложения азо-, гетероциклических и полимерных красителей, ксенобиотиков и пестицидов, полициклических ароматических углеводородов и других органических соединений (Köller et al. 2000; Ohtsubo et al. 2004; Wen et al. 2009; Авраменко, 2015). В растениеводстве данные о пероксидазной активности учитывают при селекции растений, поскольку, как правило, чем выше активность фермента, тем устойчивее растение (Шугалей и др., 2010; Авраменко, 2015).

#### 1.4. Гем-содержащие пероксидазы

Пероксидазы (EC.1.11.1.x) представляют собой ферменты, расщепляющие  $H_2O_2$  одновременно с окислением широкого спектра фенольных и нефенольных субстратов (RH).



Они повсеместно встречаются в природе, обнаруживаясь в бактериях, грибах, растениях и животных (Pandey et al., 2017a).

##### 1.4.1. Классификация пероксидаз

На основании наличия или отсутствия гема пероксидазы разделены на гемовые и негемовые пероксидазы (Passardi et al., 2007a). Согласно базе данных PeroxiBase, более 80% известных генов пероксидаз кодируют гем-содержащие пероксидазы. С другой стороны, негемовые пероксидазы, такие как тиолпероксидаза, алкилгидропероксидаза, NADH-пероксидаза, составляют лишь небольшую часть (Passardi et al., 2007a). Гем-пероксидазы были дополнительно отнесены к двум суперсемействам, например, суперсемейство пероксидазы-циклооксигеназы и суперсемейство пероксидазы-каталазы (Passardi et al., 2007b; Zamocky, Obinger, 2007).

#### **1.4.1.1. Суперсемейство пероксидазы-циклооксигеназы**

К пероксидазам суперсемейства пероксидазы-циклооксигеназы исключительно принадлежат пероксидазы животных, и как предполагается, все они участвуют во врожденном иммунитете и защитных реакциях (So'derhall, 1999; Dick et al., 2008). К этому семейству относятся миелопероксидаза, пероксидаза эозинофилов, лактопероксидаза, пероксидаза щитовидной железы. В этом суперсемействе группа протетического гема ковалентно связана с апопротеином (Pandey et al., 2017a).

#### **1.4.1.2. Суперсемейство пероксидазы-каталазы**

Суперсемейство пероксидазы-каталазы – наиболее интенсивно изученное суперсемейство гемовых пероксидаз неживотного происхождения. Первоначально это суперсемейство было названо суперсемейством гемовых пероксидаз растений, грибов и бактерий в зависимости от источника пероксидаз. Позже название этого суперсемейства было изменено на суперсемейство пероксидаз-каталаз (Pandey et al., 2017a). На основе гомологии аминокислотных последовательностей и особенностей посттрансляционной модификации пероксидазы неживотного происхождения подразделяются на 3 класса: пероксидазы класс I, II и III (Газарян и др., 2006; Pandey et al., 2017a).

##### **1.4.1.2.1. Пероксидазы I класса**

Пероксидазы I класса — это микробные пероксидазы, дрожжевая цитохром C-пероксидаза, APX растений и бактериальные каталазы-пероксидазы. В базе данных PeroxiBase зарегистрировано 1839 последовательностей этого класса (Pandey et al., 2017a). Аскорбатпероксидазы используют в качестве донора электронов аскорбиновую кислоту (Welinder, Gajhede, 1993; Skulachev, 1998; Shigeoka et al., 2002; Passardi et al., 2007a). Аскорбатпероксидазы локализуются в пероксисомах (Yamaguchi et al., 1995; Ishikawa et al., 1998), цитозоле (Asada, 1992) и, основная часть, в хлоропластах (Asada, 1992; Niyogi, 1999). На структурном уровне у пероксидаз класса I отсутствуют дисульфидные мостики, кальций связывающие участки и участки сигнальной последовательности локализации в эндоплазматическом ретикулуме (Maehly, 1952; Pandey et al., 2017a).

##### **1.4.1.2.2. Пероксидазы II класса**

Пероксидазы II класса – это пероксидазы грибов, такие как лигнинпероксидаза (LIP) и марганецпероксидаза (MNP), а также секреторные пероксидазы растительного типа (Газарян и др, 2006). В базе данных PeroxiBase зарегистрировано 609 последовательностей пероксидаз II класса (Pandey et al., 2017a). В отличие от пероксидаз класса I, пероксидазы класса II гликозилированы, имеют в своей структуре N-концевые сигнальные пептиды, четыре консервативных дисульфидных мостика (расположенных иначе, чем у класса III) и два консервативных кальций связывающих участка (Pandey et al., 2017a).

### 1.4.1.2.3. Peroxidases of Class III

Peroxidases of Class III – these are classical plant peroxidases, which are present in vacuoles and apoplasts, using phenols as electron donors (McDougall, 1991, 1992; Otter, Polle, 1994, 1997; Andrews et al., 2002). These enzymes perform various functions during lignification, cell growth, fruit ripening and plant aging, in response to abiotic and biotic stressors (Yoshida et al., 2003; Passardi et al., 2005). In the PeroxiBase database (Passardi et al., 2007a) 5692 sequences of peroxidases of Class III are registered (~ 70% of the total number of non-animal peroxidases). Among them are horseradish peroxidase, peanut peroxidase, soybean peroxidase and others (Pandey et al., 2017a). Like peroxidases of Class II, peroxidases of Class III are also glycosylated, contain N-terminal signal peptides, four conserved disulfide bridges and two conserved calcium-binding sites (Fig. 2, Gazaryan et al., 2006; Pandey et al., 2017a).

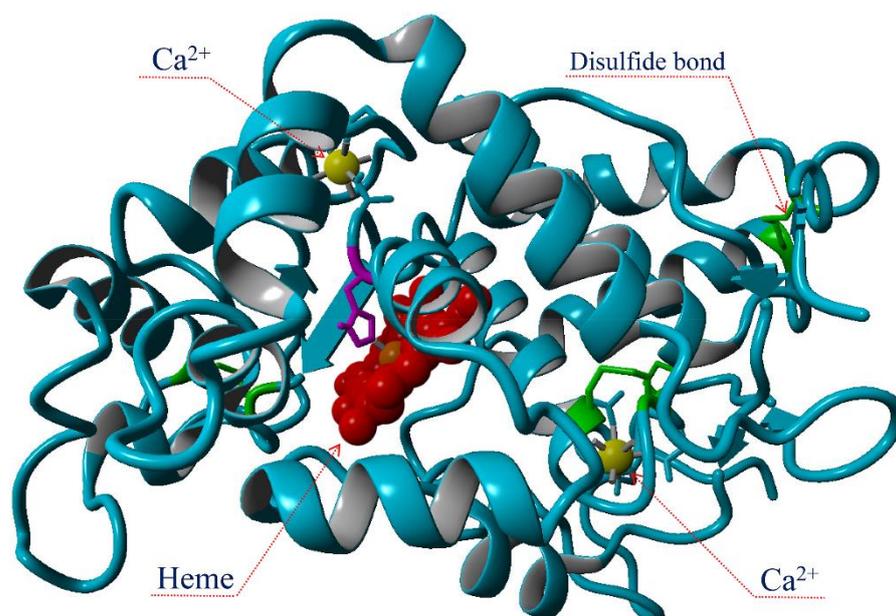


Fig. 2. 3D structure of the Class III peroxidase isoform from *Armoracia rusticana* (C1a) (Protein Data Bank: 1ATJ). Helices are shown in cyan and grey. Heme is shown in red and white, disulfide bonds (Disulfide bond) are shown in green. Two calcium ions (Ca<sup>2+</sup>) are shown as yellow spheres (cited from Zhu et al., 2015).

Peroxidases are synthesized as precursors with N-terminal and sometimes C-terminal signal sequences, which are removed during maturation (Buffard et al., 1990; Johansson et al., 1992; Welinder et al., 2002). Precursors are transported to the cell wall or vacuole, where they are sorted according to the presence of N- and C-terminal signal sequences, respectively (Kristensen et al., 1999; Matsui et al., 2003). Comparison of amino acid residues of wheat genes *TaPrx* showed that they are characterized

консервативными структурными особенностями и содержат активные сайты пероксидаз класса III, такие как предполагаемый N-терминальный сигнальный пептид, высококонсервативные домены, необходимые для ферментативной активности и фолдинга белка (Welinder et al., 1992); 8 цистеиновых остатков, вовлеченных в образование дисульфидных связей; варибельный участок, предположительно отвечающий за субстратную специфичность белка, расположенный с 40 по 50 аминокислоту в направлении к карбоксильному концу проксимального гем-связывающего сайта (Chittoor et al., 1999) (рис. 3).

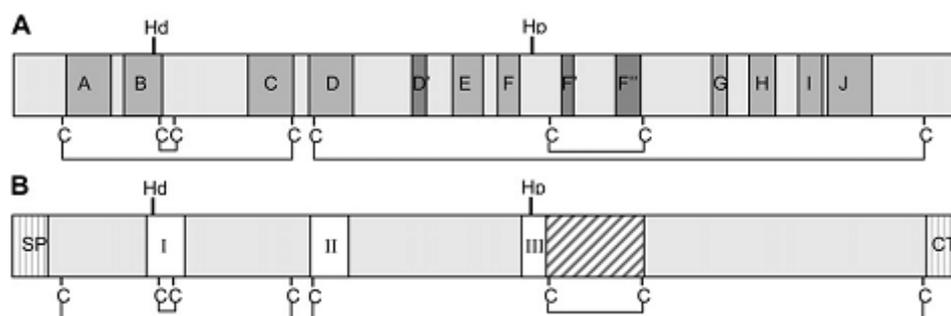


Рис. 3. Схематическая структура пероксидазы класса III. (А) Вторичная структура. Спиральная структура представлена остатками цистеина (С) и дистальным и проксимальным гистидинами (Hd и Hp). Участки, окрашенные в темно серый цвет, являются специфическими для пероксидаз класса III. Другие участки консервативны у пероксидаз классов I, II, и III. (В) Первичная структура. Высоко консервативные домены I, II, и III соответствуют дистальному гем-связывающему домену, неизвестному домену, и проксимальному гем-связывающему домену. Заштрихованная область соответствует предполагаемой варибельному участку, ответственному за каталитическую активность. Сигнальный пептид (SP) и С-терминальный участок (СТ) является очень варибельным по длине и аминокислотной последовательности (цит. по Cosio, Dunand, 2009).

Пероксидазы способны ускорять реакции окисления соединений за счёт кислорода  $H_2O_2$ , при этом образуются промежуточные комплексы, которые обладают различными спектральными характеристиками (Theorell, 1942; Chance, 1949, 1954). Активный центр пероксидазы в основном состоянии представляет собой «ферри-фермент» (Газарян и др., 2006). При оксидажном цикле одноэлектронное восстановление приводит к образованию ферро-формы пероксидазы при последующем присоединении молекулы кислорода и образовании соединения III (рис.4). Известно, что некоторые субстраты пероксидазы, к которым относятся неорганические ионы, взаимодействуют непосредственно с гемом, другие субстраты, в частности фенолы и ароматические амины, с гемом не реагируют, а взаимодействуют с белковой глобулой (Лебедева и др., 1977; Kobayashi et al., 1986). Вероятно, на поверхности белка существует цепь переноса электронов, за счет которой и происходит окисление субстратов. Показано, что

пероксидазная активность теряется при удалении гема из апофермента, при этом оксидазная активность снижается всего на 20% (Chibbar, Van Huustee, 1984).

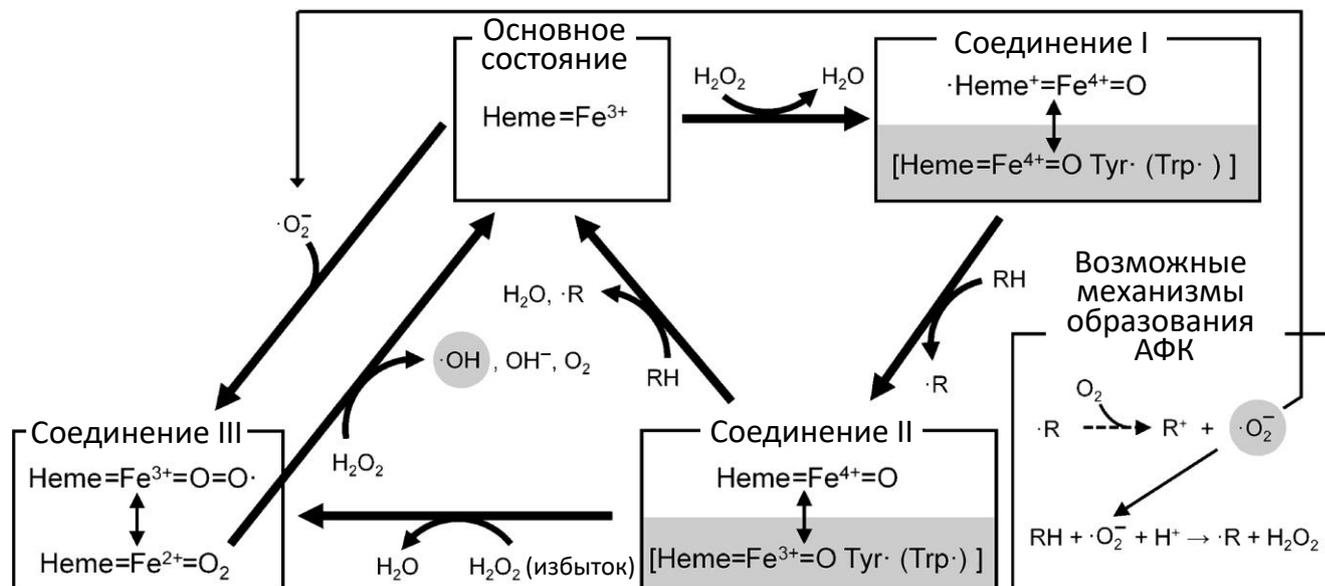


Рис. 4. Схема возможного образования радикалов пероксидазами III класса (цит. по Shigeto, Tsutsumi, 2016).

Примечание: Heme – гем, Tyr· – тирозильный радикал, Trp· – триптофанильный радикал, RH – восстановитель, R· – радикал.

В обычном пероксидазном цикле фермент пероксидаз в основном состоянии восстанавливает молекулу  $\text{H}_2\text{O}_2$  до  $\text{H}_2\text{O}$  и окисляет две молекулы субстратов соединения I и II. Когда субстратом является подходящая молекула для образования АФК, такая как тиол (RSH, Burner, Obinger, 1997), салициловая кислота (SA, Kawano, Muto, 2000) или NAD(P)H (Liszka et al., 2003), образованный радикал (т.е.  $\text{RSSR}^\cdot$ ,  $\text{SA}^\cdot$  и  $\text{NAD(P)}^\cdot$ ) реагирует с  $\text{O}_2$  с образованием  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Таким образом, пероксидаза может образовывать две молекулы  $\text{O}_2^{\cdot-}$  из  $\text{H}_2\text{O}_2$  в зависимости от субстрата. Кроме того,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\cdot\text{OH}$  могут образовываться из  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Теоретически в присутствии NAD(P)H,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  может быть преобразован в  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{NAD(P)}^\cdot$  путем неферментативной реакции (реакция 3) (Liszka et al., 2003):



Кроме того,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  может восстанавливать основное состояние пероксидаз с образованием соединения III. В присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  соединение III в состоянии  $\text{Fe}_2^+-\text{O}_2$  образует  $\cdot\text{OH}$  в соответствии с реакцией Фентона (реакция 4, рис. 4) (Chen, Schopfer, 1999; Shigeto, Tsutsumi, 2016):



Следовательно, пероксидазы могут не только окислять целевые молекулы с помощью  $H_2O_2$ , но также функционировать в качестве ключевых источников АФК (Shigeto, Tsutsumi, 2016).

#### 1.4.1.2.3.1. Гены пероксидаз III класса

Пероксидазы III класса представлены в растениях мультигенными семействами (Passardi et al., 2005; Cosio, Dunand, 2009). В течение последнего десятилетия было разработано несколько подходов молекулярной биологии для выделения, характеристики генов пероксидазы и изучения их экспрессии в растениях. После описания особенностей первых генов в *A. thaliana* (Intapruck et al., 1991) многочисленные гены, кодирующие пероксидазы, были идентифицированы в рамках проектов секвенирования с использованием маркерных экспрессирующихся последовательностей EST, то есть таких нуклеотидных последовательностей комплементарной ДНК (кДНК), которые являются идентификатором (маркером) экспрессируемого гена (Capelli et al., 1996; Østergaard et al., 1998; Tognolli et al., 2000). Лишь в нескольких статьях сообщалось о геномной идентификации пероксидаз III класса растений. В 2002 году было идентифицировано 73 гена пероксидазы III класса в *A. thaliana* и проанализирована их структура (интрон/экзон), дупликация генов и их экспрессия в различных тканях (корни, стебли, листья и цветки) (Tognolli et al., 2002). В 2004 году была проведена идентификация 138 генов пероксидазы III класса в *Oryza sativa japonica* с.в. Nipponbare и осуществлена классификация их на 8 подсемейств (I-VIII) (Passardi et al., 2004b). Также пероксидазы III класса (*GhPOX1*) были идентифицированы в *Gossypium hirsutum* (Mei et al., 2009). В 2014 году Ren с соавт. идентифицировали 93 гена пероксидазы III класса в *Populus trichocarpa* и исследовали экспрессию *PtPRX* в пяти тканях (корни, побеги, листья, почки и флоэма) в условиях абиотического стресса ( $H_2O_2$ , салициловая кислота, соль и засуха) (Ren et al., 2014). Wang с соавт. (2015) идентифицировали 119 генов пероксидазы III класса в *Zea mays* и разделили их на 18 групп. 94 гена пероксидаз III класса были идентифицированы в 2016 году у груши *Pyrus bretschneideri* (Cao et al., 2016).

Несмотря на то, что мхи являются вторым по численности отделом среди наземных растений (примерно 13 000 видов) (Buck, Shaw, 2008), гены, кодирующие пероксидазы III во мхах, мало изучены по сравнению с генами пероксидаз высших сосудистых растений. Даже при отсутствии информации о полных геномах мхов Passardi с соавт. (2004b) изучили происхождение и распространение пероксидаз III класса с использованием EST и обнаружили 11-14 предполагаемых последовательностей пероксидаз III класса во мхе *P. patens* (Passardi et al., 2004b). На сегодняшний день секвенированы геномы следующих мхов: *Sphagnum fallax* (Shaw et al., 2016), *P. patens* (Rensing et al., 2008) и *P. schreberi* (Pederson et al., 2019), *Ceratodon purpureus* (Carey et al. 2020), *S. caninervis* (Silva et al., 2020). Обнаружены 82 аннотированных пероксидазы *P. patens* в базе данных Национального центра биотехнологической информации медицинской

библиотеки США (NCBI), 64 пероксидазы *S. fallax* в базе данных phytozome и 4 пероксидазы *Pohlia nutans*. Гены пероксидаз *P. schreberi*, *C. purpureus*, *S. caninervis* пока не обнаружены ни в одной из баз данных, поскольку их геномы не аннотированы. По-видимому, пероксидаза настолько важна для растений, что процесс эволюции привел к образованию большого числа генов, кодирующих этот фермент. Вероятно, что наличие такого большого числа генов и обуславливает присутствие в растительных объектах нескольких изоформ фермента (Minibayeva et al., 2009; Li et al., 2010).

#### 1.4.1.2.3.2. Функции пероксидаз III класса

Изучение функций пероксидаз класса III - сложная задача. В клетках растений пероксидазы выполняют широкий спектр физиологических функций, включая регуляторные и стресс-индуцированные (рис. 5). Это обусловлено наличием множества генов, кодирующих эти

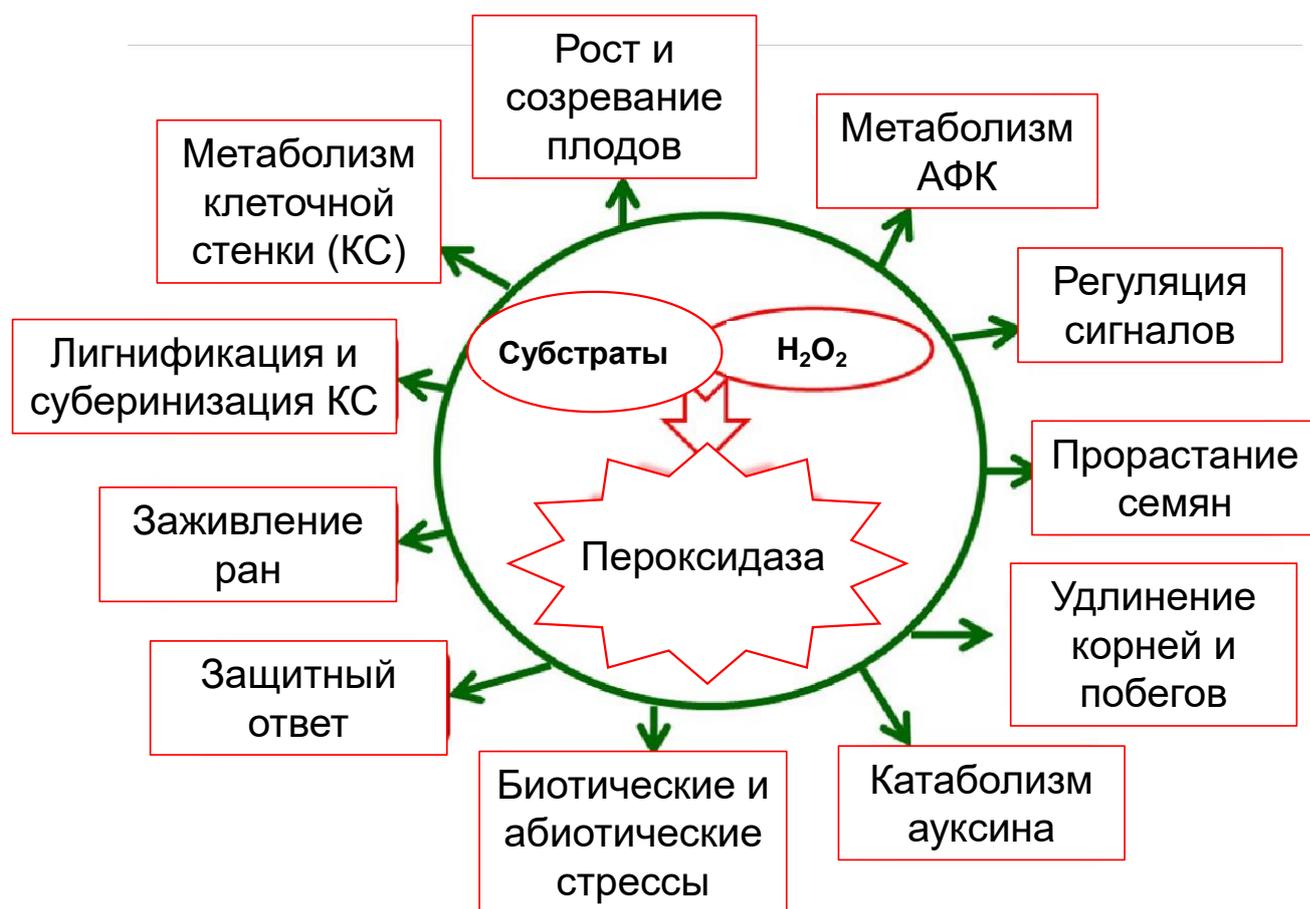


Рис. 5. Разнообразные функции и роли пероксидаз класса III (цит. по Pandey et al., 2017a).

ферменты, а также их функционированием в двух противоположных каталитических циклах (рис. 4). В пероксидазной реакции происходит восстановление одной молекулы  $H_2O_2$ , и окисление двух молекул субстрата. Пероксидазы III класса имеют широкую субстратную специфичность, окислению подвергаются фенольные соединения, включая мономеры лигнина

(Лебедева и др., 1977; Газарян и др., 2006). Однако существуют различия при окислении пероксидазами различных монолигнолов, например, кониферилловый спирт может легко окисляться большинством пероксидаз, в отличие от синапового (Marjamaa et al., 2009). Показано, что пероксидазы участвуют в окислительном декарбоксилировании аминокислот, в образовании индолилуксусной кислоты (ИУК) из триптофана (Riddle, Mazelis, 1965).

Возможно, что изменению структуры клеточной стенки, полимеризации суберина, образованию  $\text{HO}^{\bullet}$ , который способен расщеплять полисахариды клеточной стенки, также способствовала пероксидаза. Активность пероксидазы обнаруживается во всех органах и практически во всех тканях растений, но особенно высок уровень активности этого фермента в корнях растений (Francoz et al., 2015).

Пероксидазы присутствуют в различных компартментах растительной клетки. Присутствие пероксидазы в хлоропластах и в митохондриях объясняет ее роль в редокс-процессах фотосинтеза (Воронков, Живописцева, 1970; Рубин, Ладыгина, 1974) и в энергетическом обмене клетки (Plenisar et al., 1967, Ладыгина и др., 1970), соответственно. Пероксидазы играют ключевую роль как на ранних, так и на более поздних стадиях раневого ответа, в результате работы фермента происходит полимеризация макромолекул и укрепление клеточных стенок (Almagro et al., 2009). В вакуолях пероксидазы также играют важную роль. Связанные с тонопластом ферменты, скорее всего, взаимодействуют с субстратами, проникающими в органеллу, тогда как расположенные внутри вакуоли взаимодействуют с субстратами, которые накапливаются там (Zipor, Oren-Shamir, 2012).

При росте растительной клетки пероксидаза участвует в растяжении и уплотнении клеточной стенки. Регулируя уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  или образуя другие АФК, которые могут разрушать ковалентные связи полимеров клеточной стенки, пероксидаза способствует ее растяжению, а при окислении субстратов, содержащих бензольное кольцо, пероксидаза участвует в одревеснении клеточной стенки (Schopfer, 2001a). Благодаря своей оксидазной функции пероксидаза участвует в регуляции уровня ИУК, тем самым влияя на удлинение клеток (Cosio et al., 2009). Особая роль отводится пероксидазам, находящимся в семенах растений. Кроме того, что АФК, образуемые пероксидазами, сосредоточенными в клеточной стенке эндосперма, защищают зародыш от патогенов, кроме того, они индуцируют прорастание семян (Schopfer et al., 2001b; Lariguet et al., 2013).

В ответ на атаку вирусов, грибов и бактерий растения начинают синтезировать или высвобождать в апопласт ферменты, способные уничтожить проникший фитопатоген (Doke, 1985; Apostol et al., 1989). Кроме того, вокруг мест инфекции накапливаются ферменты, способные синтезировать полимер лигнин, обладающий высокой прочностью и создающий барьер против проникновения патогена в растительную клетку (Cosio, Dunand, 2009; Maksimov

et al., 2011; Shigeto, Tsutsumi, 2016). При инфицировании обнаруживаются анионные формы пероксидаз, образованные *de novo* (Graham, 1991; Melon, 1991; Yusupova et al., 2006). Предполагается, что изопероксидазы, взаимодействующие с полисахаридами, обеспечивают направленное отложение лигнина в клеточных стенках растений (Maksimov et al., 2011). Считается, что лигнин появился у сосудистых растений 450 миллионов лет назад, но лигнин-подобные или прелигниновые соединения были обнаружены еще у мохообразных и водорослей (Martone et al., 2009; Espiñeira et al., 2011). В нескольких сообщениях указывается, что ферменты всего пути биосинтеза лигнина (за исключением пути, ведущего к образованию сиригиллигнина) от катализа фенилаланина до образования кониферилового спирта впервые появились у мхов. Это было показано на *P. patens* несмотря на то, что данный мох не накапливает лигнин в клеточной стенке (Xu et al., 2009; Labeeuw et al., 2015; Renault et al., 2019). Предполагается, что у *P. patens* в биосинтезе лигнина участвует пероксидаза PpaPrx19, так как по своим кинетическим и структурным характеристикам она способна к окислению кониферилового спирта (Martínez-Cortés et al., 2021). Вероятно, PpaPrx19 выполняет функцию, аналогичную функциям, которые выполняют пероксидазы сосудистых растений при лигнификации. Эта гипотеза подтверждается структурной и кинетической гомологией PpaPrx19 с пероксидазами, например, с ZePrx из *Zinnia elegans* (Gabaldón et al., 2005), с уже описанной ролью в биосинтезе лигнина, а также взаимодействием с другими ферментами пути биосинтеза лигнина.

Анионные пероксидазы участвуют в синтезе суберина при распространении инфекции (Espellie et al., 1986; Melon, 1991). Пероксидазы, окисляя фенол, превращают его в хинон, который является более токсичным для патогенов, в результате восстановления хинона до гидрохинона или семихинонового радикала (Kosuge, 1969; Роговина и др., 1996). Rensing с соавт. (2008) и Mikko с соавт. (2009) отметили присутствие пероксидазы и быстрое увеличение ее активности в культуральной среде *P. patens* при обработке клеток мха хитозаном. Образующиеся в апопласте АФК, в том числе и в результате активности пероксидаз, играют роль в передаче сигналов внутрь клетки и очень токсичны для атакующих патогенов и грызущих насекомых (Bindschedler et al., 2006; Gechev et al., 2006). Образующиеся пероксидазой АФК используются при полимеризации лигнина, образовании суберина – важных элементов растительной клетки, необходимых для заживления ран и устойчивости от атаки патогенов (Hiraga et al., 2001).

При стрессе количество ферментов, высвобождающихся в апопласт, значительно возрастает (Sgherri et al., 2007), однако точные механизмы этого процесса до настоящего времени неизвестны. Вероятно, высвобождение пероксидаз в апопласт позволяет растениям образовывать АФК в ходе начального ответа на действие стрессоров. Большее количество изоформ пероксидаз может формироваться в результате посттранскрипционной и посттрансляционной модификаций

(Pandey et al., 2017a). Вероятно, что изменения, происходящие в окружающей среде, и различные эндогенные стимулы влияют на активность изоферментов. Понимание этого ферментативного разнообразия и его функциональной значимости является основным направлением структурных и механистических исследований пероксидаз растений.

### 1.5. Аскорбатпероксидаза

Аскорбатпероксидаза (APX, КФ 1.11.1.11) фермент, использующий аскорбиновую кислоту в качестве донора электронов при разложении  $H_2O_2$ , впервые был выделен из эвглены зеленой. К этому классу также принадлежат бактериальные каталазы-пероксидазы и цитохром С-пероксидазы, которые могут присутствовать как в фотосинтезирующих, так и в нефотосинтезирующих эукариотах, тогда как APX обнаруживаются только у организмов, имеющих пластиды. У цианобактерий отсутствуют гены, отвечающие за синтез APX, у

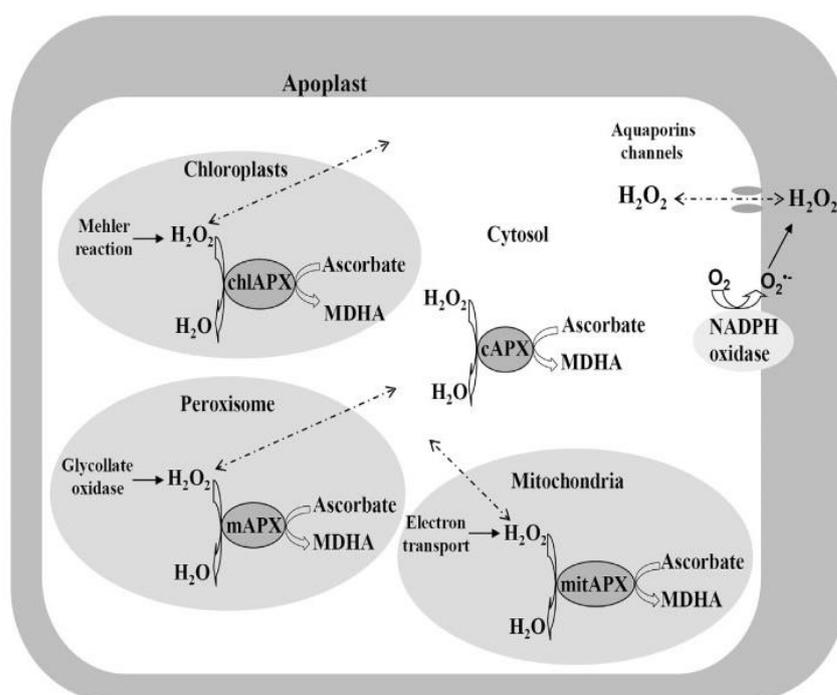


Рис. 6. Локализация APX в растительной клетке (цит. по Caverzan et al., 2012).

Примечание: Aquaporins channels – аквапорины, Ascorbate – аскорбиновая кислота, Electron transport – Электронно-транспортная цепь, Glycollate oxidase – гликолатоксидаза, MDHA – монодегидроаскорбат, Mehler reaction – реакция Мелера, NADPH oxidase – NADPH-оксидаза; клеточные компартменты: Apoplast – апопласт, Chloroplasts – хлоропласт, Cytosol – цитоплазма, Mitochondria – митохондрия, Peroxisome – пероксисома.

большинства же эукариотических водорослей их несколько (Caverzan et al., 2012; Gest et al., 2013). APX широко распространена среди фотосинтезирующих эукариот. Её изоформы обнаруживаются в различных компартментах растительной клетки: хлоропластах, митохондриях, пероксисомах и в цитозоле (рис. 6) (Sajitha Rajan, Murugan, 2010; Caverzan et al., 2012; Song et al., 2012; Gest et al., 2013; Maruta, Ishikawa, 2018). Изоформы APX нестабильны в

отсутствие ASC. В частности, хлоропластная APX (chAPX) более специфична для ASC, чем цитозольная аскорбатпероксидаза (cAPX); следовательно, первая более лабильна. Фактически, присутствие Trp-175 в chAPX вместо Phe-175 в cAPX контролирует его большую специфичность к ASC (Jespersen et al., 1997). Концентрация ASC ниже 20  $\mu\text{M}$  приводит к быстрой потере активности chAPX (Anjum et al., 2016). В хлоропластах присутствуют два типа: стромальные и тилакоидно-мембранные APX. Этот фермент отличается высоким сродством к  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Shigeoka, Maruta, 2014).

Гем белка APX представляет собой простетическую группу, в которой железо играет важную роль в каталитической активности (Maruta, Ishikawa, 2018). APX чрезвычайно чувствительны к концентрации ASC. Если она слишком низкая (ниже 20  $\mu\text{M}$ ), ферменты теряют стабильность и их активность снижается (Shigeoka et al., 2002). Это объясняет сложности, возникающие при попытках выделения APX из растений (Dabrowska et al., 2007). ASC связывается с активным центром белка четырьмя водородными связями с остатками лизина и аргинина, а гем, сайт связывания субстрата (Cys-32, Arg-172, Lys-30) (рис. 7) высоко консервативен (Macdonald et al., 2006).

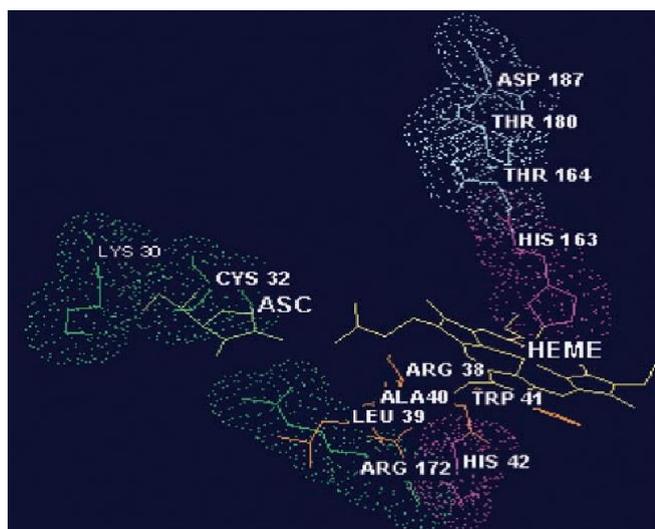


Рис. 7. Структура активного участка APX с субстратом – аскорбиновой кислотой (ASC) (цит. по Dabrowska et al., 2007). Аминокислотные остатки, образующие водородные связи с субстратом обозначены зеленым цветом; остатки, отвечающие за связывание  $\text{K}^+$  – синим; проксимальный и дистальный гистидин – фиолетовым; остатки вблизи дистального гистидина – оранжевым; гем (HEME) – желтым; ASC – светло-зеленым.

При стрессе активность APX может возрастать. Увеличение активности APX показано в ответ на стрессовые воздействия, такие как засоление, холод, действие тяжелых металлов, неблагоприятная температура, обезвоживание и регидратация, в разных видах растений (Sajitha Rajan, Murugan, 2010). Ранее было продемонстрировано, что во мхах и печеночниках активность

APX изменялась при действии различных абиотических стрессоров (Shigeoka et al., 1987; Paciolla, Tommasi, 2003; Dazy et al., 2009; Pitsch et al., 2010; Sun et al., 2010a; Sun et al., 2010b). Увеличение активности APX зачастую дополняется активностью других антиоксидантных ферментов, которые работают в тандеме с APX (Teixeira et al., 2006; Lee et al., 2007).

### 1.5.1. Гены APX

Гены APX у высших растений представлены мультигенными семействами, а различные изоформы классифицируются в соответствии с их субклеточной локализацией (Song et al., 2012). Были предложены две модели эволюции мультигенных семейств. Первая модель представляет собой согласованный способ эволюции, при котором полиморфизм (генетическое разнообразие) образовался путем межлокусной рекомбинации или преобразованием генов с последующим естественным отбором. Другая модель предполагает, что мультигенные семейства могут существовать в геноме как следствие эволюции. Предполагается, что новые гены создаются путем повторного дублирования существующих, некоторые из которых остаются в геноме в течение длительного времени, а другие удаляются или перестают функционировать (Dabrowska et al., 2007). Zamosky (2004) предполагает, что повторная дупликация генов привела к появлению отдельных семейств APX, цитохром-*c*-пероксидазы и каталазы-пероксидазы и их дальнейшей эволюции. Предположение, что APX возникли из одного общего предка, подтверждается выводом о том, что все изоформы обладают высоко консервативными участками в области связывания ионов. Исследование генов различных видов растений, показало, что APX широко распространены в царстве растений (Passardi et al., 2007c; Caverzan et al., 2012). В резуховидке было обнаружено 9 генов APX, а в рисе – 8 APX (Narendra et al., 2006; Song et al., 2012). Сравнение изоформ APX риса с изоформами других видов выявило высокую степень консервативности среди этих белков (Henrissat et al., 1990). Кроме резуховидки и риса – растений, геном которых полностью секвенирован, известны APX и у других видов, например, у шпината и спаржевой фасоли, секвенирование которых является лишь частичным (Song et al., 2012). Было проведено много экспериментов с различными генами APX, но ген, кодирующий APX1 в *A. thaliana*, является структурой, которая наиболее полно охарактеризована.

В последнее десятилетие было предпринято несколько попыток выделить и охарактеризовать гены, принадлежащие к семейству изоферментов APX, чтобы лучше понять их участие и значимость в физиологических процессах растений в условиях окислительного стресса. В работе Park с соавт. (2004) было обнаружено, что после обработки патогеном в листьях батата происходило индуцирование цитозольного гена APX (*swAPX1*), который может быть вовлечен в детоксикацию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, и способствует адаптации к окислительному стрессу, вызванному абиотическим и биотическим стрессорами. В настоящее время информация о генах, кодирующих APX у бриофитов, очень ограничена. В базе данных NCBI содержится 20 аннотированных APX

мохообразных, включая один цитозольный *APX* *G. pilifera* (Song et al., 2012), четыре *APX* *P. nutans* (Zhang et al., неопубликовано), три гипотетических белка *M. polymorpha* (Bowman et al., 2017) и 60 *APX* в *S. fallax* в Phytozome (Slater, Birney, 2005), соответственно. Как уже отмечалось ранее, наиболее изученным видом мхов является *P. patens*, который содержит семь изоформ *APX*, встречающихся в цитозоле, хлоропластах или митохондриях, и три гипотетических белка *APX* (Rensing et al., 2008).

В отличие от сосудистых растений, образование АФК и роль ферментов *APX* в детоксикации  $H_2O_2$  во мхах изучены недостаточно. Можно полагать, что подобно *APX* сосудистых растений, *APX* мхов играет ключевую роль в элиминации  $H_2O_2$  и других стрессовых реакциях. С эволюционной точки зрения, молекулярно-генетический анализ *APX* бриофитов является актуальным для понимания консервативных свойств и функций этих ферментов в стрессовых ответах растений.

### 1.5.2. Функции *APX*

В связи с тем, что изоформы *APX* играют защитную роль от АФК, образующихся в избытке при неблагоприятных воздействиях окружающей среды, уровень экспрессии данного фермента часто служит показателем стресса (Dabrowska et al., 2007). Один и тот же стрессор может по-разному изменять экспрессию цитозольного и хлоропластного генов *APX* (Nishikawa et al., 2003). Детоксикация  $H_2O_2$  с помощью *APX* осуществляется рядом реакций, катализируемых MDHAR, DHAR и GR. Вместе эти реакции составляют одну из самых важных антиоксидантных систем в растениях цикл Фойер-Холливел-Асада (Foyer-Halliwel-Asada cycle), или ASC-GSH цикл (рис. 8).

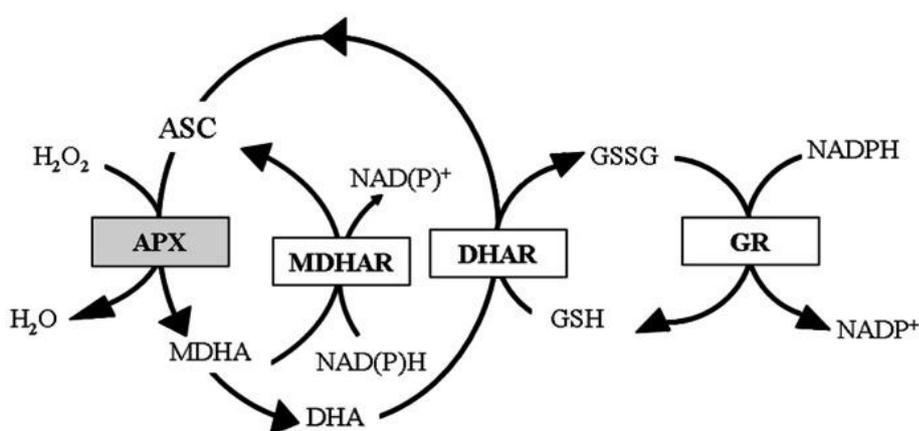


Рис. 8. Цикл Фойера-Холливела-Асада. Ферменты и промежуточные продукты цикла (цикл ASC-GSH). В белых прямоугольниках ферменты активны как в клетках животных, так и в растениях; в сером прямоугольнике фермент эксклюзивно присутствует в клетках растений. (Noctor, Foyer, 1998; Locato et al., 2013).

Примечание: ферменты: *APX* – аскорбатпероксидаза, *GR* – глутатионредуктаза, *DHAR* – дегидроаскорбатредуктаза, *MDHAR* – монодегидроаскорбатредуктаза; *ASC* – аскорбиновая кислота, *DHA* – дегидроаскорбиновая кислота, *GSH* – глутатион, *GSSH* – окисленный глутатион.

В этом цикле ASC и GSH действуют как восстанавливающие субстраты для удаления  $H_2O_2$ , и в конечном итоге восстанавливаются за счет АТФ и NAD(P)H (Noctor, Foyer, 1998). Цикл ASC-GSH играет важную роль в редокс-защите хлоропластов. Эти органеллы лишены каталазы и являются основным источником  $O_2^{\cdot-}$  и  $H_2O_2$  в результате высокоэнергетических реакций, происходящих во время фотосинтетической активности. Убедительно продемонстрирована активность ферментов цикла ASC-GSH в митохондриях растительных клеток, подтверждая, что этот цикл также играет важную роль в защите от вредного воздействия АФК (Mittova et al., 2004).

Таким образом, APX является ключевым ферментом, регулирующим уровень АФК, действующим в различных субклеточных компартментах (рис. 6). Разнообразные эффекты нокаута различных генов APX на рост растений, физиологию и антиоксидантный метаболизм, указывают на то, что APX может также регулировать окислительно-восстановительные сигнальные пути, участвующие в развитии растений (Caverzan et al., 2012). Известно, что экспрессия гена APX увеличивается при засухе, засолении, при действии низких и высоких температур, при патогенной инфекции, раневом стрессе и при воздействии других биотических или абиотических стрессоров (Rosa et al., 2010; Bonifacio et al., 2011; Gest et al., 2013; Pandey et al., 2017b; Maruta, Ishikawa, 2018). Показано увеличение экспрессии APX при абиотическом стрессе в горохе, рисе и сладком картофеле (Mittler, Zilinska, 1992; Agrawal et al., 2003; Park et al., 2004), однако уровень экспрессии варьирует в разных субклеточных компартментах, а также зависит от стадий развития растения и условий стресса.

### 1.6. Заключение к Обзору литературы

Из вышесказанного следует отметить, что пероксидазы играют разнообразные роли в предотвращении окислительного повреждения растительных клеток. Большинство имеющихся на сегодняшний день данных относительно механизмов действия и регуляции активности описывают пероксидазы высших сосудистых растений. К сожалению, в литературе имеется лишь несколько сообщений об активности пероксидазы и экспрессии кодирующих генов у бриофитов в ответ на действие абиотических стрессоров. Учитывая то, что бриофиты являются одними из эволюционно древних растений, обладающих высокой устойчивостью к неблагоприятным условиям окружающей среды, можно полагать, что экстремофильные мхи являются привлекательными модельными объектами для изучения генетических механизмов, позволяющих растениям выживать в этих условиях (Rensing et al., 2008). В связи с этим, исследование пероксидаз мха *D. scoparium* и других бриофитов может помочь в выяснении физиологической роли отдельных изоформ пероксидаз при нормальном развитии растений и в ответ на различные факторы окружающей среды. Кроме того, понимание биохимических свойств и анализ изменений экспрессии отдельных изоформ пероксидаз бриофитов может

способствовать расшифровке функций этих ферментов, а также более широкому и полному пониманию эволюции защитных механизмов высших растений.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 2.1. Объекты исследования

Побеги мхов *Dicranum scoparium* Hedw., *Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt., *Hylocomium splendens* (Hedw.) B.S.G. были собраны в Айшинском лесничестве в окрестностях г. Казани, Татарстан, Россия (55°53'21.3"N48°38'14.3"E). После очистки побеги высушивали на воздухе в течение 2 дней между листами бумаги, а затем хранили в морозильнике при -20° С. В экспериментах были использованы апикальные части стебля длиной 2 см.

#### 2.2.1. Получение ферментативной вытяжки

Побеги мхов фиксировали жидким азотом и растирали в ступке с помощью пестика. Измельченный растительный материал экстрагировали в соотношении 1 : 10 (растительный материал : буфер) холодным (+4° С) Трис-НСl (0,25 М, рН 8,0) буфером и центрифугировали при +4° С при 4300 g в течение 20 мин. Полученный супернатант использовался для определения изоферментного состава и активности ферментов.

#### 2.2.2. Фракционирование белков клеточной стенки *D. scoparium*

Для фракционирования белков клеточной стенки использовали модифицированную методику, применяемую для фракционирования белков клеточной стенки грибов и печеночников (Rast et al., 2003, Li et al., 2010). Использовали 10 г растительного материала, экстракцию проводили согласно (п.2.2.1.). Полученный супернатант представлял цитозольную или внутриклеточную растворимую фракцию «С». Не исключено, что при этом часть ферментов, слабо связанных с клеточной стенкой, элюировала во фракцию С, что привело к небольшой недооценке активности апопластных ферментов. Полученный осадок ресуспендировали в 75 мл фосфатного буфера Соренсена (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (0,05 М, рН 7) и центрифугировали. Все центрифугирования проводили, как описано выше (п.2.2.1.). Процедуру повторяли дважды, супернатанты объединяли. В полученной фракции «В<sub>1</sub>» находились белки, слабо связанные с клеточной стенкой с помощью водородных связей. Оставшийся осадок снова ресуспендировали в 50 мл буфера Соренсена (0,05 М, рН 7) с добавлением детергента дигитонина (0,3% масса/объем). Смесь помещали в холодильник (+4° С) на мешалку и выдерживали в течение 3 ч при непрерывном медленном перемешивании. Затем смесь извлекали и центрифугировали. Полученный супернатант является фракцией белков «В<sub>2</sub>», связанных с клеточной стенкой Ван-дер-Ваальсовыми силами и гидрофобными взаимодействиями. Оставшийся осадок снова ресуспендировали в 35 мл буфера Соренсена (0,05 М, рН 7) с добавлением 2,0 М NaCl. Смесь помещали в холодильник (+4° С) на мешалку и выдерживали в течение 12-14 ч при непрерывном медленном перемешивании. Затем смесь извлекали и центрифугировали. Полученный супернатант представляет фракцию белков «В<sub>3</sub>», связанных с клеточной стенкой сильными

электростатическими силами (ионными связями). Данный метод применялся с целью исследования зависимости редокс-активности в клетках *D. scoparium* от прочности связей ферментов со структурными элементами клеточных стенок.

### **2.3. Стрессовые воздействия**

#### **2.3.1. Обезвоживание**

Побеги мха подвергались обезвоживанию с последующей регидратацией (Onele et al., 2018). Сухие побеги (0,5 г) сначала полностью гидратировали в 20 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O в течение 1 ч при осторожном встряхивании на орбитальной качалке (Biosan SIA, EU). Обезвоживание проводили в эксикаторе при +25° С в темноте, выдерживая образцы над раствором 35% CaCl<sub>2</sub> (0-168 ч) или силикагелем (0-72 ч) в соотношении мох:силикагель 1:10. Затем образцы мха помещали в стаканчики для взвешивания (СВ 40 x 25 мм) с открытыми крышками в эксикаторе над силикагелем.

После обезвоживания проводили регидратацию побегов в 8 мл дистиллированной H<sub>2</sub>O в течение 0,5-2 ч. В другом ряду экспериментов сухие образцы мха *D. scoparium* предварительно гидратировали (24 ч при +4° С), затем инкубировали в дистиллированной H<sub>2</sub>O от 10 мин до 24 ч. В каждый интервал времени измеряли экстраклеточную и внутриклеточную активности пероксидазы.

#### **2.3.2. Воздействие CdCl<sub>2</sub>, параквата и температуры (-20° С, +30° С, +50° С)**

Сухие побеги *D. scoparium* предварительно гидратировали (24 ч при +4° С) в контейнерах на влажной ткани, после извлечения из контейнеров избыток влаги промокали фильтровальной бумагой. Апикальные сегменты помещали в растворы с 20 мл 100 мкМ CdCl<sub>2</sub> или 100 мкМ параквата (1,1'-диметил-4,4'-дипиридила дихлоридна) на 1 и 12 ч. Для температурного стресса образцы мха весом 0,5 г помещали в термостат при температуре +30° и +50° С или в морозильную камеру (-20° С) на 2, 12 и 24 ч. Для анализа экспрессии генов образцы мха помещали в термостат при температуре +30° С или в морозильную камеру (-20° С) на 1 и 12 ч.

### **2.4. Определение сухой массы мхов**

Тщательно вымытые алюминиевые бюксы с приоткрытой крышкой высушивали в термостате при +105° С до постоянной массы (не менее 30-40 мин), затем охлаждали их в эксикаторе и взвешивали на аналитических весах с точностью до 0,0001 г. Образцы мха (2-5 г) в воздушно-сухом состоянии помещали в бюксы, которые закрывали крышками и взвешивали на аналитических весах до четвертого знака после запятой. При помещении бюксов в термостат крышку бюкса устанавливали в вертикальном положении. Бюксы помещали в центр термостата, чтобы, обогрев был равномерным и проводили высушивание при +105° С в течение 6 ч. После высушивания бюксы закрывали крышками, охлаждали в эксикаторе (0,5-1 ч) и взвешивали, затем

снова сушили в термостате (2-3 ч). Высушивание продолжали до тех пор, пока разница между двумя последними массами не достигала пределов 0,2-0,3 мг.

**Оценка относительного содержания воды (ОСВ).** Для расчета относительного содержания воды (ОСВ) производили взвешивание материала. ОСВ при обезвоживании определяли по формуле: (масса мха после обезвоживания - сухая масса) / (масса мха после гидратации - сухая масса) x 100%.

### 2.5. Определение активности окислительно-восстановительных ферментов

Активность ферментов определяли спектрофотометрически на UV-1900 («Shimadzu», Япония). Для определения активности пероксидазы класса III (КФ 1.11.1.7) в кювету вносились: 350 мкл Na-цитратного буфера (pH 5,5), 1 mM *o*-дианизидин, 50 мкл ферментативной вытяжки, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Часов, Минибаева, 2009; 2014; Onele et al., 2018). Общий объем реакционной среды составлял 500 мкл. Реакцию начинали внесением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Оптическую плотность продукта реакции измеряли при 460 нм  $\epsilon = 30 \text{ mM}^{-1}\text{c}^{-1}$ . В качестве контроля для измерений использовалась дистиллированная H<sub>2</sub>O.

Активность фенолоксидазы (КФ 1.14.18.1) определяли так же, как активность пероксидазы класса III, но с исключением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> из реакционной среды.

Об активности каталазы (КФ 1.11.1.6) судили по убыли H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon_{240} = 40 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mM cm}$ ) в реакционной среде, содержащей 0,05 M Na-цитратный буфер, pH 7,0, 40 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 0,15 мл ферментативной вытяжки (общий объем 0.6 мл).

Субстратную специфичность пероксидазы класса III определяли с использованием следующих субстратов: 0,5 mM 2,2'-азино-бис (3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота) (ABTS) ( $\epsilon_{405} = 36,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); 0,1 mM *o*-дианизидин ( $\epsilon_{460} = 30,0 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ); 0,1 mM *p*-кумаровая кислота ( $\epsilon_{310} = 16,6^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) и 0,1 mM кофейная кислота ( $\epsilon_{311} = 9,91 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

Об активности APX (КФ 1.11.1.11) судили по убыли аскорбиновой кислоты ( $\epsilon_{265} = 8,24 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (Часов, Минибаева, 2009; 2014). Реакционная смесь общим объемом 500 мкл состояла из 0,05 M Na-цитратного буфера (pH 6,0), 1 mM аскорбиновой кислоты, 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 0,05 мл ферментативной вытяжки. Реакцию начинали внесением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. При исследовании влияния pH на активность APX использовали 0,05 M Na-цитратный буфер с различными значениями pH от 2 до 10. Для исследования кинетических параметров реакции окисления аскорбиновой кислоты использовали ее различные концентрации (0,007; 0,01; 0,03; 0,06; 0,1; 0,2; 0,5 и 1 mM) при постоянной концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 mM) в 0,05 M Na-цитратный буфере pH 6,0. С помощью преобразования Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах была рассчитана максимальная скорость реакции ( $V_{max}$ ) и константа Михаэлиса  $K_m$ .

## 2.6. Электрофоретическое разделение белков

Электрофорез проводился в 7 и 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в модифицированной системе (Laemmli, 1970) на Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad», США) в нативных условиях без добавления додецилсульфата Na (SDS), меркаптоэтанола и нагревания образцов, а также в полу-нативных условиях с добавлением 1% SDS. В экспериментах использовали маркеры (Broad range molecular mass markers, Bio-Rad, CA) с окрашиванием Кумасси G250, а также окрашенные маркеры (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder, Thermo Scientific, Lithuania).

Изоэлектрофокусирование (ИЭФ) проводили на приборе («Хийу-Каллур», Эстония) в 5% ПААГ с добавлением амфолинов pH 3,5–10 («LKB», Швеция). Образцы после обратного диализа загружали в лунку по 25 мкл. Набор стандартов IEF-M1A (3,6–9,3) («Sigma», США) использовали для определения изоэлектрической точки белков.

### 2.6.1. Визуализация активности пероксидаз

Для визуализации активности пероксидазы III класса использовали 5 мМ *o*-дианизидин, приготовленный на 0,05 М Na-цитратном буфере pH 5,5, с добавлением 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Визуализация активности APX проводилась при окрашивании полу-нативного градиентного (3-12%) геля раствором, содержащим 2,4 мМ нитросинего тетразолия хлорида (NBT) и 28 мМ N,N,N,N-тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,8 после обработки раствором, содержащим 4 мМ ASC и 2 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7,0.

## 2.7. Образование активных форм кислорода

### 2.7.1. Интенсивность образования супероксидного анион-радикала

Образование супероксиданого анион-радикала определяли акцепторным способом, используя 2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксамид (ХТТ). Проводили сканирование оптической плотности реакционной смеси на Lambda 25 («Perkin Elmer», США). В реакционной среде содержалось 100 мкл ферментативной вытяжки, 0,1 мМ NADH, 0,1 мМ ХТТ в 0,08 М Na-цитратном буфере pH 7,6. Реакцию проводили в присутствии или в отсутствие 250 ед/мл SOD со скоростью 1920 нм/мин в течение 50 мин. ХТТ в присутствии O<sub>2</sub><sup>•-</sup> превращался в ХТТ-формазан ( $\epsilon_{470} = 21,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , Sutherland, Learmonth, 1997), накопление которого рассчитывали по разнице оптической плотности в начале и конце реакции.

Детекцию O<sub>2</sub><sup>•-</sup> белками в гелях осуществляли с использованием NBT (López-Huertas et al., 1999). После проведения электрофореза гель промывался в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 7,4), содержащем 10% глицерин, 0,1 мМ MgCl<sub>2</sub> и 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, в течение 30 мин. Гель инкубировался при комнатной температуре в том же буфере с добавлением 0,4 мМ NADH и 0,5 мМ NBT в течение 30 мин или до появления четких синих полос. Контрольный гель инкубировали в том же

растворе, но без NADH (López-Huertas et al., 1999). Другим контролем было окрашивание геля в присутствии SOD (50 ед/мл). Реакция останавливалась промывкой геля дистиллированной H<sub>2</sub>O.

### 2.7.2. Определение образования гидроксильного радикала

Образование гидроксильного радикала оценивали путем измерения скорости окисления дезоксирибозы (Gómez-Toribio et al., 2009). Если не указано иное, материал гидратировали в темноте при +5° С на нецеллюлозной ткани в течение 24 ч. Три-пять биологических повторностей, каждая из которых содержала эквивалент 0,2 г сухой массы, инкубировали в 20 мл 20 мМ фосфатного буфера, рН 5, содержащего 0,5 мМ 2,6-диметокси-1,4-бензохинон, 0,1 мМ FeCl<sub>3</sub>, 0,6 мМ щавелевой кислоты и 2,8 мМ дезоксирибозы. Образцы реакционной смеси (990 мкл) отбирали после 10, 20, 30, 60 и 120 мин инкубации, добавляли 10 мкл 50% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> в качестве стоп-раствора и затем замораживали для дальнейшего анализа. Позже образцы оттаивали и 50 мкл смешивали с 250 мкл 2,5% трихлоруксусной кислоты и 250 мкл 1% тиобарбитуровой кислоты в 50 мМ NaOH и добавляли дистиллированную воду, чтобы получить объем 1 мл. Затем смесь нагревали в кипящей воде (+100 °С) в течение 10 мин и измеряли поглощение оптической плотности на спектрофотометре. Показания были преобразованы в эквиваленты малондиальдегида (MDA) ( $\epsilon_{532} = 0,156 \text{ мкМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ , (Devasagayam et al., 2003)). Специфичность метода была подтверждена внесением известных ловушек гидроксильного радикала – тиомочевины (Gutteridge, 1987) и сорбита (Smirnov, Cumbes 1989), которые подавляли окисление дезоксирибозы.

### 2.7.3. Определение содержания перекиси водорода

Образование H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> определяли с использованием ксиленолового оранжевого (Gay, Gebicki, 2000). Для измерения готовили два реагента: реагент А, содержащий 25 мМ FeSO<sub>4</sub>, 25 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и 2,5 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, и реагент Б, содержащий 125 мкМ ксиленолового оранжевого и 100 мМ сорбита. Ферментативную вытяжку (0,1 мл, см. п.2.2.1.) смешивали с 0,5 мл реакционной среды (0,1 мл реагента А и 10 мл реагента Б). Полученную смесь выдерживали 1 ч и определяли содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> спектрофотометрически ( $\lambda = 560 \text{ нм}$ ). Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> рассчитывали по стандартной калибровочной кривой концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1-50 мкМ) (Mayaba et al., 2002).

## 2.8. Очистка белков

### 2.8.1. Ионообменная хроматография

Для выделения и частичной очистки белков отбирали супернатант после гомогенизации побегов *D. scoparium* в 50 мМ фосфатном буфере рН 7,0. Белки осаждали с использованием (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (30–80%), центрифугировали при 23 500g в течение 20 мин, и полученный осадок повторно суспензировали в фосфатном буфере. После диализа белки были частично очищены с использованием анионообменной колонки Hi-Trap Q FF (GE Healthcare, Sweden), уравновешенной 25 мМ Трис-НСl буфером, рН 7,5 (Chromatography System ÄKTA™ Start). Белки

элюировали линейным градиентом NaCl (0–1 М) при скорости потока 1 мл/мин. Пероксидазная активность определялась в каждой фракции.

## 2.9. Выделение РНК и синтез двухцепочечной кДНК

Для выделения тотальной РНК мха использовали набор GeneJET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Scientific, Lithuania) по протоколу, указанному производителем. Концентрацию и чистоту РНК определяли на NanoDrop-1000 (Fisher, USA), затем для определения качества выделенной РНК ее разделяли в 1% агарозном геле в горизонтальной камере SE-1 (Хеликон, Россия). Одно и двухцепочечная кДНК были синтезированы с помощью набора Evrogen Mint 2 по протоколу, указанному производителем.

## 2.10. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофоретическое разделение ДНК при напряжении электрического поля 5–10 В/см осуществляли в 1-2% агарозном геле в горизонтальной камере SE-1 (Хеликон, Россия) с использованием 40 мМ Трис-ацетатного буфера, рН 8,0 и 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты. Для контроля миграции образцов в электрическом поле в образцы перед их нанесением в лунки геля добавляли бромфеноловый синий (Serva, Германия). Для детекции ДНК в установке видеодокументации гелей ChemiDoc (Bio-Rad, США) в ультрафиолетовом свете гели обрабатывали 1% раствором бромистого этидия (Хеликон, Россия) (Маниатис и др., 1984). DNA Ladder (Thermo Scientific, США) использовали в качестве маркеров молекулярной массы.

## 2.11. Молекулярное клонирование ДНК

При клонировании в качестве вектора использовали рGEM-T Easy (Promega, США) для *APX* и рAL2-T (Евроген, Россия) для *POD*. Клонирование в вектор рGEM-T Easy и рAL2-T проводили согласно протоколам производителей (Promega, США) и (Евроген, Россия) соответственно. Плазмиды, содержащие целевые вставки, были трансформированы в компетентные клетки. Для трансформации использовали 50 мкл компетентных клеток, которые оттаивали на льду в течение 5 мин, затем добавляли 100-250 нг плазмидной ДНК, смесь инкубировали на льду в течение 5 мин, затем 30 с при +42° С и вновь на льду 2 мин, затем вносили 250 мкл среды SOC комнатной температуры и инкубировали в течение 1 ч при +37° С. Затем 100 мкл культуры высевали на чашку Петри, содержащую агаризованную среду Luria-Bertani (LB) с соответствующим антибиотиком. Культуру выращивали в течение 15-18 ч при +37° С, трансформанты проверяли с помощью ПЦР с использованием стандартной пары праймеров (T7, SP6). Остальные колонии, которые высевали на жидкую среду LB, использовали для дальнейшей работы. Для выделения плазмидных ДНК-конструкций использовали наборы Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя.

В работе использовались штаммы *Escherichia coli* Nova Blue. Жидкая среда LB (рН 7,5) для культивирования бактерий содержала 0,5% дрожжевой экстракт, 1% бакто-триптон и 1%

NaCl. В состав жидкой питательной среды SOC входили 0,5% дрожжевой экстракт, 2% бакто-триптон, 10 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl и 20 мМ глюкоза. Агаризованная среда готовилась с добавлением 1,5% агара. В среду LB для культивирования бактерий штамма *E. coli* добавлялся антибиотик тетрациклин (12,5 мкг/мл). В среду LB, содержащую плазмиды pGEM-T Easy и pAL2-T с целевыми вставками, дополнительно добавляли 100 нг/мкл ампициллин для культивирования трансформантов.

## **2.12. Определение нуклеотидной последовательности ДНК**

Нуклеотидную последовательность ДНК определяли методом автоматического секвенирования. Для постановки реакции Сэнгера использовали набор Big Dye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, США). В состав реакционной смеси объемом 10 мкл входили: 0,5 мкл праймера (10 мМ), 1 мкл плазмидной ДНК (150-250 нг/мкл), 2 мкл Ready reaction mix; 2 мкл 5-кратного BigDye Term Sequencing buffer и 4,5 мкл MilliQ. Амплификацию проводили на C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio-Rad, США) при следующих параметрах реакции: 1 мин при +96° С, затем 25 циклов (10 с при +96° С, 5 с при +45° С, 4 мин при +60° С), хранение +12° С. Для очистки реакционной смеси от свободных модифицированных нуклеотидов использовали 3 М ацетат натрия, 80% и 96% спирт. Автоматический ДНК-анализатор ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) применялся для секвенирования нуклеотидных последовательностей. Для анализа секвенированных последовательностей использовали программу Sequencing Analysis 5.3.1. (Applied Biosystems, США).

## **2.13. Биоинформатический анализ**

### **2.13.1. Идентификация пероксидазы класса III в *D. scoparium***

Метатранскриптомные данные для мха *D. scoparium* были взяты из базы данных архива чтения последовательности (SRA), Биопроекты (регистрационный №: PRJEB21674, идентификация: 393814; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/393814>) и (регистрационный №: PRJNA499105, идентификация: 499105; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/499105>) (Chen et al., 2018, 2019). Файлы были загружены с помощью SRA Toolkit (Leinonen et al., 2011) и переведены в формат fastq. Программа FastQC использовалась для оценки качества библиотек (Andrews, 2010). Для удаления адаптеров и низкокачественных прочтений была использована программа Trimmomatic (версия 0.39) (Bolger et al., 2014). Затем прочтения были перепроверены программой FastQC и использованы для сборки транскриптома с помощью Trinity (Haas et al., 2013). Фильтрацию транскриптов проводили с помощью пакета EvidentialGene (<https://sourceforge.net/projects/evidentialgene/>) с параметрами по умолчанию для уменьшения избыточности расшифровок. Из файла со сборкой (в формате fasta) создавали локальную базу данных, затем с помощью tblastn (Altschul et al., 1997) проводили поиск гомологов пероксидаз III класса среди собранных транскриптов мха *D. scoparium* с пероксидазами *P. nutans* и *P. patens*.

Для найденных транскриптов находили рамку считывания с помощью Augustus и AssemblyPostProcessor на сервере Galaxy V. 1.0.3.0 (<https://usegalaxy.org/>), затем получали аминокислотную последовательность, которая в дальнейшем анализировалась с помощью методов биоинформатики. Все найденные последовательности были представлены в базе данных семейств белковых доменов (PFAM, El-Gebali et al., 2019), в базе данных консервативных доменов (CDD) в NCBI (Marchler-Bauer et al., 2017), с помощью программ InterProScan (Mitchell et al., 2019) и HMMER (Potter et al., 2018) для проверки доменов, кодирующих пероксидазы III класса. На основе найденных последовательностей из базы данных SRA были клонированы два гена *POD* с использованием праймеров:

*DsPOD2*

F 5' - ATGGGTCACGCGAAGGGG - 3'

R 5' - ATCCTTATAACTATTCACCCGATGG - 3'

*DsPOD6*

F 5' - ATGGGGAGCAGCTGGAGGG - 3'

R 5' - TCATAAACCACAAGTGCTTCTCACAG - 3'

### 2.13.2. Идентификация аскорбатпероксидазы в *D. scoparium*

Поиск в базе данных проводили на серверах NCBI с помощью Blast, Phytozome 12 (Joint Genome Institute, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) и e! EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>). Поскольку гены, кодирующие *APX* в *D. scoparium*, не были секвенированы, в качестве запроса использовалась кДНК *G. pilifera* (*GpAPX*) (номер доступа в GenBank: GU989311). В анализе использовалась только кодирующая последовательность *APX*. Праймеры для амплификации последовательности гена *APX* были сконструированы с помощью Vector NTI Suite 9 (Invitrogen, Carlsbad, USA). Построенные праймеры имели следующие последовательности:

F 5'- ATGACGAAGGTTTATCCTAAGGTCAGC - 3'

R 5' – TAGACAGAGCCTGGCTGACCC - 3'.

### 2.13.3. Анализ последовательностей и предсказание субклеточной локализации пероксидаз

Программы Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США) и Lasergene 2007 использовали для сравнения и выравнивания аминокислотных и нуклеотидных последовательностей. Физико-химические свойства белков пероксидаз, такие как молекулярная масса, изоэлектрическая точка, индекс нестабильности и общее среднее значение гидропатичности, были проанализированы с помощью инструмента ProtParam ExPASy (Gasteiger et al., 2005). Субклеточная локализация была предсказана с помощью программы CELLO (Yu et al., 2004) и ProtComp 9.0 (FGENESH: [www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc](http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=protcomppl&group=programs&subgroup=proloc)).

#### **2.13.4. Анализ консервативных мотивов и доменов пероксидаз**

Для идентификации консервативных мотивов использовались программу MEME suite (<http://meme-suite.org/index.html>) (Bailey et al., 2009). Карта мотивов, полученная после MEME, была дополнительно модифицирована с использованием программного обеспечения TBtools (Chen et al., 2020). Структуры доменов пероксидаз были получены с помощью CDD (Marchler-Bauer et al., 2017), а TBtools использовались для перестройки карты домена из результатов CDD (Chen et al., 2020).

#### **2.13.5. Анализ функциональных сайтов и предсказание посттрансляционных модификаций пероксидаз**

Возможные сайты фосфорилирования, такие как остатки серина, треонина и тирозина, были предсказаны с помощью веб-сервера GPS (Xue et al., 2008). Предполагаемые сайты гликозилирования анализировали с помощью программного обеспечения NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Сайты S-пальмитоилирования и N-миристоилирования анализировали с помощью GPS-Lipid 1.0 (Xie et al., 2016). Другие сайты, такие как активные сайты, сайт сигнального пептида и консервативных аминокислотных остатков, гем-лиганд, были предсказаны с помощью InterProScan (Mitchell et al., 2019).

#### **2.13.6. Анализ вторичной и третичной структуры белков**

Вторичная структура белков пероксидаз была предсказана с помощью программы NPSA-PRABI: [https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=npsa\\_sopma.html](https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) (Geourjon, Deléage, 1995), а третичная структура белков была определена с помощью SWISS-MODEL: <https://swissmodel.expasy.org/> (Waterhouse et al., 2018). Проверка модели была выполнена с помощью анализа графических результатов Рамачандрана с помощью MolProbity (Chen et al., 2010). Сравнение 3D структур проводилось путем расчета значений процентной идентичности и среднеквадратичного отклонения моделей с использованием программного обеспечения UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) после применения суперпозиции и анализа файлов банка данных белков.

#### **2.13.7. Филогенетический и сравнительный анализы последовательности белков пероксидаз**

Гомологичные последовательности белков пероксидаз были получены с помощью Blastp Uniprot (<https://www.uniprot.org/>) и выровнены с помощью ClustalW. Филогенетическое древо было построено и модифицировано в MEGA X (Kumar et al., 2018).

### **2.14. Анализ экспрессии генов**

#### **2.14.1. Выделение тотальной РНК и синтез кДНК при помощи ОТ-ПЦР**

Тотальную РНК *D. scorarium* выделяли с помощью набора RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Германия), используя инструкцию производителя. Концентрацию РНК определяли на NanoDrop

1000 (Thermo Scientific, США), ее нативность оценивали при разделении в 1% агарозном геле при помощи электрофореза. Для проведения обратной транскрипции (ОТ) использовали реакционную смесь объемом 20 мкл. На первой стадии 2 мкл тотальной РНК в присутствии 1 мкл праймеров Oligo(dT)<sub>16</sub> (1 мкМ) (Синтол, Россия) и 8 мкл MilliQ с 0,01% DEPC прогревали при +65° С в течение 5 мин. На второй стадии к этой смеси добавляли 4 мкл дезоксирибонуклеотидфосфатов (2 мМ), 4 мкл 5-кратного RevertAid RT буфера (рН 8,3, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>) и 1 мкМ (200 ед.) RevertAid RT обратной транскриптазы (Thermo Scientific, США). ОТ-ПЦР проводили, используя C1000 Touch™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США) амплификатор при следующих режимах: 5 мин при +65° С, 60 мин при +42° С и 10 мин при +70° С. В дальнейшем в качестве источника матриц для ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) использовали 2 мкл полученной кДНК.

#### 2.14.2. Амплификация участков кДНК с помощью ПЦР-РВ

Для амплификации участков кДНК дикранума были сконструированы праймеры на основе последовательностей, представленных после идентификации *POD* и клонирования *APX*. Праймеры конструировали с помощью онлайн-сервера Roche ([https://lifescience.roche.com/global\\_en/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center](https://lifescience.roche.com/global_en/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)) и программ Vector NTI. Оценку уровня экспрессии генов *POD* и *APX D. scoparium* осуществляли с помощью ПЦР-РВ относительно референсных генов: 18S рибосомальной РНК (*18S*), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GAPDH2*) и  $\alpha$ -тубулина ( *$\alpha$ -TUB1* и  *$\alpha$ -TUB2*, табл. 1, Onele et al., 2021). Размеры наработанных фрагментов кДНК дикранума соответствовали по молекулярным массам, теоретически ожидаемым, при проверке специфичности праймеров путем разделения ПЦР-продуктов в 1% агарозном геле.

Для проведения ПЦР-РВ использовали реакционную смесь общим объемом 25 мкл: 2 мкл ДНК-матрицы (0,001 – 10 нг), 0,25 мкл каждого праймера (Thermo Scientific, США), 2,5 мкл 10-кратного Taq-буфера (рН 8,6), 2,5 мкл 25 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1,5 мкл смеси 2,5 мМ дезоксирибонуклеозидтрифосфатов и 15,75 мкл MilliQ. ПЦР-РВ проводили в градиентном ДНК-амплификаторе *CFX Connect*™ Real-Time System (Bio-Rad) в следующих режимах: 3 мин при +95° С, 10 с при +94° С (40 циклов) и 40 с при соответствующей для каждой пары праймеров температуре. ПЦР продукты оценивали по флуоресценции SYBR Green, применяя соответствующие фильтры для возбуждения флуорофора и фиксирования флуоресценции, (абсорбция при  $\lambda = 497$  нм и эмиссия при  $\lambda = 520$  нм). Оптимизацию реакции осуществляли, варьируя концентрации MgCl<sub>2</sub>, праймеров, температуру и время отжига праймеров. Анализ относительного уровня экспрессии генов проводили с помощью программы Bio-Rad *CFX Maestro*™.

Таблица 1. Список использованных праймеров (F – прямой праймер, R – обратный праймер)

Праймеры	Последовательность 5' – 3'	Размер продукта, п. н.	Темп. отжига, °С
<i>DsPOD1</i>	F: CTCCTCGTCCACGTTCAACT R: CGAGGTTGTGGAGAGGATGT	166	60
<i>DsPOD2</i>	F: TGTGACCAAAGCAGCGATAG R: GCCAAGATGTCAGCACAAGA	243	60
<i>DsPOD6</i>	F: GGCACCTGCAAAAGCATACAA R: TCCCGGAAGTACTGGTTGTC	169	59
<i>DsPOD8</i>	F: TCCATGACTGCTTCGTTGAG R: GGGAGGCCTTGAAGTTTAG	238	59
<i>DsAPX</i>	F: TGCTCACACCTTGGGAAGAT R: CACCCTCCAACAACACCTTG	110	58
<i>18S</i>	F: TGGAGGGCAAGTCTGGTG R: TTTAACTGCAACAACCTTAAATATACGC	75	60
<i>GAPDH2</i>	F: TCAGTGGTGGACTTGAAGTGTG R: CTGCCTTGACGTCCTCGTA	61	59
<i>α-TUB1</i>	F: TCTATGATGGCGAAGTGCGACCCC R: GGGGGCTGGTAGTTGATTCCGCA	182	64
<i>α-TUB2</i>	F: TTGTGGACTTGTGCTTGGACCG R: AGCCTCTCCAGCAACAGCGAAC	130	59

## 2.15. Статистическая обработка данных

Анализ физиологических и биохимических параметров проводился в 3-9 биологических и 3-5 аналитических повторах. На рисунках и в таблицах представлены среднеарифметические значения и их стандартные отклонения. Статистическую обработку результатов проводили с помощью Теста Тьюки в программе R, результаты считали достоверно значимыми при  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*)).

При анализе экспрессии генов все реакции проводили в 3 биологических и 6 аналитических повторах. Различия в экспрессии генов оценивали по нормализованной экспрессии ( $\Delta\Delta Cq$ ) в Bio-Rad *CFX Maestro*<sup>TM</sup> и считали достоверными при  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*) по ANOVA и Shapiro-Wilk Normality Test. Вертикальные столбики показывают стандартные ошибки среднего ( $n = 6$ ).

### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Образование АФК в *D. scoparium*

Универсальной стрессовой реакцией живых организмов является повышение образования АФК. В клетках постоянно поддерживается баланс между образованием и удалением АФК. Известно, что длительное повышение уровня АФК может индуцировать в клетках окислительный стресс (Sharma et al., 2012; Das, Roychoudhury, 2014). Нами обнаружено, что побеги *D. scoparium* могут образовывать внеклеточный  $\cdot\text{OH}$  (рис. 9А, Б). Уровень  $\cdot\text{OH}$  после гидратации сухого мха был почти в два раза выше (рис. 9Б), чем в предварительно гидратированных побегах за те же промежутки времени инкубации с акцептором (рис. 9А). Образование  $\cdot\text{OH}$  может происходить как неферментативно в реакции Фентона, так и ферментативно с помощью редокс-ферментов (Gechev et al., 2006; Hasanuzzaman et al., 2020). В частности, реакция Фентона в среде, содержащей ионы железа, стимулируется  $\text{H}_2\text{O}_2$ , образующейся в результате окислительного взрыва, происходящего после обезвоживания и последующей гидратации.

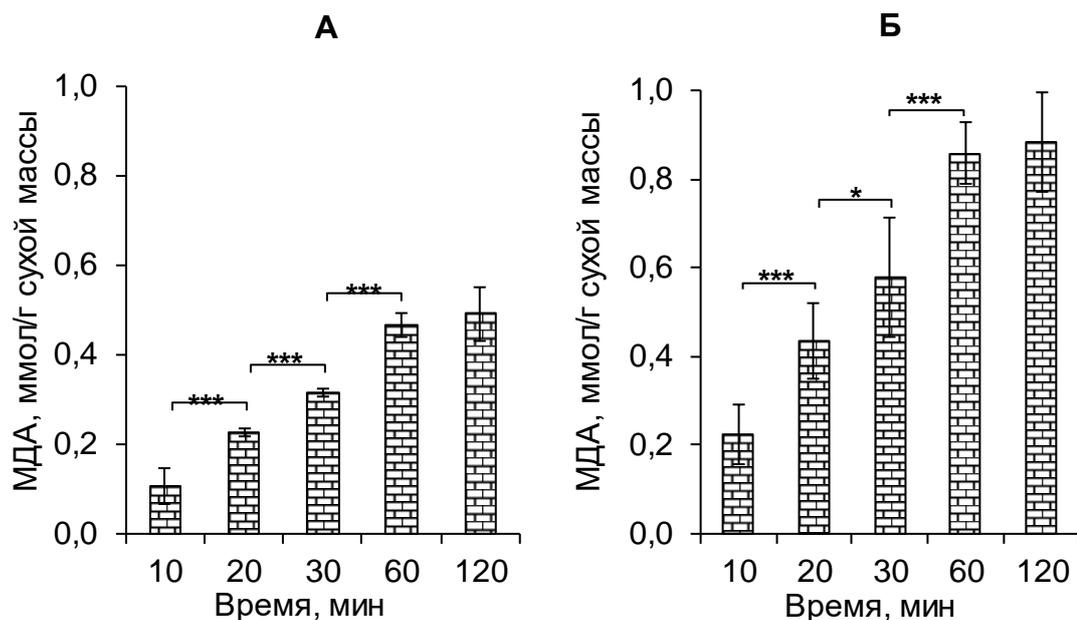


Рис. 9. Внеклеточное образование  $\cdot\text{OH}$ . А – образование  $\cdot\text{OH}$  в предварительно гидратированных (24 ч) побегах *D. scoparium*, Б – образование  $\cdot\text{OH}$  при гидратации сухого мха. Здесь и далее достоверно при  $P \leq 0,05$  (\*),  $P \leq 0,01$  (\*\*),  $P \leq 0,001$  (\*\*\*)

Действительно, обнаружено, что после гидратации сухих побегов *D. scoparium* в течение 1 ч происходило значительное увеличивало содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  во мхе, при этом дальнейшее обезвоживание приводило к постепенному снижению содержания  $\text{H}_2\text{O}_2$  в сравнении с сухим мхом к 72 ч воздействия (рис. 10). Регидратация мха после 72 ч обезвоживания также приводила

к увеличению содержания  $H_2O_2$  (примерно в 2 раза в сравнении с контрольным вариантом (рис. 10)). Было показано, что у мха *Atrichum androgynum* после обезвоживания во время регидратации происходил окислительный взрыв (Mayaba et al., 2002). Авторы предполагают, что высвобождаемая растениями во время регидратации  $H_2O_2$  на самом деле производится во время обезвоживания и накапливается в апопласте (Mayaba et al., 2002).

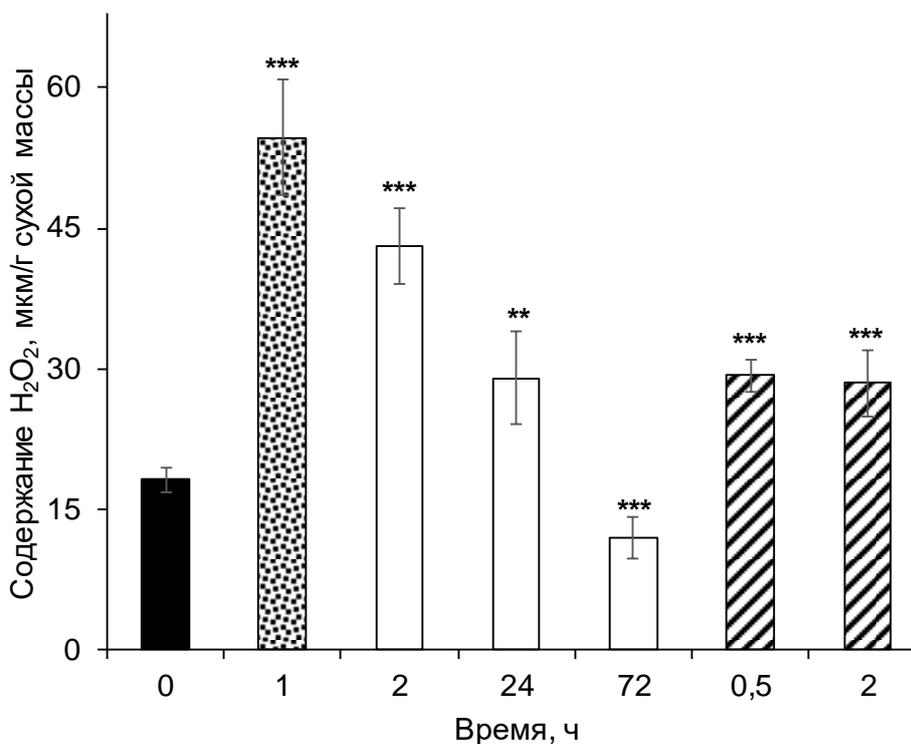


Рис. 10. Содержание  $H_2O_2$  в *D. scoparium* при обезвоживании над силикагелем и после регидратации. Черный столбик – сухой мох, столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация.

В настоящее время известно, что пероксидазы высших сосудистых растений могут проявлять прооксидантную функцию и катализировать образование АФК (Richards et al., 2015). Однако каталитический путь, по которому функционирует пероксидаза (деградировать  $H_2O_2$  или образовывать АФК), зависит от условий окружения фермента (Passardi et al., 2004a).

Рядом авторов было отмечено, что у сосудистых растений, в зависимости от вида растения,  $O_2^{\bullet-}$  в апопласте образуется за счет работы NAD(P)H-оксидаз и/или пероксидаз (Bolwell et al., 2002; Torres, Dangl, 2005). Анализ восстановления ХТТ показал, что *D. scoparium* может образовать  $O_2^{\bullet-}$  в присутствии NADH (рис. 11). Добавление SOD почти на 50% ингибировало степень восстановления, что указывает на то, что некоторое восстановление ХТТ происходило за счет других радикалов. Значительное ингибирование восстановления ХТТ с помощью SOD в ферментативной вытяжке мха подтверждает образование  $O_2^{\bullet-}$  (рис. 11). Ранее было показано, что

в ферментативной вытяжке антоцероса (*Anthoceros natalensis*) происходило образование ХТТ формазана, и данная реакция была чувствительна к SOD (Chasov et al., 2015). Кроме того, обнаружено, что печеночник *Dumortiera hirsute* способен к экстраклеточному образованию  $O_2^{\cdot-}$  с высокой скоростью даже в отсутствие стресса (Beckett et al., 2004).

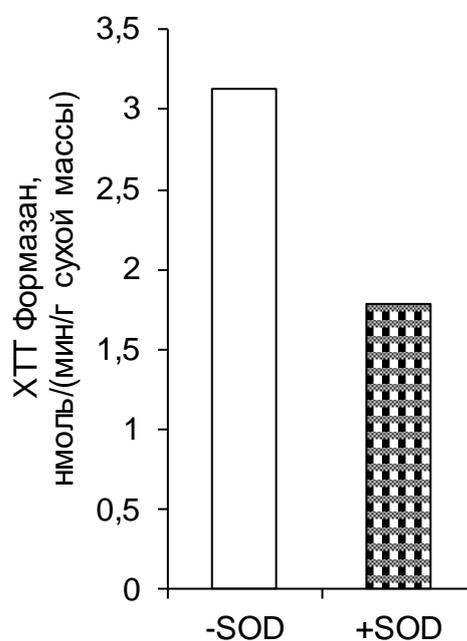


Рис. 11. А – Внутриклеточное образование  $O_2^{\cdot-}$  во мхе *D. scoparium* в присутствии 0,1 мМ NADH в качестве восстановителя. Образование  $O_2^{\cdot-}$  детектировалось с помощью ХТТ в присутствии или в отсутствие 250 ед/мл SOD в натрий-цитратном буфере, pH 7,8.

При стрессе в клетках бриофитов так же, как и у большинства растений, может происходить повышение уровня АФК (Minibayeva, Beckett, 2001). Основными источниками АФК, образующихся во время окислительного взрыва в растительных клетках, вероятно, являются ферменты, локализованные на внешней поверхности растительных клеток, в частности NAD(P)H-оксидазы или другие оксидазы и/или пероксидазы клеточной стенки (Bolwell et al., 2002; Gechev et al., 2006; Веселова и др., 2018). При изучении экстраклеточного образования  $O_2^{\cdot-}$  у ряда мохообразных и лишайников было обнаружено, что продукция  $O_2^{\cdot-}$  сильно различается у разных видов и часто связана со способностью вида переносить обезвоживание (Minibayeva, Beckett, 2001). В то время, как продукция АФК является частью общей реакции организмов на стрессы, такие как обезвоживание или регидратация, мхи, по-видимому, производят достаточно АФК и для защиты от патогенов (Lehtonen et al., 2009, 2012).

### 3.2. Активность редокс-ферментов *D. scoparium*

Одним из ключевых компонентов стрессовой устойчивости растений является способность поддерживать редокс-статус клетки и контролировать уровень АФК, в том числе с помощью антиоксидантных ферментов. Активность редокс-ферментов в клетках зависит от

комплементарных и/или конкурентных взаимоотношений, в том числе и с другими редокс-ферментами. Конкурировать с пероксидазой за субстрат могут такие ферменты, как фенолоксидаза, которая, как и пероксидаза, окисляет фенольные соединения, и каталаза, которая, как и пероксидаза, элиминирует  $H_2O_2$ . Было показано, что активность пероксидазы была на 2 порядка выше активности каталазы и на 3 порядка выше активности фенолоксидазы. (табл. 2). Аналогично, высокая пероксидазная активность в сравнении с другими редокс-ферментами наблюдалась при исследовании антоцероса *A. natalensis* (Chasov et al., 2015). Вероятно, что высокая активность пероксидазы *D. scoparium* связана с большой функциональной ролью, которую она выполняет в данном мхе.

Таблица 2. Активность окислительно-восстановительных ферментов в *D. scoparium*

Ферменты	Субстраты	нкат г <sup>-1</sup> сухой массы
Пероксидаза	<i>o</i> -дианизидин	9846 ± 876
Каталаза	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	94 ± 18
Фенол оксидаза	<i>o</i> -дианизидин	2 ± 0

Был проведен кинетический анализ общей активности пероксидазы III класса и обнаружено, что пероксидаза *D. scoparium* окисляет как природные, так и синтетические субстраты (табл. 3). Сродство пероксидазы к субстратам ( $K_m$ ) увеличивалось в следующем порядке: *p*-кумаровая кислота < кофейная кислота < *o*-дианизидин < ABTS, тогда как максимальная скорость реакции повышалась в ряду: ABTS < *p*-кумаровая кислота < кофейная кислота < *o*-дианизидин. (табл. 3).

Таблица 3. Константа Михаэлиса ( $K_m$ ) и максимальная скорость ( $V_{max}$ ) окисления различных субстратов пероксидазами *D. scoparium*

Субстраты	$K_m$ (мкМ)	$V_{max}$ (мкМ мин <sup>-1</sup> )
ABTS	99	0.1
<i>o</i> -Дианизидин	246	877.2
<i>p</i> -Кумаровая кислота	643	72.7
Кофейная кислота	365	552.5

*Dicranum scoparium* и другие мхи, например, *Polytrichum*, *Sphagnum*, *H. splendens* и *P. Schreberi*, являются важными компонентами бореальной лесной экосистемы. Эти мхи составляют 30–95% среднего покрова бореального леса и дают чистую первичную продуктивность от 200 до > 400 кг/га год, а их общая биомасса составляет от 0,1 до 2,0 Мц/га как

живой мох и 2,0 – 4,0 Мц/га как мертвый мох (Vogel, Gower, 1998; Turetsky, 2003). Кроме того, ассоциации мох - цианобактерии листостебельных мхов являются главными фиксаторами азота в бореальных системах (Rousk et al., 2013), хотя *D. scoparium*, по-видимому, обычно не обладает этим симбионтом (Bay et al., 2013). В литературе отсутствуют сведения о каких-либо систематических попытках изучения активности пероксидаз в бореальных мхах, поэтому в первоначальных экспериментах мы измерили активность в нескольких, совместно произрастающих мхах.

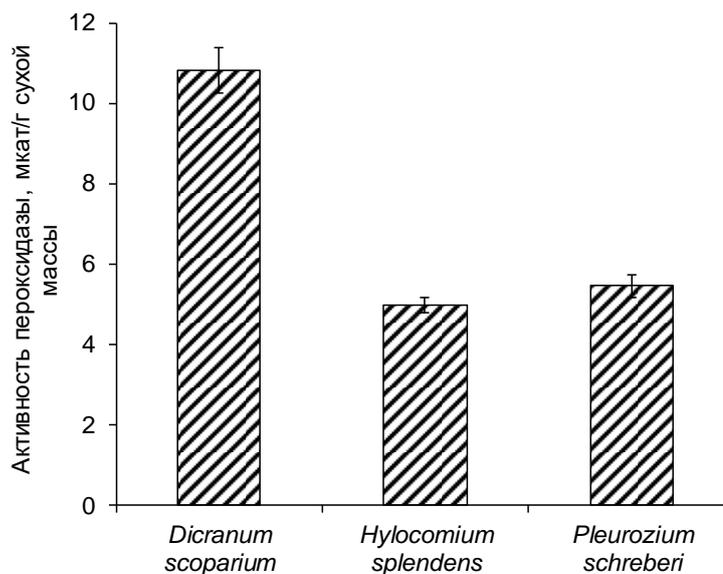


Рис. 12. Активность пероксидазы в различных видах мхов.

В нашей работе были исследованы лесные мхи *H. splendens*, *D. scoparium*, *P. schreberi*, произрастающие на территории Республики Татарстан. Нами показано, что наивысшая активность пероксидазы наблюдалась у *D. scoparium* (рис. 12). Данная активность была выше активности пероксидазы мхов *H. splendens* и более чем в 2 раза превосходила активность пероксидазы *P. schreberi* (рис. 12). Во всех видах наблюдалось большое разнообразие изоформ пероксидазы (данные не представлены). Это согласуется с данными анализа последовательности генома модельного мха *P. patens*, в котором выявлено 45 предполагаемых генов пероксидазы класса III (Lehtonen et al., 2009). В предварительном исследовании нами было обнаружено, что пероксидаза дикранума сохраняет свою активность при хранении в течение длительного времени (данные не представлены).

Как уже отмечено во Введении, бриофиты являются перспективными моделями для изучения механизмов стрессовой устойчивости растений, поскольку обладают особой устойчивостью к действию таких стрессоров, как высокие и низкие температуры и

обезвоживание (Norr, 1974; Wood, 2007; Rensing et al., 2008). Кроме того, гены мхов высокоомологичны генам сосудистых растений. Например, почти 66% генов у гаметофитов *P. patens* из баз данных EST, идентифицированных при анализе экспрессии генов, гомологичны генам *Arabidopsis* (Alam et al., 2012). Анализ генома мха *P. patens* показал, что он обладает большими мультигенными семействами, вовлеченными в стрессовую устойчивость. Эти семейства генов, вероятно, первоначально способствовали эволюционному переходу бриофитов на землю, а затем приобретению стрессовой устойчивости (Rensing et al., 2008). В связи с этим неудивительно, что окислительно-восстановительные ферменты, такие как пероксидазы, хорошо представлены в геноме бриофитов.

### 3.2.1. Активность пероксидаз в цикле обезвоживание/регидратация в *D. scoparium*

Можно полагать, что класс III пероксидазы играют важную роль в формировании устойчивости к обезвоживанию мха *D. scoparium*. Для подтверждения этого предположения нами были проведены эксперименты по анализу активности пероксидазы при обезвоживании побегов *D. scoparium* в эксикаторе над раствором 35% CaCl<sub>2</sub>, и силикагелем в течение недели и 72 ч, соответственно.

Обнаружено, что при обезвоживании над раствором 35% CaCl<sub>2</sub> уровень относительного содержания воды (ОСВ) в побеге *D. scoparium* постепенно снижался и достигал 25% после 168 ч (рис. 13). После гидратации сухого образца (10 мин) в течение суток пероксидазная активность достоверно не изменялась и была схожа с той, которая наблюдалась до быстрой регидратации в сухом образце (рис. 13). Было обнаружено, что активность пероксидазы при медленном обезвоживании *D. scoparium*, увеличивалась в 1,5 раза, когда содержание воды падало ниже 80%, что соответствовало 48 ч обезвоживания в исследуемых условиях (рис. 13). К концу недели на 6-7 сутки обезвоживания, когда ОСВ падало до 40-25%, активность пероксидазы увеличивалась почти в 2 раза в сравнении с таковой в сухом образце (рис. 13). При дальнейшей регидратации мха активность пероксидазы сначала достоверно снижалась (1 ч инкубации в дистиллированной воде), а затем достоверно повышалась (2 ч инкубации), достигая своего максимума, наблюдаемого в данном эксперименте (рис. 13).

Было показано, что гидратация сухого мха приводила к повышению активности пероксидазы, при дальнейшем быстром обезвоживании над силикагелем в течение 24 ч активность фермента не изменялась (рис. 14). ОСВ составляло при этом 67% (рис. 14, врезка). Дальнейшее падение ОСВ до 6% через 72 ч обезвоживания приводило к снижению активности пероксидазы в сравнении с уровнем, наблюдаемом в сухом мхе (рис. 14). При быстрой регидратации побегов мха в течение 30 мин пероксидазная активность увеличивалась до максимального уровня, наблюдаемого в этом эксперименте, а ко второму часу регидратации несколько снижалась (рис. 14).

Обнаружено, что при обезвоживании над раствором 35%  $\text{CaCl}_2$  уровень относительного содержания воды (ОСВ) в побеге *D. scoparium* постепенно снижался и достигал 25% после 168 ч (рис. 13). После гидратации сухого образца (10 мин) в течение суток пероксидазная активность достоверно не изменялась и была схожа с той, которая наблюдалась до быстрой регидратации в сухом образце (рис. 13). Было обнаружено, что активность пероксидазы при медленном обезвоживании *D. scoparium*, увеличивалась в 1,5 раза, когда содержание воды падало ниже 80%, что соответствовало 48 ч обезвоживания в исследуемых условиях (рис. 13). К концу недели на 6-7 сутки обезвоживания, когда ОСВ падало до 40-25%, активность пероксидазы увеличивалась почти в 2 раза в сравнении с сухим образцом (рис. 13). При дальнейшей регидратации мха активность пероксидазы сначала достоверно снижалась (1 ч инкубации в дистиллированной воде), а затем достоверно повышалась (2 ч инкубации), достигая своего максимума, наблюдаемого в данном эксперименте (рис. 13).

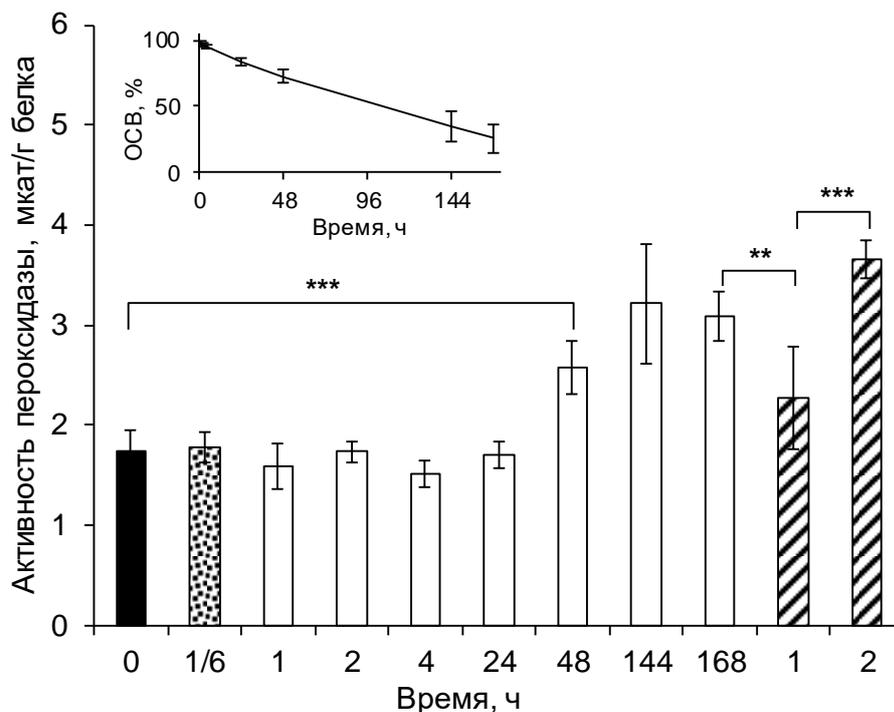


Рис. 13. Пероксидазная активность в побегах мха *D. scoparium* при медленном обезвоживании над раствором 35%  $\text{CaCl}_2$  и относительное содержание воды (ОСВ, врезка). Черный столбик – сухой мох (контрольный вариант), столбик с точками – 1/6 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация после обезвоживания.

Было показано, что гидратация сухого мха приводила к повышению активности пероксидазы, при дальнейшем быстром обезвоживании над силикагелем в течение 24 ч активность фермента не изменялась (рис. 14). ОСВ составляло при этом 67% (рис. 14, врезка). Дальнейшее падение ОСВ до 6% через 72 ч обезвоживания приводило к снижению активности

пероксидазы в сравнении с уровнем, наблюдаемом в сухом мхе (рис. 14). При быстрой регидратации побегов мха в течение 30 мин пероксидазная активность увеличивалась до максимального уровня, наблюдаемого в этом эксперименте, а ко второму часу регидратации несколько снижалась (рис. 14).

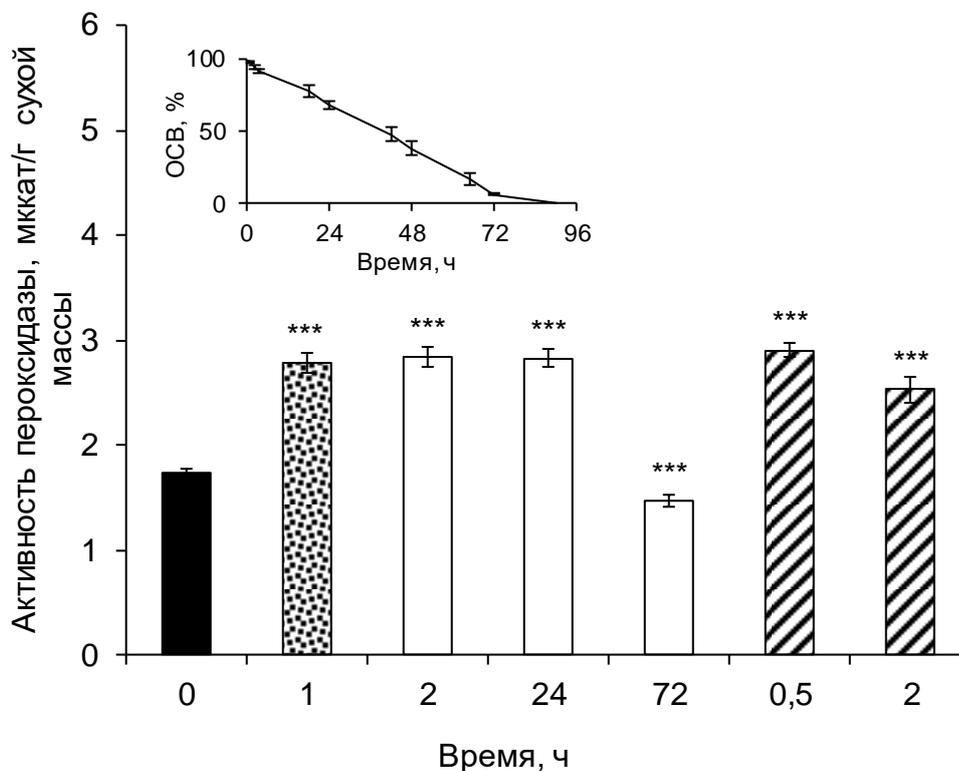


Рис. 14. Пероксидазная активность в побегах мха *D. scoparium* при быстром обезвоживании над силикагелем и при регидратации. Черный столбик – сухой мох (контрольный вариант), столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация после обезвоживания. ОСВ (врезка).

Считается, что поддержание высокого уровня или увеличение активности пероксидазы при водном стрессе важно для предотвращения накопления АФК и окислительного повреждения (Wang et al., 2003). Результаты настоящего исследования показывают, что активность пероксидазы может значительно возрастать, если мхи обезвоживаются в экологически реалистичных условиях. Обнаруживаемое нами снижение активности пероксидазы *D. scoparium* при 1 ч регидратации после медленного обезвоживания, вероятно, обусловлено повреждением пероксидаз из-за избытка образования АФК, который происходит при повторной гидратации тканей, устойчивых к обезвоживанию (Mayaba et al., 2002; Oliver et al., 2004; Cruz de Carvalho et al., 2012). Однако, активность пероксидазы быстро восстанавливалась – уже через 2 ч после регидратации (рис. 13), что согласуется с работой (Oliver et al., 2004), в которой показано увеличение содержания транскриптов генов пероксидаз, участвующих в защите от окислительного стресса при регидратации мха, устойчивого к обезвоживанию. Таким образом,

увеличение активности ферментов при обезвоживании и быстрое их восстановление после регидратации позволяют предположить, что пероксидазы играют важную роль в устойчивости к обезвоживанию мхов, возможно, за счет снижения стрессиндуцируемых АФК.

Известно, что в большинстве растительных тканей присутствуют как конститутивные, так и стресс-индуцируемые пероксидазы. Активность пероксидаз может быть увеличена различными стимулами, многие из которых связаны с защитным ответом на действия биотических и абиотических стрессовых факторов (Grenier, Asselin, 1990; Pan et al., 1991; Lagrimini et al., 1997). Общая активность пероксидазы в *D. scoparium* в контроле была конститутивно высокой. Уровень ее активности мог сохраняться неизменным как при медленном, так и при быстром обезвоживании. К концу как медленного, так и быстрого обезвоживания активность пероксидазы могла повышаться или восстанавливаться после регидратации (рис. 13 и 14). Таким образом, *D. scoparium* обладает высокой конститутивной активностью пероксидазы с различными изоформами (рис. 13), которая может быть лишь незначительно увеличена при стрессе, в том числе при обезвоживании. Исследования последних десятилетий значительно расширили наши знания о конститутивной и индуцированной устойчивости к действию стрессовых факторов. Считается, что индуцированная устойчивость может запускаться только в ответ на первое сильное воздействие стрессового фактора (Dietrich et al., 2004). Способность мхов противостоять действию стрессоров и восстанавливаться к норме после быстрой потери воды до величины водного потенциала ниже -500 МПа в течение 30 минут, указывает на то, что они имеют конститутивный механизм клеточной защиты, который активируется во время обезвоживания. Эффективность этой конститутивной клеточной защиты была доказана на *T. ruralis*, так органеллы этого мха в сухом состоянии остались неизменными, плазматическая мембрана также сохраняла свою нормальную двухслойную организацию (Oliver, Goffinet, 2008). Установлено, что потеря воды в очень сухой атмосфере происходит слишком быстро, и, возможно, поэтому растения не успевают индуцировать и запускать процессы клеточной защиты. Для сохранения целостности организма требуется не только переключение метаболических путей для создания защитных компонентов, но и индукция транскрипции и синтеза новых белков, которые необходимы для устойчивости. На все это необходимо значительное количество времени. Доказано, что синтез белка в *T. ruralis* и других мхах, особенно в процессе инициации трансляции белков, чрезвычайно чувствителен к потере воды из цитоплазмы, поэтому при возникновении такой ситуации прекращается синтез белков, в том числе и белков, необходимых для клеточной устойчивости (Bewley, Krochko, 1982). Кроме того, даже при медленном обезвоживании (в течение 6 ч) новые транскрипты не принимают участие в механических процессах синтеза белков, и поэтому устойчивость к обезвоживанию у бриофитов, по крайней мере, в мхах *T. ruralis* не требует синтеза новых белков в фазе обезвоживания (Oliver,

Goffinet, 2008). Другими авторами было показано, что в цикле обезвоживание/регидратация не происходило изменение уровня транскриптов генов пероксидаз мхов, устойчивых к обезвоживанию (Gao et al., 2015, 2017). На основании полученных результатов можно заключить, что белки или ферменты, участвующие в создании защитных компонентов, уже присутствуют в клетках в достаточных количествах, чтобы добиться устойчивости к обезвоживанию. Нужно учитывать, что этот механизм отличается от стратегии вегетативной устойчивости, когда такие белки синтезируются *de novo* при обезвоживании (Bartels, Sunkar, 2005).

### **3.2.2. Локализация пероксидазы класса III во фракции мха *D. scoparium* и возможная роль пероксидазы в образовании $O_2^-$**

Класс III пероксидазы представляют собой гликопротеины, которые содержат N-связанные олигосахаридные цепи и расположены в цитозоле, вакуоли, клеточной стенке и внеклеточном пространстве (Hu, van Huystee, 1989; Asada, 1992). Показано, что углеводные фрагменты необходимы для стабилизации молекул пероксидазы (Hu, van Huystee, 1989). Предполагается, что активность пероксидазы в клеточных стенках растений поддерживает ее устойчивость к стрессам и способствует заживлению ран. Ishida с соавт. (1985, 1987) отметили, что большая часть активности пероксидазы была обнаружена в клеточных стенках культивируемых клеток *M. polymorpha*, пероксидаза также высвобождалась в культуральную среду из клетки.

С целью выявления зависимости активности пероксидазы от прочности связей фермента со структурными элементами клеточных стенок проводили фракционирование белков (см. п. 2.2.2 раздела «Объекты и методы исследований»). Было показано, что несмотря на то, что активность пероксидаз во внутриклеточной фракции была выше, чем в других фракциях, существенная часть активности пероксидаз была связана с клеточной стенкой различными связями (рис. 15А). При разделении белков с помощью ИЭФ во всех фракциях было обнаружено 8 мажорных изоформ с *pI* 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,8, 5,1, 9,5, 9,8 (рис. 15Б). Пероксидазы *D. scoparium* представлены в основном анионными изоформами. Интересно, что электрофоретический анализ пероксидаз в цитозоле и различных фракциях клеточной стенки выявил, что данные изоформы обладали сходными *pI* (рис. 15Б).

Нами показано, что пероксидазы в *D. scoparium* проявляют классические антиоксидантные функции (таб. 3, рис. 12-15). Известно, что пероксидазы высших сосудистых растений и пероксидазы бриофитов, имеют сложный окислительно-восстановительный цикл и, в определенных условиях, могут переключаться на прооксидантный режим (Mika et al., 2004; Газарян, 2006; Часов, Минибаева, 2009; Minibayeva et al., 2009; Chasov et al., 2015). Ранее нами было показано, что ряд лишайников, мхов, а также печеночник и антоцерос обладают высокой

редокс-активностью, в частности, при образовании  $O_2^{\cdot-}$  (Minibayeva, Beckett, 2001).

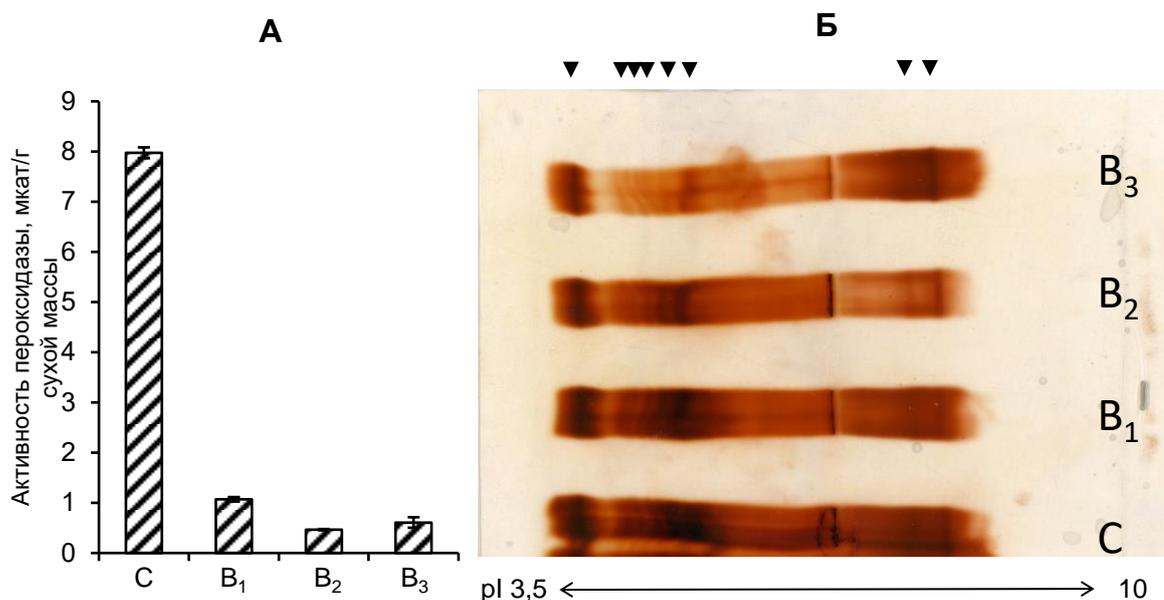


Рис. 15. А – активность пероксидаз из фракций клеточной стенки С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и В<sub>3</sub> и их изоферментный состав. С – внутриклеточная фракция. Фракции белков, связанных с клеточной стенкой: В<sub>1</sub> – водородными связями, В<sub>2</sub> – вандерваальсовыми силами и гидрофобными взаимодействиями, В<sub>3</sub> – ионными связями. Б – ИЭФ изоформ пероксидазы (указаны треугольниками). Визуализация *o*-дианизидином.

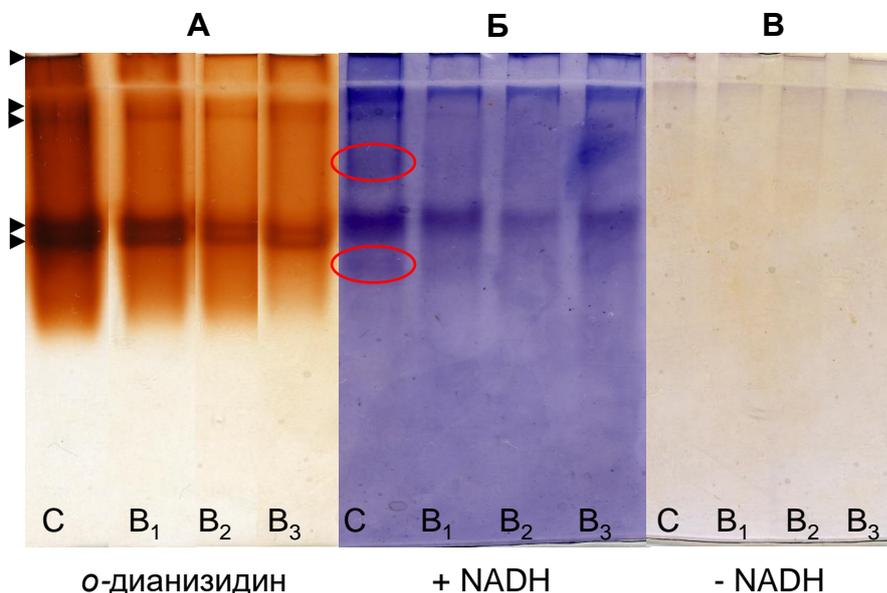


Рис. 16. Электрофоретическое разделение белков из фракций: С, В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> и В<sub>3</sub> (7% ПААГ): А – изоформы пероксидазы мха *D. scoparium* отмечены треугольниками (гель был окрашен *o*-дианизидином), Б – образование NADH-зависимого  $O_2^{\cdot-}$  (гель был окрашен NBT), кружками отмечены полосы, несоответствующие полосам изопероксидаз, В – гель, окрашенный NBT в отсутствие NADH (контроль).

Было продемонстрировано, что пероксидаза класса III принимает участие в образовании  $O_2^{\bullet-}$  в корнях *T. aestivum* (Minibayeva et al., 2009), в семенах *Castanea sativa* и *Trichilia* (Roach et al., 2010; Whitaker et al., 2010), в печеночнике (Li et al., 2010) и в антоцеросе (Chasov et al., 2015). С помощью окрашивания гелей NBT нами было подтверждено участие пероксидаз *D. scorarium* в генерации  $O_2^{\bullet-}$  (рис. 16А, Б; 17Б, В). Было показано, что все изоформы пероксидазы во внутриклеточной фракции и во фракции белков, связанных с клеточной стенкой, могут образовать  $O_2^{\bullet-}$  в присутствии NADH (рис. 16А, Б; 17Б, В). Электрофоретический анализ

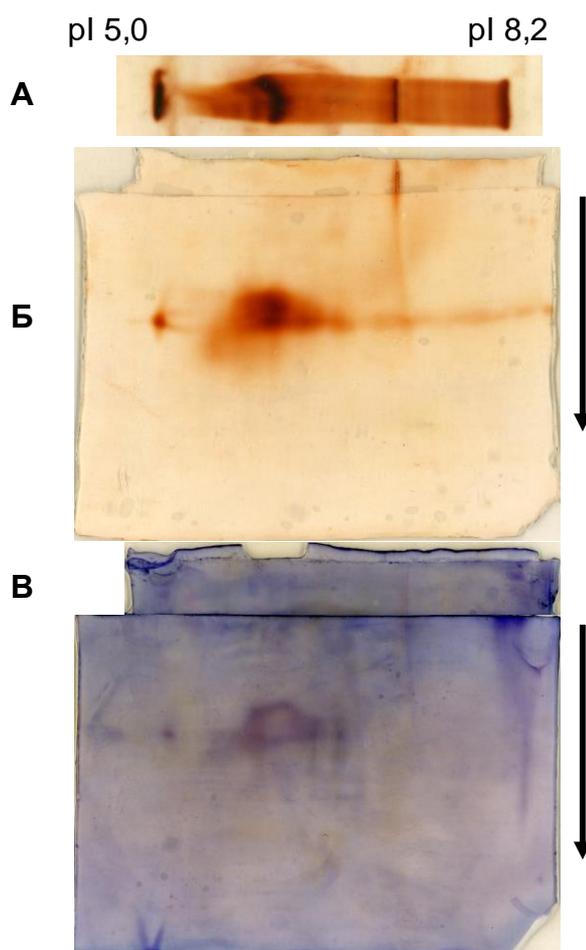


Рис. 17. А – ИЭФ белков из фракции  $V_1$  с последующим 2D-разделением в 7% ПААГ (Б, В). Гели были визуализированы с помощью *o*-дианизидина (А, Б), NADH зависимое образование  $O_2^{\bullet-}$ , визуализированное с помощью NBT-окрашивания (В).

различных клеточных фракций в 7% ПААГ показал, что визуализированные полосы изоформ пероксидазы из всех фракций: С,  $V_1$ ,  $V_2$  и  $V_3$  (рис. 16А), соответствовали полосам, визуализирующим образование  $O_2^{\bullet-}$  в присутствии NBT и NADH (рис. 16Б). Однако две полосы с  $O_2^{\bullet-}$ -образующей способностью из фракции С не соответствовали полосам с пероксидазной активностью (рис. 16Б, кружками отмечены). Таким образом,  $O_2^{\bullet-}$  в данной фракции мог образовываться еще и другими ферментами. Окрашивание геля NBT в отсутствие NADH (рис.

16B) не выявило образования  $O_2^{\cdot-}$ . Было показано, что частично очищенные анионные изопероксидазы из фракции В<sub>1</sub> после осаждения сульфатом аммония способны продуцировать  $O_2^{\cdot-}$ : ферменты после ИЭФ (рис. 17А) при последующем 2D-разделении в 7% ПААГ обнаруживались в виде характерных пятен при визуализировании пероксидазной активности (рис. 17Б) и визуализации  $O_2^{\cdot-}$ -образующей способности (рис. 17В). Аналогичные результаты были получены со всеми фракциями белков, связанных с клеточной стенкой различными связями (данные не представлены).

Среди возможных положительных эффектов прооксидантной функции пероксидаз, приводящих к образованию АФК у *D. scoparium*, может быть защита от патогенов. Например, воздействие грибкового хитозана на ткани *P. patens* вызывало быстрое образование АФК и увеличение активности нескольких окислительно-восстановительных ферментов, включая пероксидазы *PpPrx34* (Lehtonen et al., 2009, 2012). Несмотря на то, что анализ полученных гелей свидетельствует о том, что пероксидазы являются наиболее важными ферментами в образовании  $O_2^{\cdot-}$  у *D. scoparium*, некоторая  $O_2^{\cdot-}$  образующая активность у *D. scoparium* может происходить за счет других ферментов (рис. 16Б), вероятно, NAD(P)H зависимых.

Таким образом, можно паллагать, что образование АФК пероксидазами – эволюционно древний защитный механизм, способствующий повышению адаптационного потенциала высших растений, их приспособлению к меняющимся условиям среды и успешной колонизации различных экологических ниш (Chasov et al., 2015; Onele et al., 2018).

### 3.2.3. Внутри- и внеклеточная активность пероксидазы при регидратации *D. scoparium*

Пероксидазы класса III являются классическими секреторными растительными пероксидазами с универсальными функциями (Lüthje et al., 2018). В стрессовых условиях может происходить высвобождение фермента с клеточной поверхности (рис. 18А, Б). Активность внеклеточной пероксидазы в растворе, в котором инкубировали предварительно гидратированные мхи, была низкой и не изменялась со временем (рис. 18А). Активность внутриклеточной пероксидазы в ферментативной вытяжке тех же образцов также не показала значительных изменений (данные не представлены). Пероксидазная активность в растворе, где гидратировались сухие образцы *D. scoparium*, была в шесть (6) раз выше, чем активность в инкубационном растворе предварительно гидратированных (24 ч) мхов (рис. 18Б). Экстраклеточная активность пероксидазы оставалась стабильной в течение 2 ч регидратации, но снижалась после 24 ч (1440 мин) инкубации (рис. 18Б). Активность внутриклеточных пероксидаз после гидратации сухого *D. scoparium* не менялась со временем (рис. 18В).

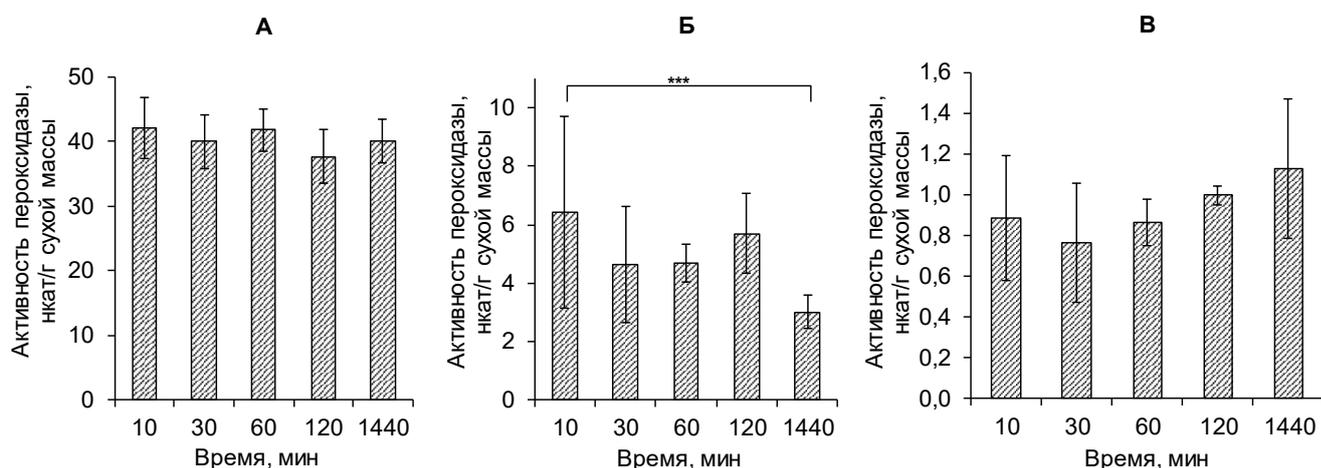


Рис. 18. А – активность экстраклеточной пероксидазы предварительно гидратированных в течение 24 ч и сухих (Б) побегов мха. В – активность внутриклеточной пероксидазы при гидратации сухих побегов мха *D. scoparium*. А-В – инкубация в дистиллированной  $H_2O$ .

Известно, что пероксидазы несосудистых растений из всех отделов бриофитов, в частности, антоцеротовых, печеночников и мохообразных, активируются при стрессовых воздействиях и высококомобильны (Hirata et al., 2000, Lehtonen et al., 2009, Chasov et al., 2015). Peroxidaza антоцероса, например, была детектирована в растворе, в котором проводили регидратацию, что, вероятно, обусловлено вымыванием с клеточной поверхности в раствор слабосвязанных изоформ пероксидазы (Chasov et al., 2015), пероксидаза суспензионной культуры *M. polymorpha* секретировалась в культуральную среду в ответ на воздействие химического стрессора – борнилацетата (Hirata et al., 2000), а пероксидазы суспензионной культуры мхов *P. patens* и *Racomitrium japonicum* в ответ на воздействие грибного элиситора – хитозана также активировались в культуральной среде (Lehtonen et al., 2009). Мобильность апопластных пероксидаз объясняется тем, что эти ферменты присутствуют на клеточной поверхности (Passardi et al., 2004b), откуда они могут быстро высвободиться в стрессовых условиях еще до того момента, когда начнется их индуцированный стрессом синтез (Almagro et al., 2009; Lehtonen et al., 2009).

### 3.2.4. Очистка пероксидаз из *D. scoparium* с помощью анионообменной хроматографии

К настоящему времени исследованы пероксидазы различных видов растений (Ahmad et al., 2019). Было очищено множество изоферментов пероксидаз, и обнаружено, что они отличаются друг от друга своей термостабильностью, молекулярной массой, специфичностью субстрата, оптимумом pH и их физиологической ролью (Ahmad et al., 2019).

Нами была проведена очистка пероксидаз мха *D. scoparium* путем осаждения белков сульфатом аммония с последующим разделением с помощью ионообменной хроматографии (рис. 19). Как в ферментативной вытяжке, так и после осаждения белков сульфатом аммония в

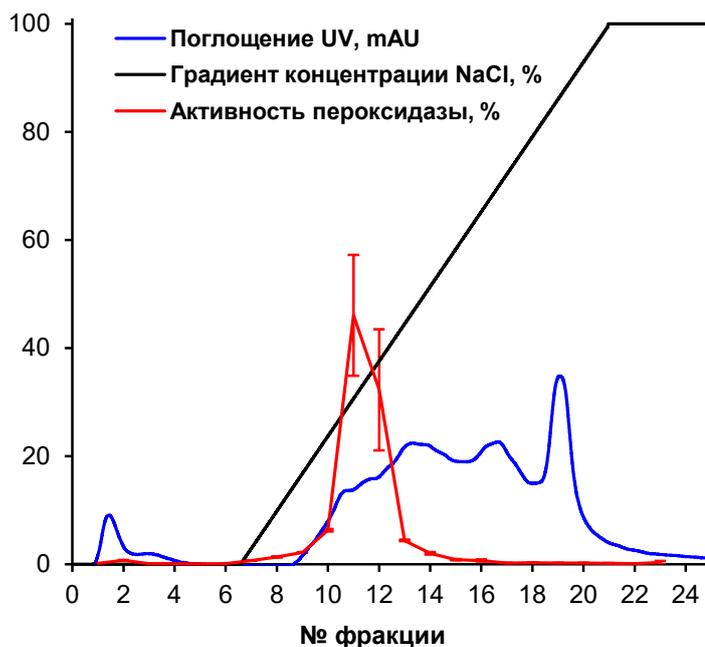


Рис. 19. Очистка пероксидаз дикранума с помощью анионообменной хроматографии (Hi-Trap Q FF 25 mM Трис-НСl буфер, рН 7,5). Белки элюировались градиентом NaCl (0-1 М).

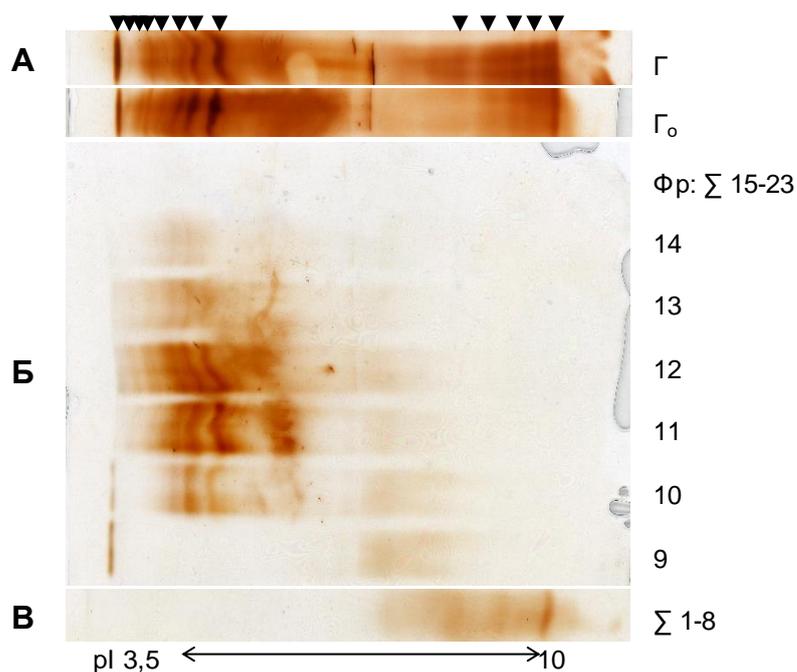


Рис. 20. ИЭФ изоформ пероксидазы *D. scorarium*; Г – гомогенат/ферментативная вытяжка, Г<sub>o</sub> – гомогенат/ферментативная вытяжка после осаждения белков сульфатом аммония. В геле пероксидазы окрашивали с помощью 5 мМ *o*-дианизидина и 1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в Na-цитратном буфере, рН 5,5., Фр: Σ 1-8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, Σ 15-23 – фракции после анионообменной хроматографии. Изоформы пероксидазы указаны треугольниками.

результате разделения образцов с помощью ИЭФ обнаруживалось 13 изоформ пероксидазы с  $pI$  4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,5, 4,6, 4,8, 5,1, 8,8, 9,1, 9,3, 9,5, 9,8, при этом большинство изоформ были анионными (рис. 20). В *A. natalensis* с помощью ИЭФ было детектировано 14 различных изоформ пероксидаз, но в отличие от мха в антоцеросе обнаруживались в основном катионные формы (Chasov et al., 2015). При элюировании осажденных белков с анионообменной колонки наблюдался один пик активности пероксидазы, который не совпадал с максимальным пиком элюции белков (рис. 19). После анионообменной хроматографии и разделения белков с помощью ИЭФ во фракциях, соответствующих пику элюции пероксидаз, обнаруживалось несколько анионных изоформ (рис. 20Б); в не связавшихся с ионообменной колонкой фракциях (№ 1–8) содержались катионные изоформы пероксидаз (рис. 20В).

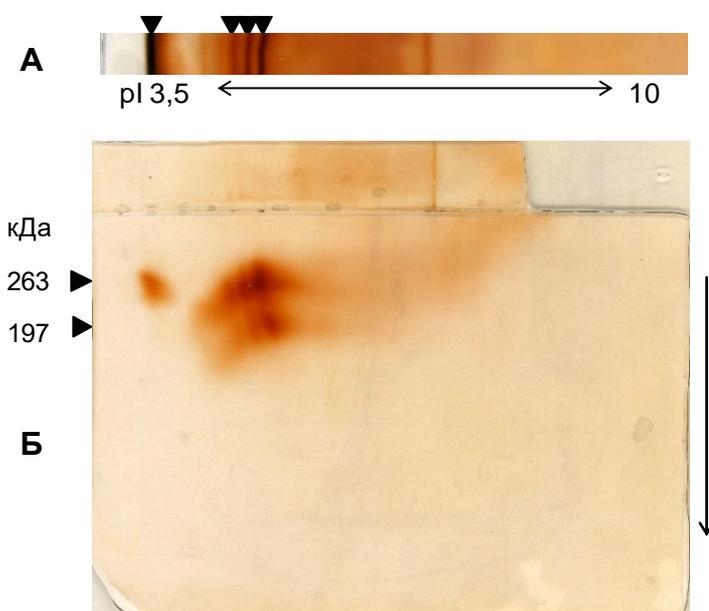


Рис. 21. А – ИЭФ белков после анионообменной хроматографии (фракции  $\Sigma$  10-14) с последующим разделением в 10% ПААГ (2D-электрофоретическое разделение белков) (Б).

Изоформы из фракций, соответствующих пику элюции пероксидаз при ионообменной хроматографии, в дальнейшем исследовали с помощью 2D гель-электрофореза: ИЭФ (рис. 21А) с последующим разделением в ПААГ (рис. 21Б). Анализ с помощью 2D гель-электрофореза выявил 7 мажорных анионных изоформ: каждой полосе с  $pI$  4,6, 4,8, 5,1 (рис. 21А) соответствовало по два белка с молекулярными массами 197 и 263 кДа, а полосе с  $pI$  4,0 – один белок с молекулярной массой 263 кДа (рис. 21Б). Эти белки, вероятно, являются олигомерами, исходя из типичной массы мономерной пероксидазы класса III около 40 кДа (Hirata et al., 2000). С помощью электрофоретического разделения нами выявлено не менее 16 изоформ пероксидаз (рис. 15Б, 16А, 20, 21), таким образом, пероксидазы *D. scorarium* представлены широким спектром изоформ, что подтверждается нашими дальнейшими молекулярно-генетическими

исследованиями (см. п.п.3.2.6-3.2.7.). Можно полагать, что разнообразие пероксидаз в *D. scorarium* обусловлено разнообразием генов и синтезом различных генных продуктов, а также может быть результатом пост-трансляционных модификаций, например, гликозилирования, существующих пероксидазных белков.

### 3.2.5. Влияние неблагоприятных температур на активность пероксидазы III класса *D. scorarium*

Стресс, индуцированный воздействием высоких и низких температур, является одним из основных факторов, ограничивающих рост растений вследствие негативного влияния на фотосинтез, дыхание, стабильность мембран и метаболизм белков. Известно, что во время температурного стресса уровень АФК может резко возрастать, что может приводить к значительному повреждению клеточных структур (Chakraborty, Pradhan, 2011). Как уже отмечено во Введении, длительное накопление АФК, образующихся при воздействии экстремальных температур, вызывает окислительный стресс, который, в свою очередь, вызывает денатурацию функциональных и структурных белков, активирует клеточные сигнальные пути и клеточные реакции, например, образование стрессовых белков, усиление регуляции антиоксидантов (Rani et al., 2009; Chakraborty, Pradhan, 2011). В результате наших экспериментов было обнаружено, что активность пероксидазы дикранума повышалась после 2 ч воздействия как низких, так и высоких температур (рис. 22). Наибольшая активность фермента наблюдалась при +50° С (рис. 22). При охлаждении до -20° С пероксидазная активность значительно снижалась через 12 ч и

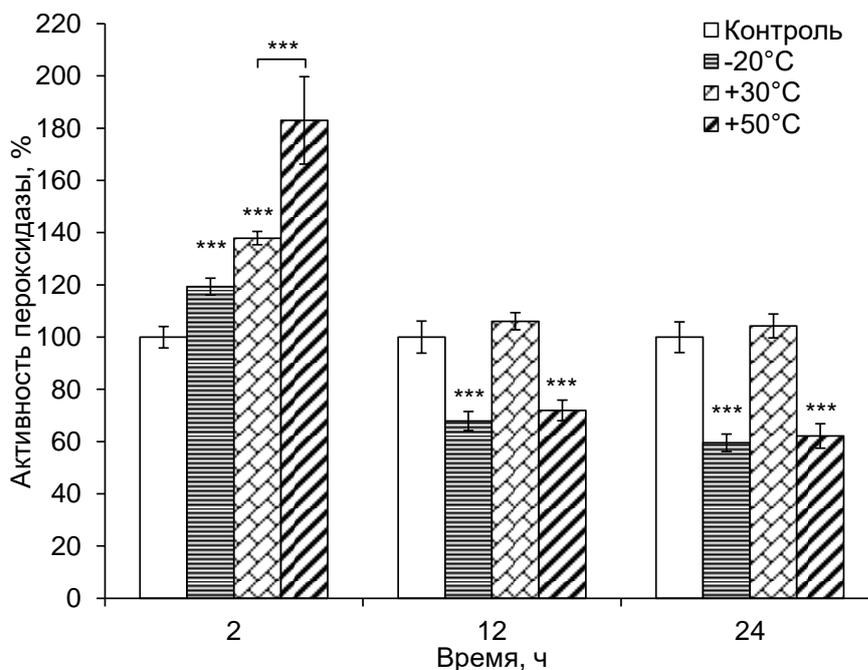


Рис. 22. Пероксидазная активность дикранума метловидного, выдержанного при -20° С, +30° С, +50° С в течение 2, 12 и 24 ч.

24 ч воздействия (рис. 22). Обнаружено, что длительное воздействие на мхи температуры +30° С не привело к изменению активности пероксидазы (рис. 22).

Активность пероксидазы значительно подавлялась при длительном воздействии (12 ч и 24 ч) высокой температуры +50° С (рис. 22). Увеличение активности ферментов в начале воздействия (2 ч) объясняется тем, что, вероятно, происходит повышенное образование АФК. Известно, что повышение температуры приводит к увеличению активности антиоксидантных ферментов до определенной температуры, после которой активность снижается (Chakraborty, Pradhan, 2011). Эффект увеличения активности пероксидазы при температурном стрессе ранее был описан для ряда растений. Активность пероксидазы в грубом экстракте из перикарпа *Litchi chinensis* увеличилась до максимума при +70° С и оставалась активной в течение 120 мин при +70° С и +80° С (Mizobutsi et al., 2010). Пероксидаза была полностью неактивной при выдерживании при +90° С в течение 10 мин или 1 мин при +100° С (Mizobutsi et al., 2010). Падение активности пероксидазы при высоких температурах фактически может быть связано с разрушением третичной структуры фермента (Lowrenco et al., 1990).

Интересно, что в нашей работе, пероксидаза была устойчива и при низких, и при высоких температурах, поскольку она сохраняла свою активность на почти 70–75% при -20° С и +50° С в течение 12 и 24 ч воздействия (рис. 22). Активация пероксидазы в начале воздействия и изменение уровня активности пероксидазы мха дикранума при различных температурных воздействиях может свидетельствовать о важной роли пероксидазы в устойчивости дикранума к абиотическим стрессам.

### **3.2.6. Идентификация генов и характеристика белков пероксидаз III класса в *D. scoparium***

Известно, что у высших сосудистых растений пероксидазы представляют собой мультигенное семейство и выполняют множество функций (Yoshida et al., 2003; Passardi et al., 2005). Как отмечалось в Обзоре литературы (см. п.1.4.1.2.3.1.), в сосудистых растениях пероксидазы широко изучены, и с помощью полногеномного анализа в нескольких сосудистых растениях были идентифицированы гены, кодирующие пероксидазы. В отличие от сосудистых растений, гены, кодирующие пероксидазы у мохообразных, идентифицированы недостаточно полно даже в секвенированных геномах. На сегодняшний день геном мха *D. scoparium* не секвенирован, и гены пероксидаз в базе данных отсутствуют. Мы идентифицировали 22 уникальных транскрипта пероксидаз дикранума из архива чтения последовательностей (Chen et al., 2018, 2019) в базе данных NCBI (табл. 4). Для верификации идентифицированных *in silico* *POD*-транскриптов дикранума были клонированы и секвенированы две *POD* последовательности. Blast-сравнение выявило высокую гомологию секвенированных генов пероксидаз дикранума (*DsPOD*) с *POD* других растений в базе данных NCBI: нуклеотидная последовательности *DsPOD2* (рис. 23А) имеет высокую гомологию (79,17%) с пероксидазой

*P. nutans*, (79,14%) с А2-пероксидазаподобной изоформой *P. patens*, (80,99%) с 72-пероксидазаподобной изоформой *P. patens* и (53,09%) с пероксидазой *Nicotiana tomentosiformis*, а *DsPOD6* (рис. 23Б) имеет высокую гомологию (82,53%) с 29-пероксидазаподобной изоформой *P. patens*. Высокая гомология клонированных и секвенированных нами пероксидаз дикранума с пероксидазами других растений подтверждает, что обнаруженные нами *POD*-транскрипты из баз данных SRA действительно кодируют пероксидазы III класса растений. Клонированные последовательности *DsPOD2* и *DsPOD6* практически полностью совпадают с идентифицированными из архива чтения последовательностей транскриптами соответствующих изоформ (рис. 23).

Таблица 4. Физико-химические свойства семейства *DsPOD* и их субклеточная локализация

Белок	КП (п.н)	КА	Мг (кДа)	ИЭТ	И. нестаб	СЗГ	Суб. лок.
DsPOD1	993	330	35.21	5.11	48.35	-0.037	ЭК/ХП
DsPOD2	1020	340	37.15	7.51	40.18	-0.150	ЭК
DsPOD3	1011	337	36.81	7.51	39.09	-0.137	ЭК
DsPOD4	945	315	33.47	5.22	33.41	0.059	ЭК
DsPOD5	1185	395	41.98	5.68	42.94	-0.128	ПМ/ХП
DsPOD6	936	312	33.08	4.89	36.87	0.023	ЭК
DsPOD7	984	328	36.20	6.26	43.59	-0.193	ЭК
DsPOD8	1011	337	36.12	4.53	41.83	-0.103	ЭК
DsPOD9	942	313	32.75	5.29	33.95	0.177	ЭК
DsPOD10	933	310	32.99	5.30	41.83	-0.070	ХП
DsPOD11	960	319	35.26	8.09	37.03	-0.250	ЭК
DsPOD12	978	325	34.52	9.48	32.55	0.098	ЭК
DsPOD13	963	320	34.91	8.97	29.66	-0.132	ЭК
DsPOD14	957	318	34.64	8.90	58.88	-0.050	ЭК/ПМ
DsPOD15	993	330	34.79	5.64	36.35	0.045	ХП
DsPOD16	723	241	25.25	4.48	28.37	0.093	ЭК/Цит.
DsPOD17	1023	341	37.41	7.07	37.65	-0.247	Цит.
DsPOD18	1023	340	36.99	8.32	32.89	-0.066	ЭК
DsPOD19	1065	354	37.76	4.57	36.63	0.039	ЭК
DsPOD20	1035	344	37.69	8.88	39.37	-0.179	ЭК/МТХ
DsPOD21	1029	342	36.49	4.31	30.33	0.106	ЭК
DsPOD22	687	229	24.46	4.27	18.69	0.209	ЭК

\*Сокращения: ПД – длина кодирующей последовательности, КА – количество аминокислот, Мг – молекулярная масса, ИЭТ – изоэлектрическая точка, И. нестаб – индекс нестабильности, СЗГ – среднее значение гидропатичности, Суб. лок. – субклеточная локализация, ЭК – экстраклеточное пространство, ХП – хлоропласт, ПМ – плазматическая мембрана, Цит. – цитоплазма, МТХ – митохондрия

## A. *DsPOD2*



Б. *DsPOD6*



Рис. 23. Результат выравнивания клонированных нуклеотидных последовательностей *DsPOD2* и *DsPOD6* с помощью Vector NTI.

В результате обнаружено, что длина кодирующих последовательностей составляет от 687 п.н. (DsPOD 22) до 1185 п.н. (DsPOD5) со средним значением 972,545 п.н. Молекулярная масса белков DsPOD варьирует от 24,46 кДа (DsPOD22) до 41,98 кДа (DsPOD5), а их теоретическая  $pI$  - от 4,27 (DsPOD22) до 9,48 (DsPOD12), при этом можно сказать, что большинство белков DsPOD являются кислыми (табл. 4), что согласуется с данными по определению изоферментов дикранума (рис. 15Б, 17А, 20А, Б, 21А). Обнаружено, что длина аминокислотной последовательности составляет от 229 аминокислот (DsPOD22) до 395 аминокислот (DsPOD5), со средним значением в 323,636 аминокислоты.

В наших экспериментах с помощью ИЭФ было выявлено 13 изоформ пероксидазы с  $pI$  в диапазоне от 4,0 до 9,8, причем большинство изоформ были анионными (рис. 20А). После 2D-электрофоретического разделения частично очищенных белков в 10% ПААГ после ИЭФ нами обнаружены семь основных изоформ пероксидаз: четыре изофермента были с массой 263 кДа и три с массой 197 кДа (рис. 21Б). Вероятно, это олигомерные белки, поскольку большинство пероксидаз являются гликопротеинами с одной полипептидной цепью из 300–350 аминокислотных остатков и молекулярной массой, варьирующей от 33 до 55 кДа (Jovanović et al., 2018). Известно несколько олигомерных пероксидаз, таких, как гомотетрамеры из кокоса с молекулярной массой 55 кДа для каждой субъединицы (Mujer et al., 1983), гетеротримеры из *Leucaena leucocephala* (состоящие из двух субъединиц по 66 кДа и одной субъединицы 58 кДа) (Pandey, Dwivedi, 2011) и гомодимеры из брюссельской капусты (две субъединицы по 45 кДа) (Regalado et al., 1999).

Кроме того, нами обнаружено, что большинство белков DsPOD стабильны по структуре, поскольку значения индекса нестабильности ниже 40 (табл. 4). Отрицательные значения по среднему значению гидропатичности показывают, что большинство белков DsPOD являются гидрофильными, следовательно, они хорошо взаимодействуют с апопластной средой клетки. Нами было показано, что активность пероксидазы дикранума обнаруживается в экстраклеточном растворе (рис. 18). Предсказание субклеточной локализации показало, что большинство белков DsPOD являются экстраклеточными пероксидазами. Нами показано, что доля пероксидаз, связанных с клеточной стенкой какими-либо связями (фр. В<sub>1</sub> – В<sub>3</sub>, рис. 15А), если судить по их суммарной активности, составляет до 30% от растворимых пероксидаз из фр. С (рис. 15А). Если учесть, что во фр. С также могут находиться не только цитозольные, но и растворимые белки апопласта, которые не взаимодействуют с клеточной стенкой какими-либо связями, то вклад экстраклеточных пероксидаз в общую активность будет еще больше. Интересно, что некоторые белки DsPOD были предсказаны в двух разных компартментах клетки, например, DsPOD1 локализован как в экстраклеточном пространстве, так и в хлоропластах, DsPOD5 - в плазматической мембране и хлоропластах, DsPOD14 - в экстраклеточном пространстве и

плазматической мембране, DsPOD16 - в экстраклеточном пространстве и цитоплазме, а DsPOD20 располагается как в экстраклеточном пространстве, так и в митохондриях (табл. 4). Нами обнаружено, что одинаковые изоформы находятся как в цитозольной фр. С, так и во фракциях белков, связанных с клеточной стенкой какими-либо связями, что подтверждает наши данные (рис. 15Б).

Известно, что пероксидазы III класса являются гликопротеинами, которые синтезируются в эндоплазматическом ретикулуме и транспортируются через аппарат Гольджи как в экстраклеточное пространство, так и в вакуоль (Jovanović et al., 2018). Предполагается, что среди экстраклеточных изоформ находятся те пероксидазы, которые связаны с матриксом клеточной стенки и участвуют в лигнификации (Sato et al., 1993), тогда как растворимые изоформы выполняют функцию антиоксидантов, элиминируя  $H_2O_2$ . С помощью протеомного анализа обнаружено, что из 73 пероксидаз III класса 32 изоформы пероксидаз *A. thaliana* находились в экстраклеточных фракциях, 17 из которых были встроены в плазматическую мембрану, а семь во фракциях, обогащенных вакуолями (Francoz et al., 2015). Пероксидазы III класса были идентифицированы в тилакоидах, тонопласте и плазматической мембране у катарантуса розового, ели, корней кукурузы и ячменя, листьев и корней пшеницы (Laloue et al., 1997; Zapata et al., 1998; Yusupova et al., 2006; Costa et al., 2008; Mika et al., 2008; Sottomayor et al., 2008). Биоинформатический анализ локализации белков пероксидаз показал, что некоторые из белков DsPOD могут располагаться в этих клеточных компартментах (табл. 4).

С помощью MEME в DsPOD обнаружено 10 различных консервативных мотивов длиной от 6 до 50 аминокислотных остатков (рис. 24А). Важно отметить, что все белки DsPOD содержат от 5 до 10 консервативных мотивов, третий и четвертый мотивы обнаруживаются во всех пероксидазах, вероятно, эти мотивы могут участвовать в важных функциях пероксидаз. У DsPOD1-DsPOD3, DsPOD5, DsPOD8, DsPOD11 и DsPOD13-DsPOD15 пероксидаз содержатся все 10 мотивов, у некоторых белков могут отсутствовать один или два мотива, а у DsPOD22 отсутствует пять мотивов (рис. 24А). Дальнейшее изучение консервативных доменов в базе данных NCBI показало, что 21 из 22-х белков DsPOD являются секреторными пероксидазами (рис. 24Б). DsPOD22 принадлежит суперсемейству пероксидаз растений, однако неясно, является ли она секреторной пероксидазой, вследствие отсутствия полной последовательности транскриптов. Таким образом, обнаруженные DsPOD, в соответствии с выявленными последовательностями, действительно являются классическими пероксидазами III класса растений.

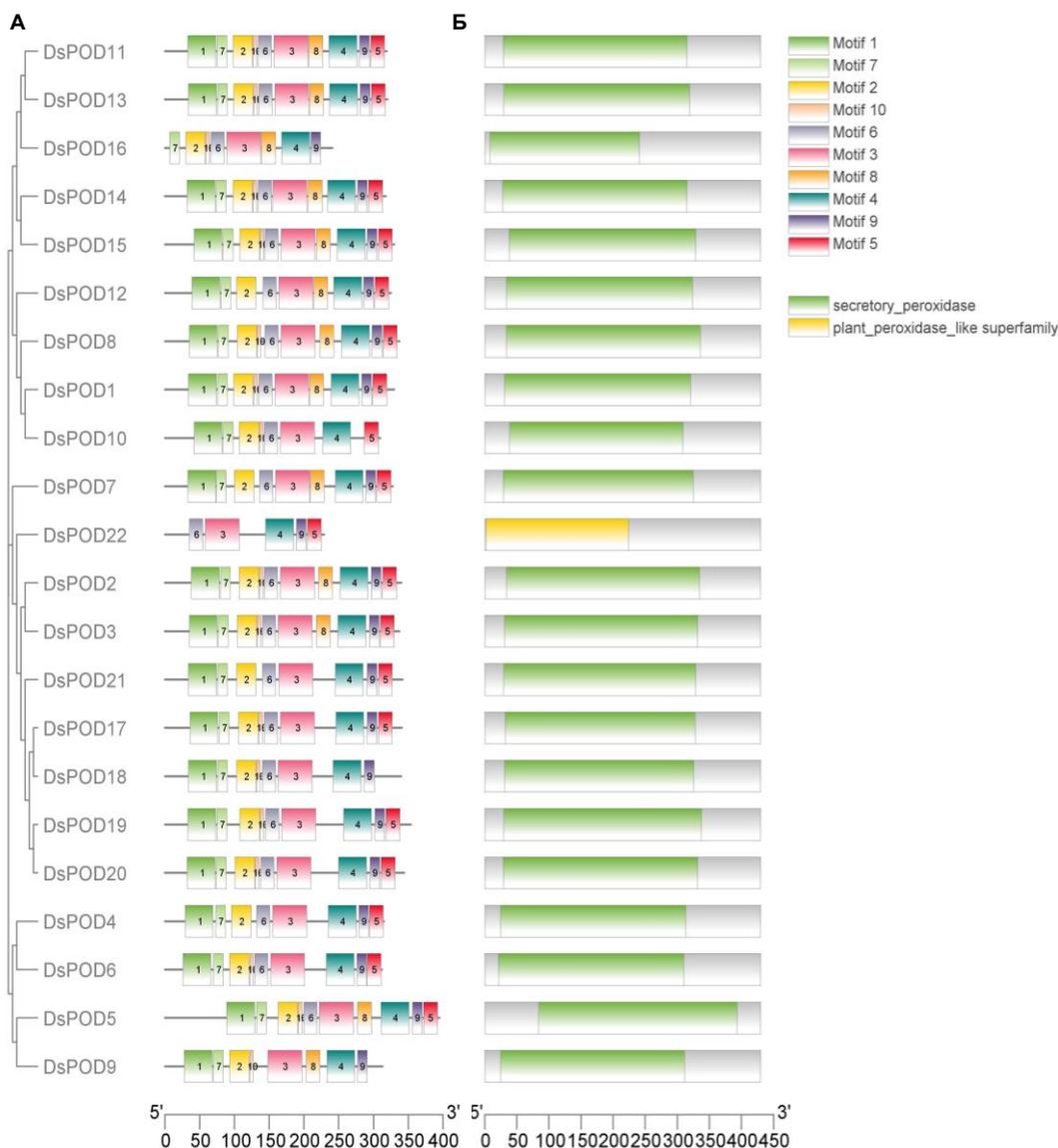


Рис. 24. Анализ консервативных мотивов и домена пероксидаз класс III. **А** – распределение 10 предполагаемых консервативных мотивов в белках DsPOD. Консервативные мотивы представлены прямоугольниками разного цвета, пронумерованными от 1 до 10. **Б** – присутствие домена пероксидаз в DsPOD. Зеленый прямоугольник обозначает секреторную пероксидазу, желтый прямоугольник – надсемейство растительной пероксидазы.

Для дальнейшего анализа белков пероксидаз дикранума нами было выбрано восемь белков DsPOD с самой высокой гомологией пероксидазам III класса *P. nutans* и *P. patens*. В результате поиска возможных посттрансляционных модификаций с помощью веб-сервера GPS 3 (Wang et al., 2012) были предсказаны сайты фосфорилирования серина, треонина и тирозина в выбранных белках DsPOD (рис. 25А). Известно, что фосфорилирование может изменять свойства ферментов, кроме того, оно необходимо для белок-белковых взаимодействий (Jovanović et al., 2018).

Сайты N-гликозилирования аспарагина обнаружены в DsPOD1, DsPOD2, DsPOD3 и DsPOD8, например, 2 предполагаемых сайта N-гликозилирования (96-NFSL и 152-NVSD) были

обнаружены в DsPOD1, 3 сайта (90-NSTA, 163-NYSG, 218-NQSG) в DsPOD2, 4 сайта (87-NSTA, 160-NYSG, 215-NQSG, 246-NSTL) в DsPOD3 и 1 сайт (101-NLTV) в DsPOD8 (рис. 25Б).

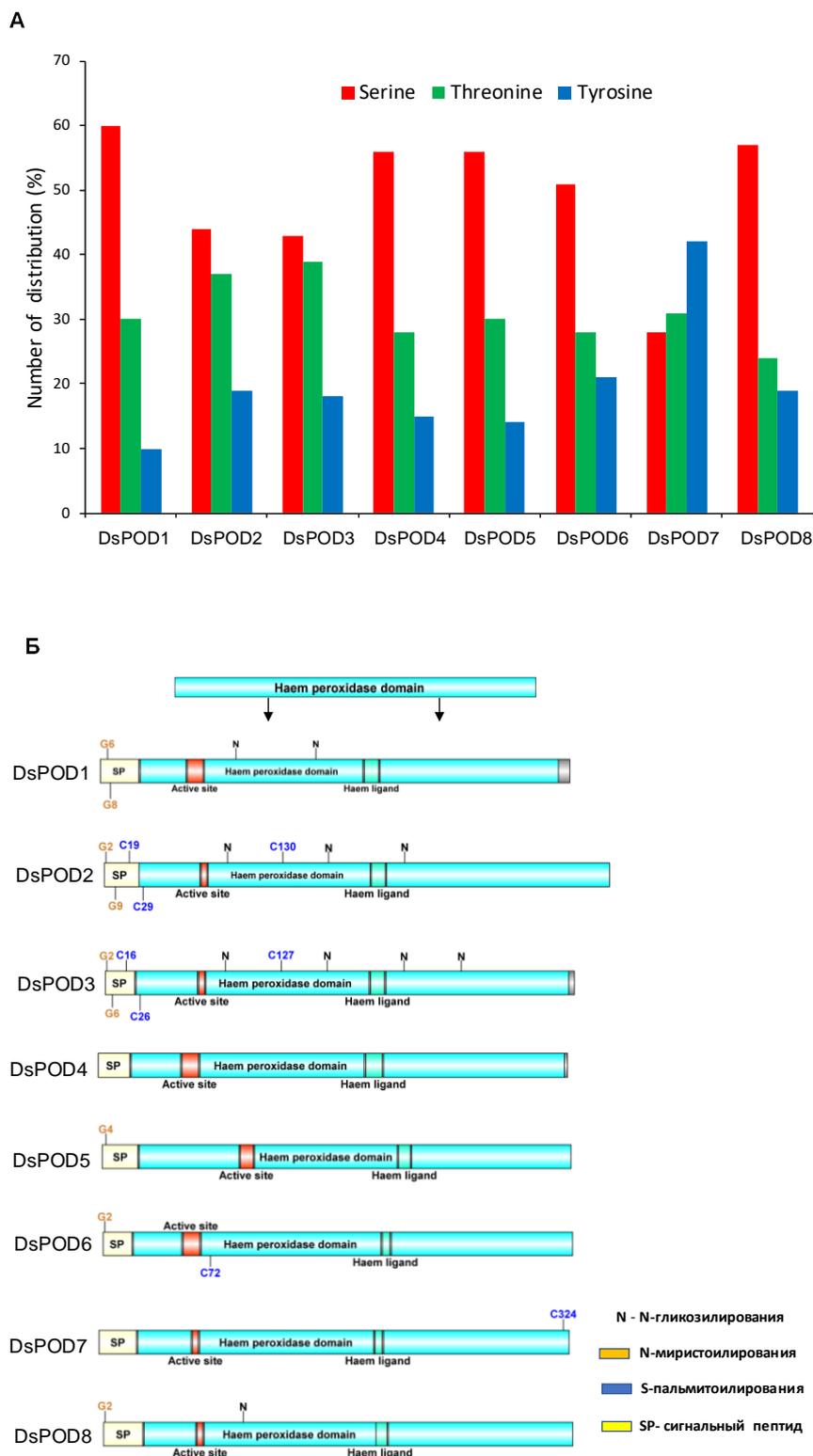


Рис. 25. Анализ модификаций DsPOD с важными сайтами, отвечающими за функции POD. **А** – количество сайтов фосфорилирования. **Б** – схематическое строение белков DsPOD, показывающее возможное расположение сигнального пептида (SP), активного центра, гем-лиганда, сайтов *N-N*-гликозилирования, *S*-пальмитоилирования и *N*-миристоилирования.

Гликозилирование пероксидаз III класса, по-видимому, необходимо для укладки, стабильности и каталитической активности ферментов (Newman et al., 1994). Белки, ацилированные жирными кислотами, – это белки, которые подверглись посттрансляционным модификациям и стали ковалентно связанными с жирными кислотами по некоторым аминокислотным остаткам (Resh, 2006; Wilson et al., 2011). К числу жирных кислот, наиболее часто связанных с белками, относят насыщенную 14-углеродную миристиновую кислоту и 16-углеродную пальмитиновую кислоту. Белки могут быть связаны как с одной из этих жирных кислот, так и с двумя (Resh, 2006). С помощью программы GPS-Lipid 1.0 (Xie et al., 2016), нам удалось проанализировать возможные сайты липидной модификации белков DsPOD, например, *N*-миристоилирования и *S*-пальмитоилирования. *N*-Миристоилирование происходит во время синтеза белка и представляет собой модификацию липидирования, при которой миристоильная группа, полученная из миристиновой кислоты, ковалентно присоединяется амидной связью к  $\alpha$ -аминогруппе *N*-концевого остатка глицина посредством пептидной связи. *N*-Миристоилирование – это, как правило, необратимая модификация белков, участвующих в контроле окислительно-восстановительного баланса, возникающая в результате различных стрессов у растений (Resh, 2006; Traverso et al., 2008). Модифицированные белки оказываются заякоренными липидами в мембрану, где они принимают участие в путях передачи сигнала (Traverso et al., 2008). Нами выявлено, что все выбранные белки DsPOD содержат сайты *N*-миристоилирования, кроме DsPOD4 и DsPOD7 (рис. 25Б). *S*-Пальмитоилирование – обратимая

Таблица 5. Соотношение  $\alpha$ -спиральных участков, участков удлиненной цепи,  $\beta$ -поворот и неструктурированных петель во вторичной структуре белка

Изоформы пероксидаз	$\alpha$ -спираль (%)	удлиненная цепь (%)	$\beta$ -поворот (%)	неструктурированные петли (%)
DsPOD1	38.18	15.76	6.97	39.09
DsPOD2	39.12	14.41	8.53	37.94
DsPOD3	38.28	14.84	6.82	40.06
DsPOD4	41.90	13.97	6.67	37.46
DsPOD5	34.43	13.67	6.08	45.82
DsPOD6	35.90	15.06	7.37	41.67
DsPOD7	43.90	12.50	4.88	38.72
DsPOD8	39.76	15.13	5.64	39.47

липидная модификация белков, при которой пальмитиновая кислота присоединяется к специфическому остатку цистеина посредством тиоэфирной связи (Resh, 2006). В результате

анализа с помощью GPS-Lipid 1.0 также были обнаружены сайты *S*-пальмитоилирования у DsPOD2, DsPOD3, DsPOD6 и DsPOD7 (рис. 25Б). Известно, что *S*-пальмитоилирование

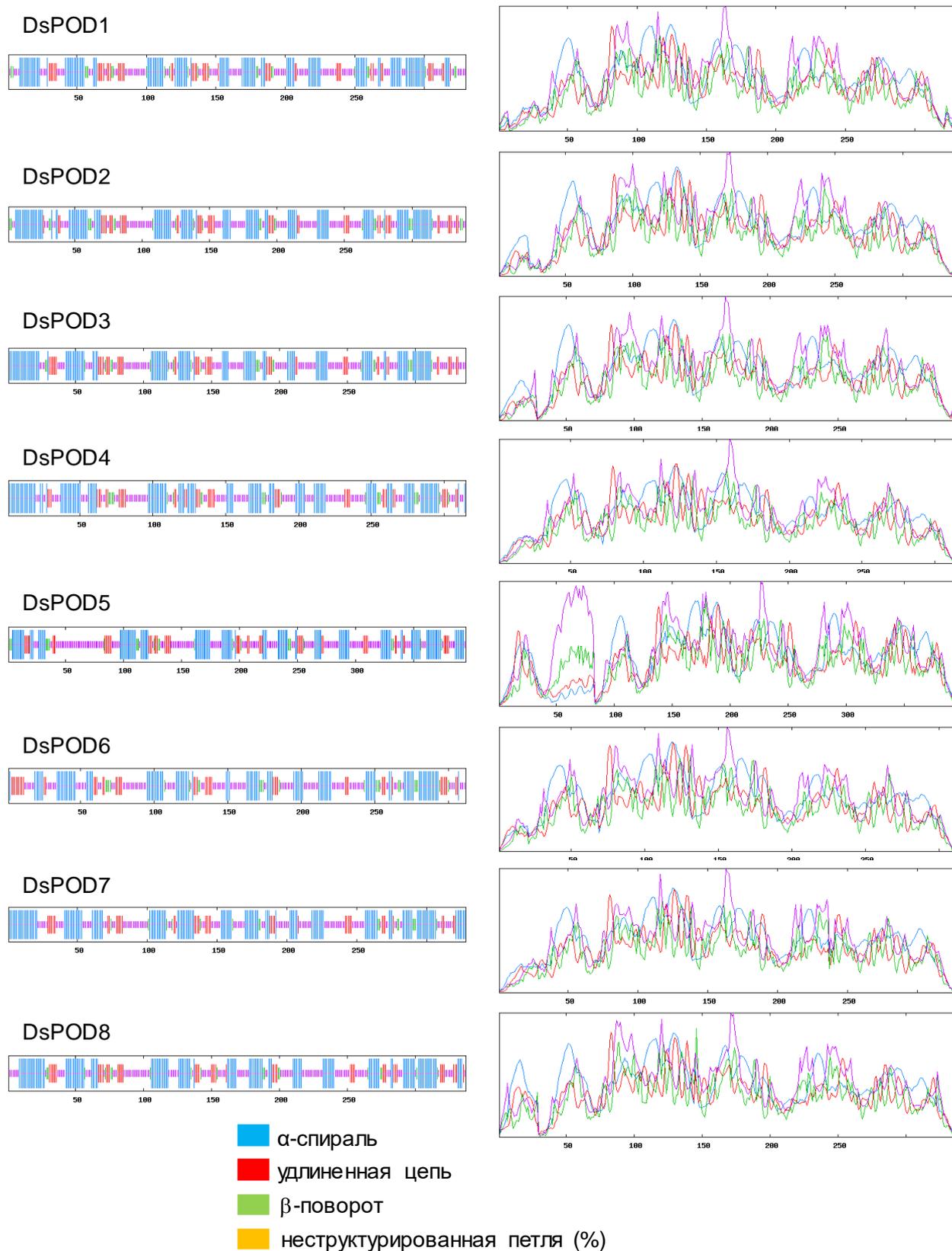


Рис. 26. Вторичные структуры белков DsPOD с различными структурными участками.

участвует в регуляции функций белков (Zhang, Hang, 2017) и модуляции сигнальных каскадов фосфорилирования растений (Hemsley et al., 2013; Srivastava et al., 2016). Кроме того, обратимое *S*-пальмитоилирование может использоваться для регуляции внутриклеточной локализации белка, стабильности и кругооборота (Aicart-Ramos et al., 2011). Важно отметить, что вышеперечисленные модификации являются результатом компьютерного предсказания, в будущем необходимо подтверждение экспериментальными данными.

Для изучения структуры выбранных белков нами был проведен компьютерный анализ вторичной и третичной структуры белков DsPOD. В результате обнаружено, что процент участков с  $\alpha$ -спиральной структурой в белке составлял 34,43-43,90%, с удлинённой цепью 12,50-15,76%, – с  $\beta$ -поворотом – 4,88-7,37% и неструктурированными петлями – 37,46-45,82% (табл. 5). Показано, что белки пероксидаз дикранума состоят, в основном, из  $\alpha$ -спиралей и неструктурированных петель (рис. 26). По данным литературы,  $\alpha$ -спирали играют ключевую роль в термостабильности белка на основе их внутренней стабильности (Sarkar et al., 2019). Предполагается, что неструктурированные петли участвуют в гибкости белка и конформационных изменениях (Chauhan et al., 2020).

Анализ третичной структуры белков DsPOD в сервере SWISS-MODEL показал, что 92–97% белковых остатков находились в разрешенной области карты Рамачандрана, что указывает на хорошее качество построенных моделей (рис. 27). Карты Рамачандрана используются для описания значений углов полипептидной цепи, как правило, они описывают конформацию целых молекул белка. Следует заметить, что карта Рамачандрана не определяет третичную структуру белка однозначно, поскольку не показывает порядок соединения аминокислот. Она лишь позволяет увидеть преобладающую конформацию аминокислот в белке. На практике карты Рамачандрана используются для демонстрации присутствия в белке тех или иных вторичных и сверхвторичных структур (структурных мотивов) (Цветков, 2017). Более того, нами были проанализированы различие и сходство в структуре в полученных моделях. Для этого структуры были наложены друг на друга для расчета процента структурного перекрытия и значений среднеквадратичного отклонения (табл. 6). В результате анализа обнаружено высокое структурное сходство (99,35% и 72,16%) в парах DsPOD2/DsPOD3 и DsPOD4/DsPOD6 со значениями среднеквадратичного отклонения (0,083 и 1,177), соответственно (рис. 27, табл. 6). Кроме того, согласно предсказанной субклеточной локализации, эти пары являются экстраклеточными пероксидазами с высокомолекулярной структурой, и не исключено, что данные изоформы могут нести одинаковые функции. Между некоторыми DsPOD наблюдались существенные вариации в сворачивании белков (рис. 27, табл. 6). Возможно, что эти различия влияют и на третичную структуру белка и могут вносить вклад в каталитическую активность

фермента. Наши дальнейшие результаты по анализу активности генов также подтвердили различную экспрессию данных пероксидаз (рис. 29).

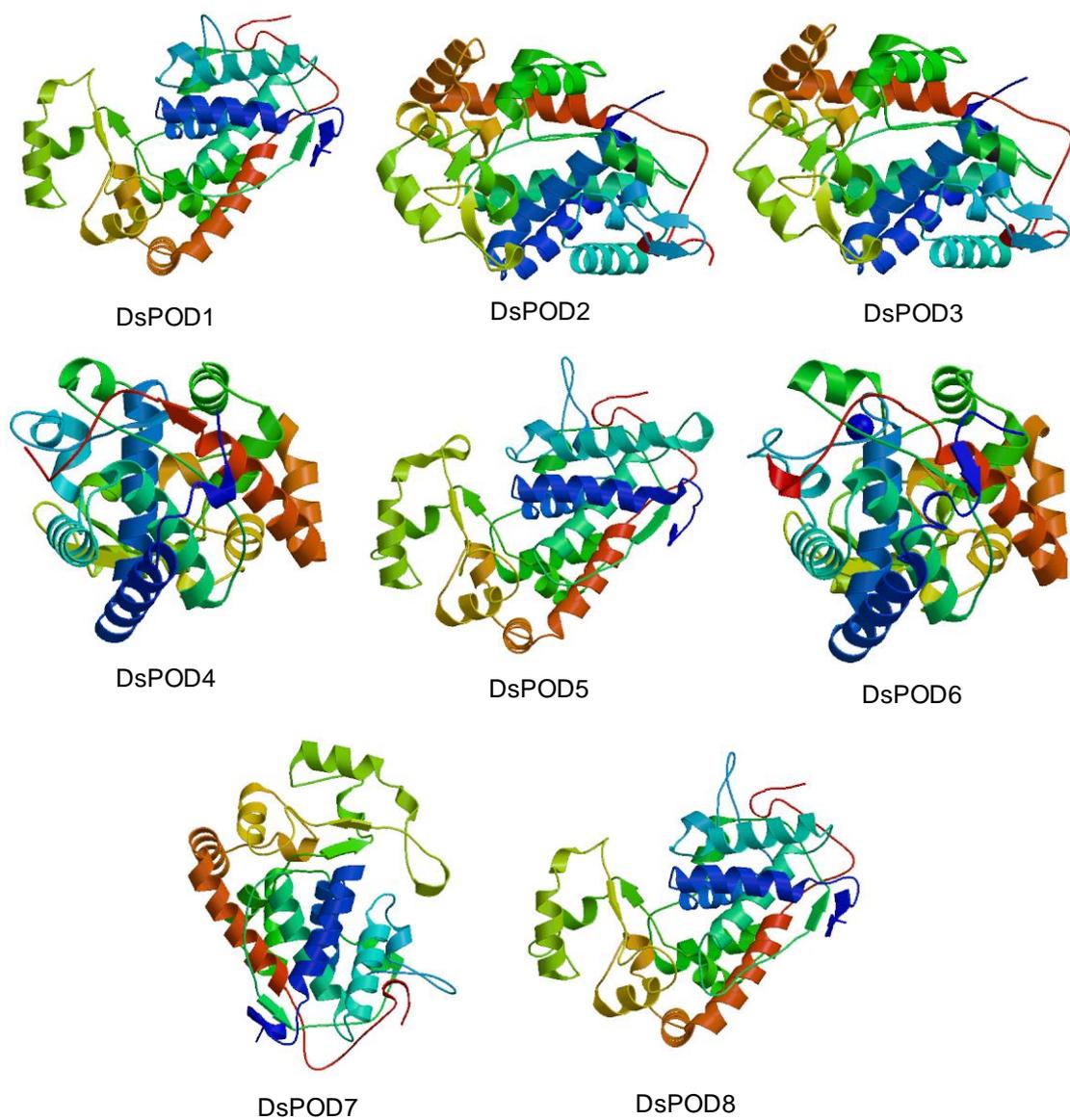


Рис. 27. Третичная структура белков DsPOD, полученных из сервера SWISS-MODEL, с указанием их структурного расположения.

Таблица 6. Значения структурного перекрытия (%) и среднеквадратичного отклонения при наложении белков DsPOD. Пары, в выделенных ячейках, показывают высоко консервативные структурные перекрытия.

	DsPOD1	DsPOD2	DsPOD3	DsPOD4	DsPOD5	DsPOD6	DsPOD7	DsPOD8
DsPOD1	-	47.44/0.977	47.44/0.977	30.24/1.000	34.13/0.591	28.67/1.153	36.86/0.351	48.12/0.170
DsPOD2	47.44/0.977	-	<b>99.35/0.083</b>	33.68/1.011	31.37/1.118	31.08/1.193	35.45/1.003	39.87/0.990
DsPOD3	47.44/0.977	<b>99.35/0.083</b>	-	33.68/1.012	31.37/1.118	31.08/1.194	35.45/1.003	40.20/0.989
DsPOD4	30.24/1.000	33.68/1.011	33.68/1.012	-	29.90/1.136	<b>72.16/1.177</b>	30.24/1.020	32.65/1.004
DsPOD5	34.13/0.591	31.37/1.118	31.37/1.118	29.90/ 1.136	-	29.73/1.217	27.76/0.651	34.85/0.590
DsPOD6	28.67/1.153	31.08/1.193	31.08/ 1.194	<b>72.16/1.177</b>	29.73/1.217	-	31.42/1.187	30.74/1.160
DsPOD7	36.86/0.351	35.45/1.003	35.45/1.003	30.24/1.020	27.76/0.651	31.42/1.187	-	35.12/0.362
DsPOD8	48.12/0.170	39.87/0.990	40.20/0.989	32.65/1.004	34.85/0.590	30.74/1.160	35.12/0.362	-

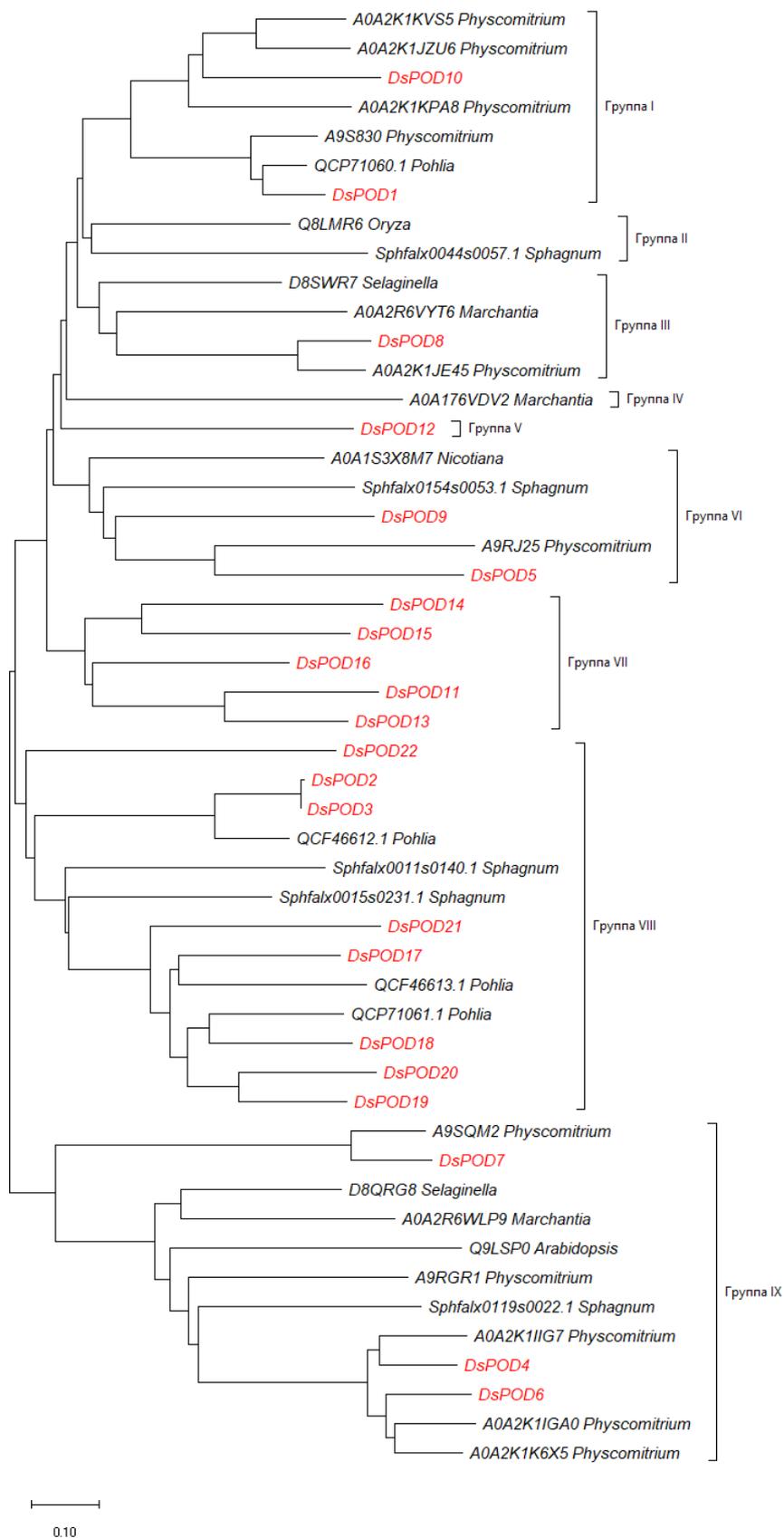


Рис. 28. Филогенетическое древо, показывающее взаимосвязь между аминокислотными последовательностями DsPOD и аминокислотными последовательностями пероксидаз III класса других видов растений. Масштабная линия представляет 10% расчетное расхождение последовательностей. Разные группы были отмечены разными цветами.

Для того, чтобы понять эволюционные взаимосвязи между пероксидазами III класса дикранума и других видов растений, нами было построено филогенетическое древо с использованием последовательностей белков DsPOD и различных гомологичных белковых последовательностей пероксидаз III класса из мохообразных, таких как мхи (*P. nutans*, *P. patens* и *S. fallax*), печеночник (*M. polymorpha*), ликофит (*Selaginella moellendorffii*) и покрытосеменные растения (*A. thaliana*, *Oryza sativa* и *Nicotiana tabacum*) (рис. 28). В результате установлено, что филогенетическое древо разделено на девять групп (I – IX), отмеченных линиями. Обнаружено, что белки DsPOD сгруппированы в разных ветвях, например, группы I, III, V, VI, VII, VIII и IX (рис. 28), несмотря на то, что большинство белков DsPOD присутствуют в экстраклеточном пространстве. Вероятно, разнообразие изоформ пероксидаз может быть результатом дупликаций в геноме далеких предков мхов. Дупликации в геномах растений, по данным литературы, могут быть либо мелкомасштабными (тандемными и сегментарными) дупликациями, либо крупномасштабными, которые включают дублирование всего генома (Ramsey, Schemske, 1998). Известно, что сегментарные дупликации чаще всего встречаются в разных хромосомах, тогда как тандемные дупликации наблюдаются в одной и той же хромосоме (Liu et al., 2011). Обнаружено, что DsPOD2/DsPOD3 сгруппированы попарно в группе VIII, а DsPOD4/DsPOD6 располагаются в двух соседних кладах в одной группе IX (рис. 28), что согласуется с результатами анализа третичной структуры. Следовательно, можно предположить, что эти пары имеют высокое сходство на уровне белка.

Расположение различных изоферментов пероксидаз одного вида растения в разных группах и одновременное расположение в этих же группах изоферментов других видов растений других классов и даже отделов может свидетельствовать о том, что дивергентность изопероксидаз возникла до разделения растений на две эволюционных ветви: сосудистые и несосудистые высшие растения (рис. 28).

### **3.2.7. Экспрессия генов *DsPOD* при действии абиотических стрессоров: CdCl<sub>2</sub>, параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации**

Повышение активности пероксидазы во мхе *D. scoparium* в условиях водного и температурного стрессов может быть обусловлено как регуляцией активности белков, так и регуляцией активности генов (рис. 13, 14, глава 3.2.1.). Анализ экспрессии генов *DsPOD1–DsPOD8* показал, что четыре гена из восьми (*DsPOD1*, *DsPOD2*, *DsPOD6* и *DsPOD8*) активировались в различной степени при воздействии хлорида кадмия (CdCl<sub>2</sub>), параквата, отрицательных и положительных температур, при обезвоживании/регидратации, что предполагает функциональное разнообразие этих генов. При действии CdCl<sub>2</sub>, параквата, неблагоприятных температур и обезвоживания/регидратации не происходило существенных изменений в экспрессии других четырех изоформ (*DsPOD3–DsPOD5*, *DsPOD7*) (данные не

представлены). Вероятно, эти гены экспрессируются на определенных стадиях развития мха или индуцируются стрессорами, отличными от тех, которые использовались в этом исследовании. Установлено, что воздействие  $\text{CdCl}_2$  в течение 1ч значительно усиливало экспрессию всех четырех генов *DsPOD1*, *DsPOD2*, *DsPOD6*, и *DsPOD8*, более длительное (12 ч) выдерживание в  $\text{CdCl}_2$  приводило к снижению экспрессии этих генов до уровня контроля (*DsPOD6*), или ниже (*DsPOD1*, *DsPOD8*), за исключением *DsPOD2*, который остался активированным после 12 ч обработки хлоридом кадмия (рис. 29А). Действие прооксиданта парааквата подавляло экспрессию генов в обоих исследуемых промежутках времени, за исключением *DsPOD2*, экспрессия которого усиливалась через 12 ч (рис. 29А). Показано, что воздействие низкой отрицательной температуры ( $-20^\circ\text{C}$ ) на побеги мхов значительно усиливало экспрессию *DsPOD1*, *DsPOD2* и *DsPOD6* через 1 ч (рис. 29Б), а через 12 ч экспрессия *DsPOD2* снижалась, но у *DsPOD6* экспрессия оставалась повышенной. Наблюдалось также небольшое, но значимое увеличение экспрессии *DsPOD8* через 12 ч воздействия минусовых температур (рис. 29Б). Воздействие умеренных положительных температур  $+30^\circ\text{C}$  на мхи либо не влияло, либо снижало экспрессию всех генов пероксидазы, за исключением *DsPOD6*. Обнаружено, что кратковременное и длительное воздействие температур в  $+30^\circ\text{C}$  на мхи приводило к усилению экспрессии *DsPOD6* (рис. 29Б). При гидратации, обезвоживании и регидратации экспрессия генов *DsPOD* заметно варьировала (рис. 29В). Экспрессия *DsPOD1* снижалась в условиях водного стресса. Обнаружено, что ген *DsPOD2* активизировался при обезвоживании, причем максимальная экспрессия наблюдалась через 24 ч обезвоживания, а через 72 ч его экспрессия снижалась и оставалась низкой при регидратации. Небольшое увеличение в экспрессии *DsPOD6* наблюдалось при обезвоживании и ранней (0,5 ч) регидратации, а затем экспрессия снижалась при дальнейшей регидратации (2 ч). После 1 ч гидратации экспрессия *DsPOD8* значительно усиливалась, оставалась повышенной в течение первого часа обезвоживания, затем снижалась через 24 и 72 ч обезвоживания, но поднималась до уровня контроля при последующей гидратации (рис. 29В). В целом, обнаружено, что изменения экспрессии были более значительными при обезвоживании, чем при регидратации после обезвоживания (рис. 29В).

На основании результатов анализа экспрессии генов *DsPOD*, можно предположить, что *DsPOD1*, *DsPOD2* и *DsPOD8* вовлечены в ранние ответы на воздействие стрессоров, а *DsPOD6* участвует как в краткосрочных, так и долгосрочных ответах мха на воздействие всех агентов, индуцирующих окислительный стресс. В литературе имеется информация об изменении экспрессии генов пероксидаз III класса растений в ответ на действие различных стрессоров: *Manihot esculenta* (Wu et al., 2019), *Brachypodium distachyon* (Zhu et al., 2019), *Vitis vinifera L* (Xiao et al., 2020) и *Zea mays* (Wang et al., 2015). Результаты наших исследований показали, что экспрессия генов пероксидазы III класса дикранума усиливается при действии множества

абиотических стрессоров, что может свидетельствовать об участии пероксидазы III класса в защите от окислительных стресс-индуцированных повреждений как на ферментативном, так и на генетическом уровне.

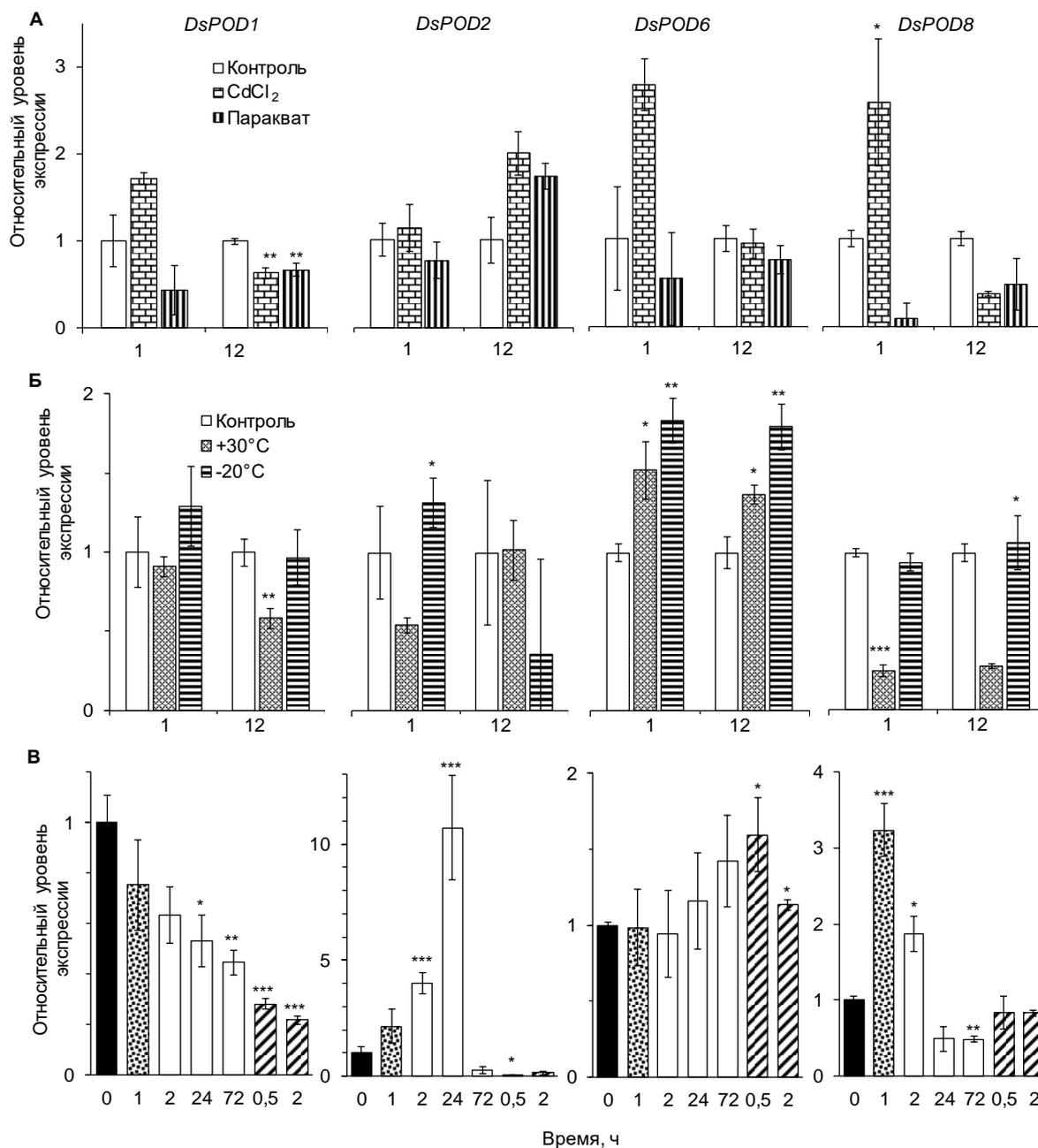


Рис. 29. Относительный уровень экспрессии генов *DsPOD* при выдерживании побегов *D. scorarium* в А – CdCl<sub>2</sub> (100 мкМ) и параквате (100 мкМ) в течение 2 и 12 ч. Б – воздействие неблагоприятных температур (-20° С) и (+30° С) в течение 2 и 12 ч. В – обезвоживание/регидратация. Черные столбики – сухой мох (контрольный вариант), столбики с точками - 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание над силикагелем (1 г мха/10 г силикагель), заштрихованные столбики – регидратация.

### 3.3. Аскорбатпероксидаза мха дикранума метловидного: идентификация гена, активность фермента

В клетках высших сосудистых растений одним из основных механизмов детоксикации  $H_2O_2$  является ASC-GSH цикл, в котором ферменты APX играют ключевую роль, катализируя превращение  $H_2O_2$  в  $H_2O$  с использованием ASC в качестве специфического донора электронов (Shigeoka et al., 2002; Caverzan et al., 2012; Sofo et al., 2015). Показано, что мхи *Brachythecium velutinum*, *Brachythecium piligerum*, *P. patens*, *Hypnum plumaeforme*, *F. antipyretica*, *Octoblepharum albidum* и печеночники *M. polymorpha* и *Pallavicinia lyellii* содержат APX, и ее активность, как и у сосудистых растений, увеличивается при абиотическом стрессе (Seel et al., 1992a,b; Paciolla, Tommasi, 2003; Dazy et al., 2009; Pitsch et al., 2010; Sajitha Rajan, Murugan, 2010; Sun et al., 2010a,b; Lubaina et al., 2013). В настоящее время гены, кодирующие APX, идентифицированы лишь у единичных видов бриофитов, а сведения об изменениях их экспрессии при абиотическом стрессе крайне недостаточны и фрагментарны. Можно предположить, что в *D. scoparium*, наряду с пероксидазой III класса, APX также принимает участие в ответах на абиотические воздействия. С целью проверки данного предположения в данной работе были охарактеризованы изоформы и гены APX и изучена роль APX в устойчивости *D. scoparium* при действии стрессоров.

#### 3.3.1. Влияние обезвоживания/регидратации на активность аскорбатпероксидазы

Наиболее универсальным антиоксидантным ферментом в цикле Холливел-Асада является APX, которая эффективно участвует в детоксикации  $H_2O_2$  в ходе окислительного стресса у растений (Kavitha, Murugan, 2017). Аскорбатпероксидаза удаляет АФК путем превращения ASC в дегидроаскорбат (Sharma et al., 2012).

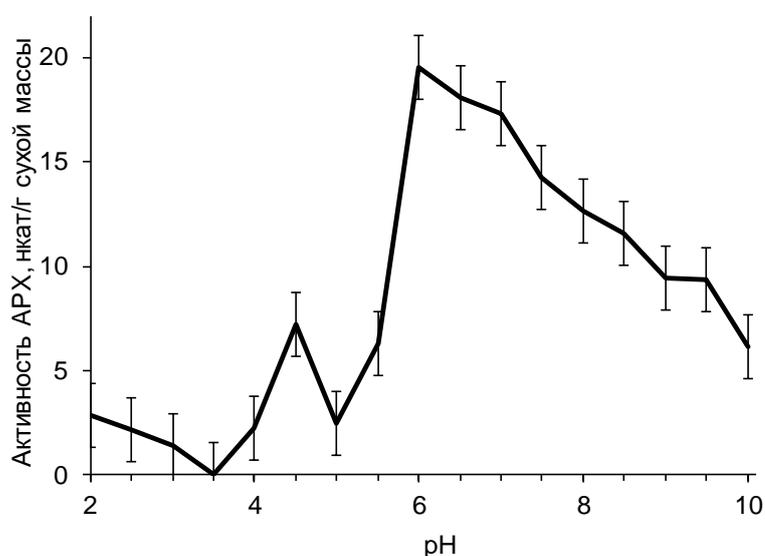


Рис. 30. Зависимость активности APX от pH.

Было показано, что АРХ дикранума имеет более высокое сродство к АСC ( $K_m$  9,5 мкМ), чем АРХ других фотосинтезирующих организмов. Например,  $K_m$  неочищенного экстракта из *Crocus sativus* составляет 150 мкМ (Ghamsari, Keyhani, 2004), тогда как  $K_m$  очищенных АРХ из различных видов растений составляет от 220–480 мкМ (Shigeoka et al., 1980; Mittler, Zilinskas, 1991; Ishikawa et al., 1996b; Takeda et al., 1998). Оптимальный рН для активности АРХ дикранума составляет 6-7 (рис. 30), что типично для большинства АРХ сосудистых и несосудистых растений (Chen, Asada, 1989; Ishikawa et al., 1996b; Sajitha Rajan, Murugan, 2010).

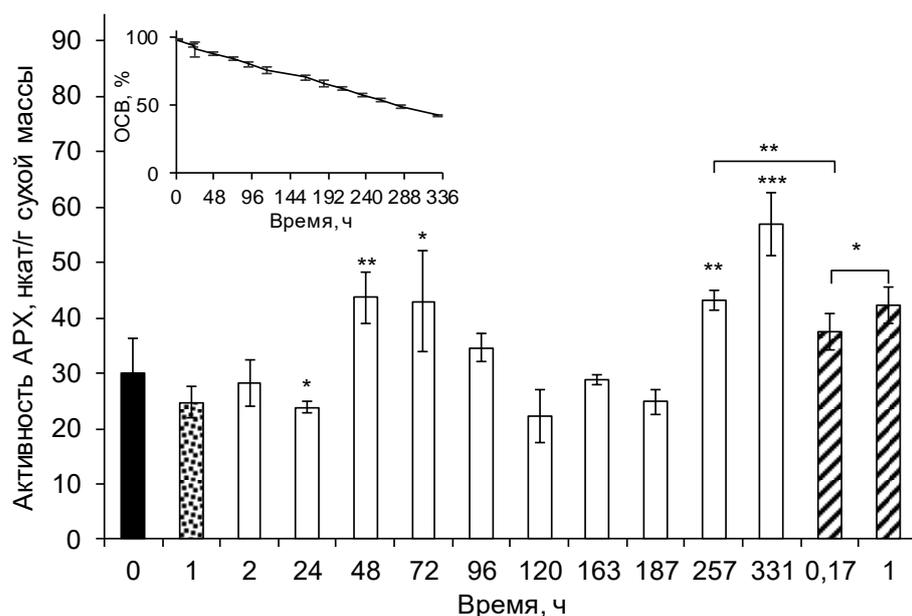


Рис. 31. Активность АРХ и ОСВ (врезка) в побегах мха *D. scoparium* при обезвоживании над парами 35% CaCl<sub>2</sub> и регидратации. Черный столбик – сухой мох (контрольный вариант), столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация.

По данным литературы, увеличение активности антиоксидантных ферментов является важным компонентом устойчивости к обезвоживанию (Proctor et al., 2007; Gao et al., 2017; Pizarro et al., 2019). Для подтверждения нашего предположения о вовлечении АРХ в стрессовые реакции были проведены эксперименты по анализу активности АРХ при обезвоживании *D. scoparium* над раствором 35% CaCl<sub>2</sub> и над силикагелем (рис. 31, 32). Результаты экспериментов показали, что активность АРХ стабильно увеличивалась при обезвоживании (рис. 31, 32). При выдерживании мха *D. scoparium* в эксикаторе над насыщенными парами CaCl<sub>2</sub> и силикагелем в побегах происходила значительная потеря воды (рис. 31, 32 – врезки) и ко вторым суткам медленного обезвоживания наблюдалось увеличение активности АРХ (рис. 31). Наибольшая активность АРХ

наблюдалась через две недели обезвоживания над  $\text{CaCl}_2$  (рис. 31), когда ОСВ достигало 40% (рис. 31 – врезка). Показано, что регидратация побегов мха после медленного обезвоживания сначала приводила к снижению АРХ активности, а затем – к ее восстановлению (рис. 31 – заштрихованные столбики).

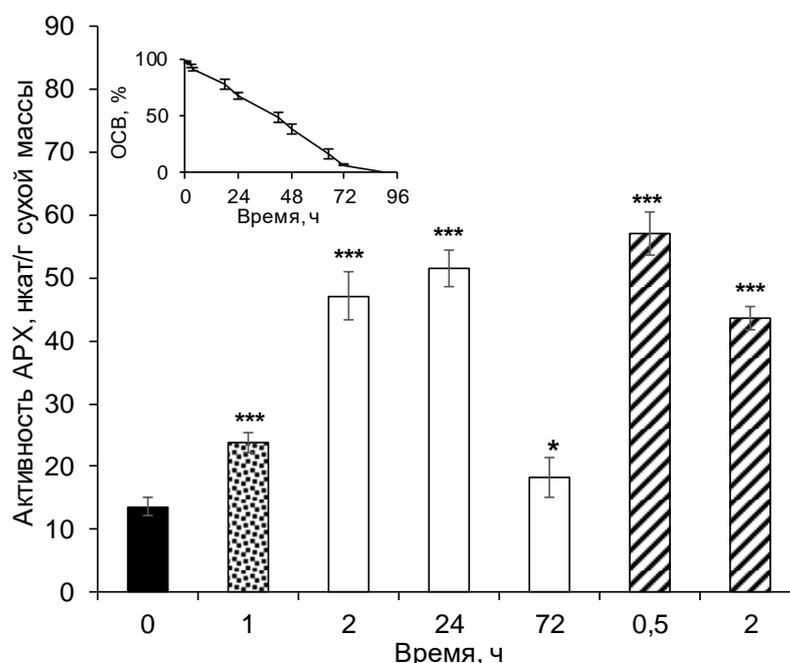


Рис. 32. Активность АРХ и ОСВ (врезка) в побегах мха *D. scoparium* при обезвоживании над силикагелем. Черный столбик – сухой мох (контрольный вариант), столбик с точками – 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание, заштрихованные столбики – регидратация.

Быстрое обезвоживание над силикагелем в течение 24 ч (ОСВ в 67%) значительно увеличивало активность АРХ (рис. 32); а через 72 ч, когда ОСВ достигало приблизительно 6%, активность АРХ снижалась, но все-таки оставалась выше контрольного варианта (рис. 32). Последующая гидратация побегов мха в течение 0,5 ч приводила к увеличению активности АРХ, а через 2 ч регидратации происходило незначительное снижение активности (рис. 32, заштрихованные столбцы). Таким образом, результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что АРХ вовлечена в стрессовые ответы при обезвоживании/регидратации *D. scoparium*. Кроме того, нами выявлено, что содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  при обезвоживании и последующей регидратации коррелировало с уровнем активности АРХ с коэффициентом корреляции 0,7 (рис. 10 и 32).

Некоторые исследования показали, что обезвоживание увеличивает активность АРХ во мхах. Например, у *Octoblepharum albidum*, активность АРХ также увеличивалась при обезвоживании над силикагелем в течение 24-72 ч (Lubaina et al., 2013), у *Dicranella palustris* при

обезвоживании при слабом освещении в течение 72 ч наблюдалось повышение активность АРХ (Seel et al., 1992b). Было показано, что в семенах *Mimulus elengi* при обезвоживании активность АРХ сначала возрастает до максимального уровня, а затем снижается наряду с другими антиоксидантными ферментами (Anjun, 2012). Известно, что в стрессовых условиях обезвоживания количество восстановленного АСВ, доступного для АРХ, увеличивается, а активность АРХ напрямую зависит от концентрации восстановленного АСВ (Shigeoka et al., 2002). Кроме того, повышенная активность фермента также может быть связана с накоплением  $H_2O_2$  с учетом способности АРХ эффективно удалять  $H_2O_2$ .

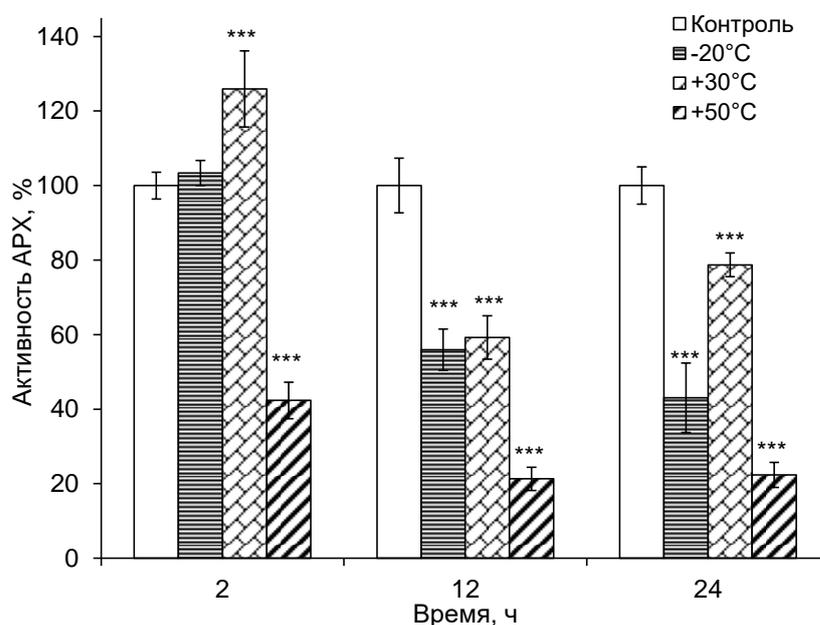


Рис. 33. Активность АРХ выдержанного при  $-20^{\circ}C$ ,  $+30^{\circ}C$  и  $+50^{\circ}C$  в течение 2, 12 и 24 ч. В качестве контроля использовали гидратированные побеги, которые хранили при комнатной температуре.

### 3.3.2. Влияние неблагоприятных температур на активность аскорбатпероксидазы в *D. scorarium*

Неблагоприятная температура является одним из распространенных стрессовых факторов, действию которых подвергается растение в природе. (Karimzadeh et al., 2006; Jiang et al., 2011; Hasanuzzaman et al., 2013; Hussain et al., 2018). Одним из последствий как теплового, так и низкотемпературного стресса сосудистых растений является повреждение мембраны, при котором происходит утечка растворенных веществ из клетки, что коррелирует со степенью повреждения (Zou, 1988; Earnshaw et al., 1990; Marcum, 1998).

В сосудистых растениях показано, что при температурном стрессе происходит повышенное образование АФК и стимуляция активности антиоксидантных ферментов (Guo et al., 2006; Rani et al., 2009; Cansev et al., 2011; Chakraborty, Pradhan, 2011; Kaushal et al., 2016). Информация о действии неблагоприятных температур на АРХ бриофитов весьма ограничена. Результаты наших исследований показали, что активность АРХ в *D. scoparium* увеличивалась только после кратковременного воздействия температуры +30° С (рис. 33), в то время как более длительное воздействие (12 и 24 ч) как низких отрицательных, так и повышенных температур снижало активность АРХ (рис. 33). Самая низкая активность АРХ наблюдалась во мхах, выдержанных при +50° С. Первоначальное повышение активности АРХ во мхе, выдержанного при +30° С, может быть обусловлено усилением активности фермента, нейтрализующего АФК, в то время как ингибирование после более длительных или более жестких температурных воздействий, вероятно, является отражением общего повреждения структуры белка, вызванного температурой.

### 3.3.3. Электрофоретическое разделение аскорбатпероксидаз *D. scoparium*

Высшие сосудистые растения обладают множеством изоформ АРХ, которые отличаются друг от друга молекулярной массой, оптимумом рН, стабильностью, специфичностью к субстрату, локализацией и степенью их активности к действию специфических стрессоров (Caverzan et al., 2012).

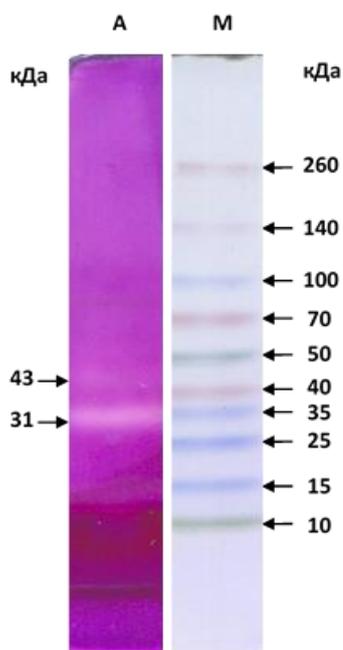


Рис. 34. Электрофоретическое разделение АРХ *D. scoparium*. А – полу-нативный градиентный (SDS) электрофорез (3-12%), гели окрашивали раствором 50 мМ Na-фосфатного буфера рН 7,8 с 28 мМ ТЕМЕД, 2,4 мМ NBT, М – маркеры.

Известно, что цитозольный изофермент APX представляет собой димер, который состоит из идентичных субъединиц с молекулярной массой 28 кДа, хлоропластные изоформы существуют в мономерной форме (Mittler, Zilinskas 1991; Miyake et al., 1993). Пластидная APX с молекулярной массой 34 кДа была очищена из пластид табака (Madhusudhan et al., 2003), а непластидные изоформы APX с молекулярной массой 28–31 кДа были выделены из тыквы (Yamaguchi et al., 1995) и хлопка (Bunkelmann, Trelease, 1996). Хлоропласты имеют две изоформы APX: тилакоид-связанные (молекулярная масса 37,5 кДа) и стромальные (молекулярная масса 33,2 кДа) (Chen, Asada 1989; Ishikawa et al., 1996a). Эти изоформы варьируют в зависимости от вида растений.

В результате проведения полу-нативного градиентного гельэлектрофореза в *D. scoparium* были обнаружены две изоформы APX: мажорная с молекулярной массой 31 кДа и минорная с молекулярной массой 43 кДа (рис. 34). Возможно, что мажорная цитозольная изоформа APX является основной изоформой, а минорный изофермент может быть пластидным.

Для определения локализации и функции каждой изоформы APX *D. scoparium* требуется дальнейшая работа. Не исключено, что все изоформы APX *D. scoparium*, как и изоформы фермента в сосудистых растениях принимают участие в детоксикации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках.

### **3.3.4. Идентификация гена и характеристика белка аскорбатпероксидазы *D. scoparium***

Геномы сосудистых растений содержат гены, которые кодируют множество изоформ APX, функционирующих в различных субклеточных компартментах (Mittler et al., 2004). Информация о генах APX у мохообразных очень ограничена. Используя последовательность APX из *G. pilifera* (*GpAPX*: номер доступа в GenBank GU989311) (Song et al., 2012), близкого родственника *D. scoparium*, мы идентифицировали и секвенировали кодирующую последовательность (CDS) APX из мха дикранума, обозначив его как *DsAPX* (рис. 35). С помощью Blast в базе данных NCBI было обнаружено, что нуклеотидная последовательности *DsAPX* имеет высокую гомологию (90,79%) с нуклеотидной последовательности *GpAPX*, а расхождение *DsAPX* и *GpAPX* составляло всего 9,9% (рис. 36). Идентичность нуклеотидных последовательностей *DsAPX* с другими растениями составляла 64,4–79,9% (рис. 36).

В результате биоинформатического анализа с помощью сервера CELLO, предсказывающего субклеточную локализацию, было определено, что ген *DsAPX* кодирует цитозольную APX, что согласуется с данными по высокой гомологии *DsAPX* с цитозольными APX других видов мхов и сосудистых растений. Биоинформатический анализ первичной структуры белка показал, что *DsAPX* содержит 256 аминокислот, имеет молекулярную массу – 28,35 кДа и *pI* – 5,71. В аминокислотной последовательности *DsAPX* нами было обнаружено несколько высококонсервативных элементов, например, сайты связывания гема, сайты связывания субстрата и сайты связывания K<sup>+</sup>, необходимые для ферментативной

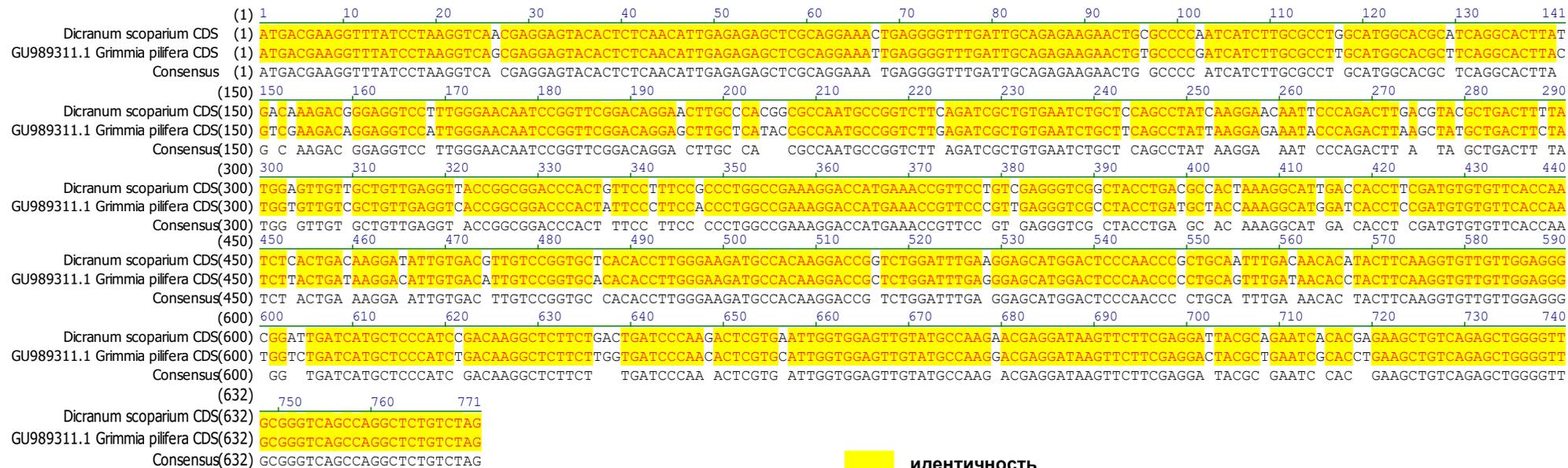


Рис. 35. Выравнивание клонированных нуклеотидных последовательностей *DsAPX* и *APX G. pilifera* с помощью Vector NTI.

		Percent Identity																						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Divergence	1	█	76.5	95.9	77.0	76.6	77.2	97.2	96.0	77.2	77.3	77.2	78.1	77.0	76.4	77.6	77.0	68.4	68.7	68.7	67.9	67.3	1	EF528482.1 Malus x domestica.seq
	2	28.4	█	76.5	77.0	99.6	93.0	76.0	76.6	75.4	75.6	74.1	77.4	75.7	75.4	75.3	75.8	67.9	68.3	68.3	66.8	66.7	2	EU969033.1 Zea mays clone 325682.seq
	3	4.2	28.4	█	76.6	76.6	78.0	94.2	99.6	75.8	75.8	75.4	77.0	75.8	76.0	77.7	76.0	67.9	67.9	67.9	67.7	68.3	3	JX104653.1 Pyrus pyrifolia.seq
	4	27.6	27.7	28.2	█	77.2	79.5	76.1	76.8	77.3	77.7	76.8	80.1	77.3	76.4	75.7	78.6	68.0	68.1	68.1	69.2	67.1	4	MF782866.1 Carex duriuscula subsp. rige
	5	28.2	0.4	28.2	27.5	█	93.0	76.1	76.8	75.7	75.8	74.4	77.6	76.0	75.6	75.6	76.0	68.0	68.4	68.4	66.8	66.7	5	NM_001112030.2 Zea mays.seq
	6	27.4	7.4	26.2	24.0	7.4	█	76.9	78.1	75.6	75.7	74.0	78.8	75.6	75.3	75.0	77.4	67.9	68.0	68.0	67.5	67.1	6	XM_004958747.2 Setaria italica.seq
	7	2.9	29.3	6.1	29.1	29.1	27.8	█	94.3	76.9	77.0	76.6	77.7	76.8	77.2	78.4	77.6	68.0	68.3	68.3	67.2	66.5	7	XM_009354139.1 Pyrus x bretschneideri.s
	8	4.1	28.2	0.4	28.0	28.0	26.0	6.0	█	75.7	76.0	75.6	77.2	75.7	76.0	77.8	76.1	68.1	68.1	68.1	68.0	68.4	8	XM_009359993.2 Pyrus x bretschneideri.s
	9	27.7	30.2	29.7	27.3	29.8	30.1	28.1	29.9	█	97.7	79.8	81.7	99.7	78.4	77.8	79.9	66.5	66.5	66.5	66.8	65.6	9	XM_009599196.2 Nicotiana tomentosiformi
	10	27.5	30.0	29.7	26.7	29.6	29.8	27.9	29.5	2.3	█	79.8	82.3	98.0	78.6	78.2	80.3	66.4	66.3	66.3	67.5	66.1	10	XM_009786123.1 Nicotiana sylvestris.seq
	11	27.6	32.1	30.1	28.3	31.7	32.3	28.4	29.9	23.8	23.8	█	84.6	79.7	75.8	75.4	75.7	65.3	65.6	65.6	65.1	64.7	11	XM_012972496.1 Erythranthe guttatus .se
	12	26.0	27.0	27.6	23.3	26.8	25.1	26.7	27.4	21.2	20.3	17.3	█	81.9	77.0	76.8	79.2	66.5	67.1	67.1	67.7	66.9	12	XM_012983200.1 Erythranthe guttatus.seq
	13	27.9	29.8	29.7	27.3	29.3	30.1	28.3	29.9	0.3	2.0	24.0	20.9	█	78.6	78.1	79.9	66.7	66.7	66.7	67.1	65.9	13	XM_016577264.1 Nicotiana tabacum.seq
	14	28.8	30.1	29.4	28.8	29.8	30.3	27.6	29.4	25.8	25.4	29.4	27.6	25.4	█	89.4	76.6	67.2	66.5	66.5	67.5	65.9	14	XM_020720786.1 Phalaenopsis equestris.s
	15	27.1	30.2	26.9	29.9	29.8	30.6	25.9	26.7	26.6	26.0	30.1	28.0	26.2	11.5	█	76.5	66.1	65.7	65.7	66.1	64.4	15	XM_020838047.1 Dendrobium catenatum.seq
	16	27.6	29.5	29.2	25.3	29.3	27.1	26.8	29.0	23.5	22.9	29.6	24.6	23.5	28.3	28.6	█	65.9	65.3	65.3	68.4	67.3	16	XM_021995024.1 Spinacia oleracea.seq
	17	41.1	42.1	42.0	41.8	41.8	42.0	41.8	41.6	44.7	44.9	46.9	44.6	44.4	43.3	45.3	45.7	█	96.4	96.4	79.4	79.5	17	XM_024502078.1 Physcomitrella patens.se
	18	40.6	41.3	42.0	41.6	41.1	41.8	41.3	41.5	44.6	45.2	46.4	43.6	44.4	44.5	46.0	46.7	3.7	█	100.0	79.8	79.9	18	XM_024502421.1 Physcomitrella patens.se
	19	40.6	41.3	42.0	41.6	41.1	41.8	41.3	41.5	44.6	45.2	46.4	43.6	44.4	44.5	46.0	46.7	3.7	0.0	█	79.8	79.9	19	XM_024502422.1 Physcomitrella patens.se
	20	42.1	44.1	42.4	39.7	44.1	42.9	43.4	41.9	44.5	43.3	47.6	42.5	44.0	42.9	45.4	41.3	24.2	23.6	23.6	█	90.8	20	GU989311.1 Grimmia pilifera CDS.seq
	21	43.1	44.3	41.4	43.5	44.3	43.6	44.6	41.2	46.9	45.8	48.3	43.9	46.3	46.1	48.9	43.1	24.1	23.5	23.5	9.9	█	21	Dicranum scoparium CDS.seq
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21			

Рис. 36. Выравнивание нуклеотидных последовательностей *DsAPX* и идентичность (%) с гомологичными генными последовательностями других растений с помощью Lasergene.

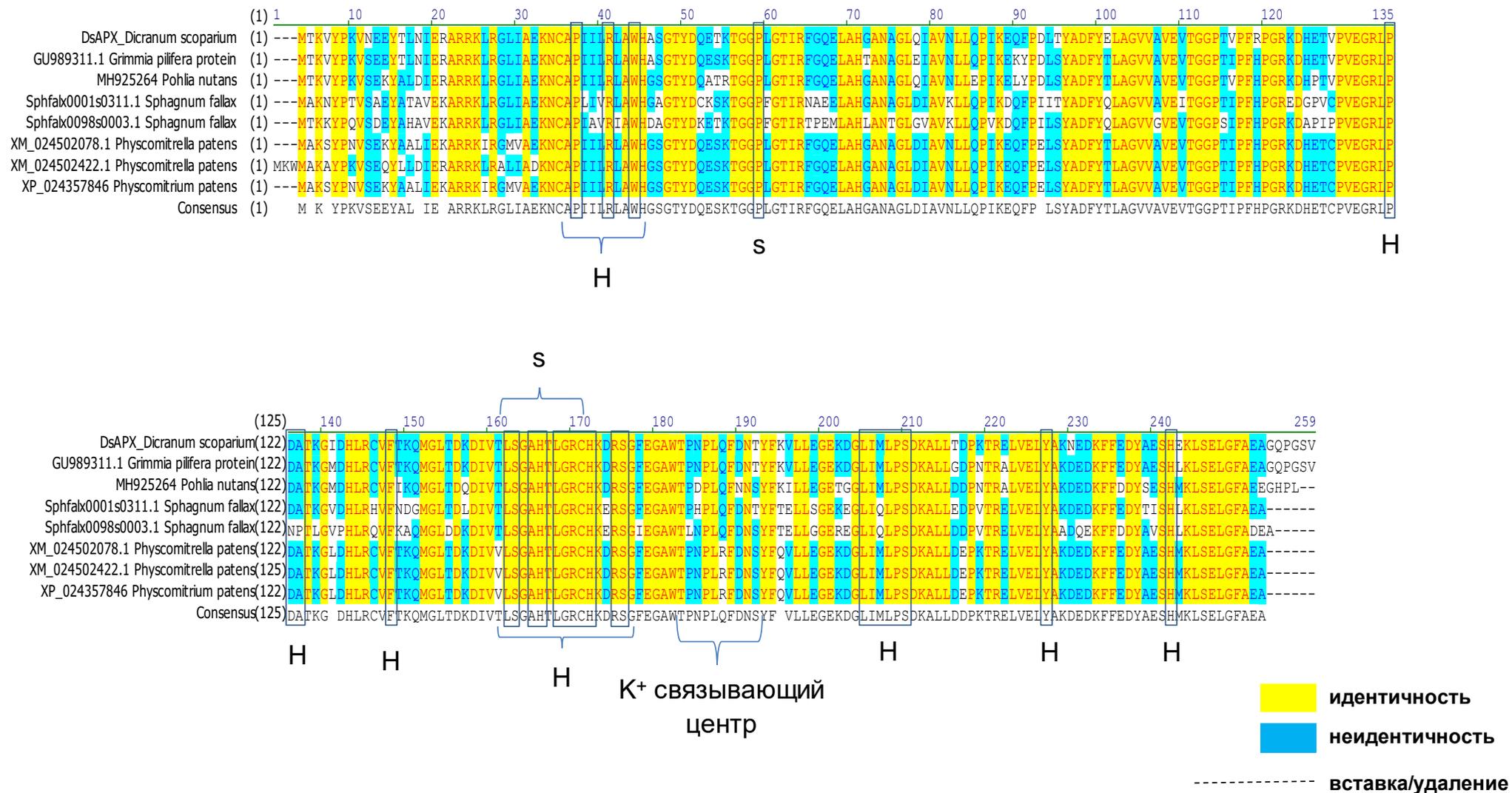


Рис. 37. Результат выравнивания аминокислотной последовательности DsAPX с аминокислотными последовательностями APX семи видов мхов с использованием Vector NTI. Выравнивание показывает высококонсервативные области и функциональные сайты, такие как сайты связывания гема, сайты связывания субстрата и сайты связывания K<sup>+</sup>, H и S обозначают сайты связывания гема и субстрата соответственно.

активности (рис. 37). Так, гистидин (H163, рис. 38) присутствует в активном центре APX всех растений и необходим для взаимодействия с ионом железа гема (Dabrowska et al., 2007). Рядом с гистидином находятся остатки аргинина (R38) и треонина (T41, Jespersen et al., 1997), при этом аргинин R38 играет функциональную роль в контроле связывания и ориентации субстрата (Celik et al., 2001). Кроме того, были обнаружены T164, T180 и аспарагиновая кислота (D187, рис. 38), образующие сайт связывания K<sup>+</sup>, который необходим для активности фермента (Jespersen et al., 1997). Аргинин R173 (рис. 38) играет важную роль в утилизации ASC при образовании промежуточного соединения II фермента (Burse, Poulos, 2000).

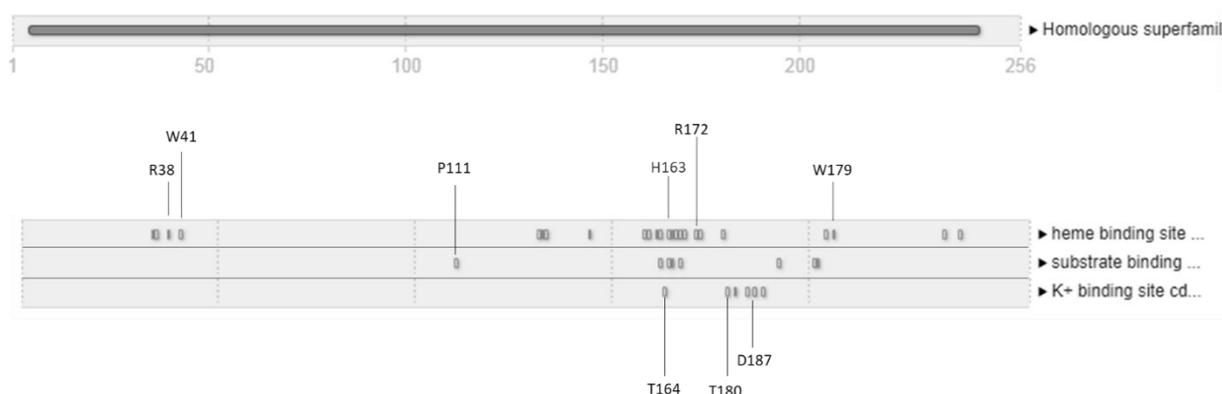


Рис. 38. Первичная структура, консервативные элементы белка APX *D. Scoparium*.

В литературе имеется много данных о структуре APX в сосудистых растениях, наиболее изученным является ген, кодирующий цитозольную APX – APX1 *A. thaliana* (Mittler, Zilinskas, 1992). кДНК APX выделены и охарактеризованы из нескольких видов растений, таких как *Hordeum vulgare* (Shi et al., 2001), *Porphyra yezoensis* (Ma et al., 2005), *G. pilifera* (Song et al., 2012) и других.

Обнаружено, что *DsAPX* содержит пероксидазный домен, что предполагает его пероксидазную активность. При анализе последовательности нуклеотидов *DsAPX* выявлены ССААТ-бокс, входящий в состав промотора (100-104 п.н.) и регуляторный САСGСА (124-129 п.н.) элемент. Считается, что последний находится в ферментах, индуцируемых ксенобиотиками (Rushmore et al., 1991). Кроме того, анализ вторичной структуры белков *DsAPX* показал, что белок состоит в основном из  $\alpha$ -спирали и неструктурированных петель и очень похож на другие APX мха из баз данных, что указывает на высокую консервативность этих белков (рис. 39, табл. 7). В APX полностью отсутствует  $\beta$ -поворот (табл. 7), что может негативно влиять на стабильность белка (Marcelino, Gierasch, 2010). Вероятно, это является одной из причин того, что APX быстро инактивируются при выделении в отсутствие субстрата (Shigeoka et al., 2002). В

литературе предполагается, что неструктурированные петли являются важной частью активного центра ферментов (Liao et al., 2020).

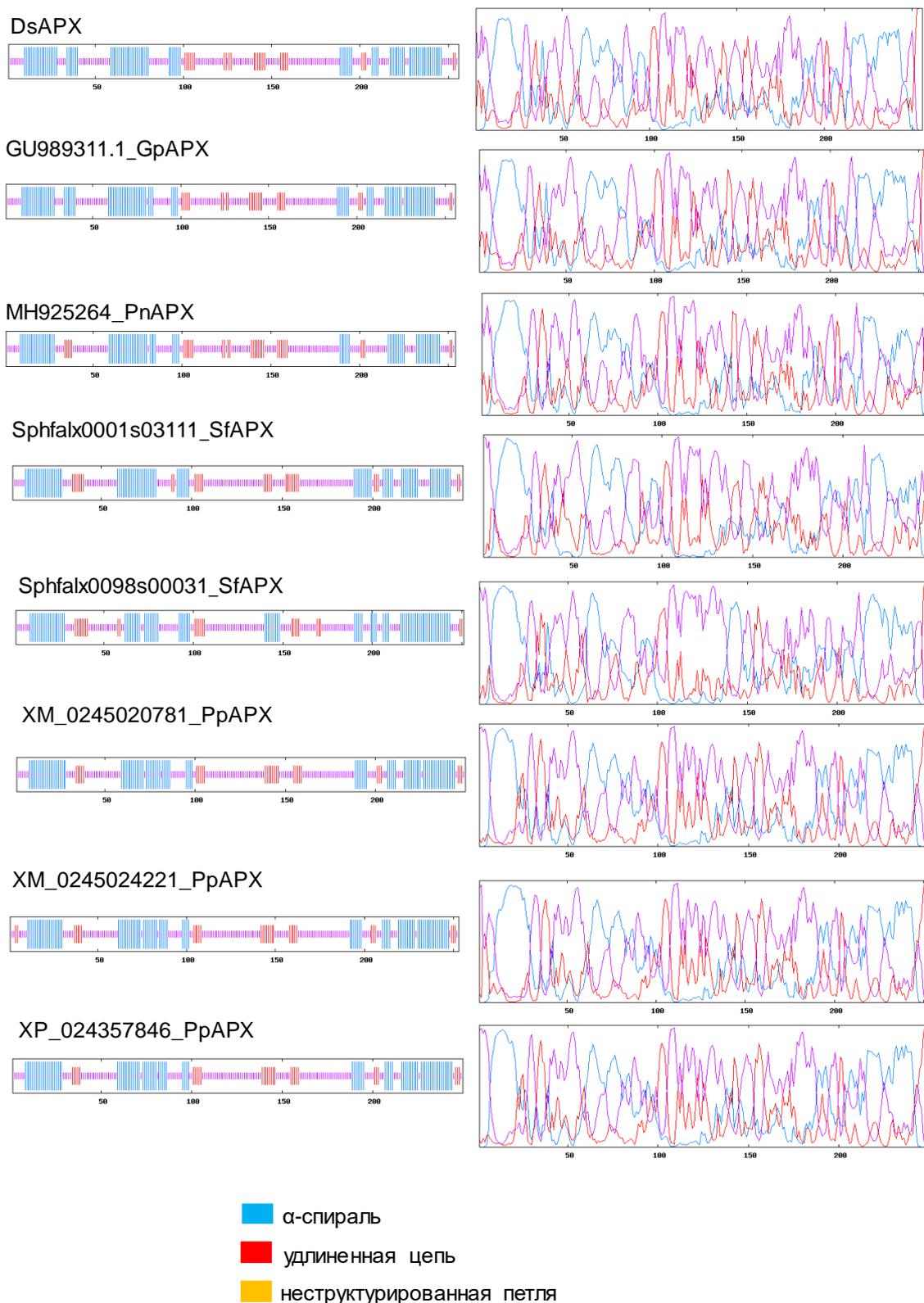


Рис. 39. Вторичная структура DsAPX; *G. pilifera* (GU989311.1\_GpAPX); *Pohlia nutans* (MH925264\_PnAPX); *S. fallax* (Sphfalx0001s0311.1\_SfAPX, Sphfalx0098s0003.1\_SfAPX и Sphfalx0098s0003.1\_SfAPX); *P. patens* (XM\_0245020781\_PpAPX, XM\_0245024221\_PpAPX и XP\_024357846\_PpAPX).

Таблица 7. Соотношение различных конформаций во вторичной структуре белка DsAPX и APX других мхов.

Белок	$\alpha$ -спираль (%)	удлиненная цепь (%)	$\beta$ -поворот (%)	неструктурированные петли (%)
DsAPX	36.72	10.55	0.00	52.73
GU989311.1_GpAPX	36.72	10.55	0.00	52.73
MH925264_PnAPX	31.50	13.39	0.00	55.12
Sphfalx0001s0311.1_SfAPX	35.20	12.80	0.00	52.00
Sphfalx0098s0003.1_SfAPX	37.45	10.36	0.00	52.19
XM_0245020781_PpAPX	36.40	11.60	0.00	52.00
XM_0245024221_PpAPX	35.57	12.25	0.00	52.17
XP_024357846_PpAPX	36.40	11.60	0.00	52.00

Анализ предсказанных третичных структур DsAPX и APX из семи видов мхов в сервере SWISS-MODEL показал, что DsAPX, GU989311.1\_GpAPX, MH925264\_PnAPX, Sphfalx0001s0311.1\_SfAPX, Sphfalx0098s0003.1\_SfAPX, XM\_0245020781\_PpAPX, XM\_0245024221\_PpAPX и XP\_024357846\_PpAPX имеют наивысшую схожесть по структуре, что указывает на их высококонсервативность, кроме Sphfalx0098s0003.1\_SfAPX который показал другую пространственную конформацию в отличие от других APX мхов (рис. 40). Сравнение третичной структуры белков этих мхов также подтверждает, что белки APX состоят, в основном, из  $\alpha$ -спиралей и неструктурированных петель (рис. 40), которые, как предполагается, играют ключевую роль в детоксикации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Liu et al., 2018; Liao et al., 2020).

Для исследования молекулярной эволюции и филогенетических связей между APX в растениях белковые последовательности APX были выравнены с помощью ClustalW2, и построено филогенетическое древо (рис. 41). Филогенетическое древо, построенное на основании анализа аминокислотных последовательностей DsAPX и двадцати шести других APX из мохообразных и сосудистых растений, показало, что белки APX можно разделить на три основные группы. Обнаружено, что DsAPX была сгруппирована вместе с APX из других видов мхов, таких как *G. pilifera*, *P. nutans*, *S. fallax* и *P. patens* с одним общим предком в процессе эволюции, в отличие от DsPOD (рис. 28). APX из сосудистых растений также сгруппировались в одной группе. Интересно, что APX мхов разделились на три подгруппы, при этом APX из *D. scoparium*, *G. pilifera*, *P. nutans* и *P. patens* сгруппировались вместе, что свидетельствует о наличии недавнего общего предка, а расхождение группы APX из *S. fallax* от групп APX других

мхов произошло гораздо раньше. Оказалось, что APX из *M. polymorpha* находится в одной клade с предком, от которого произошли APX сосудистых

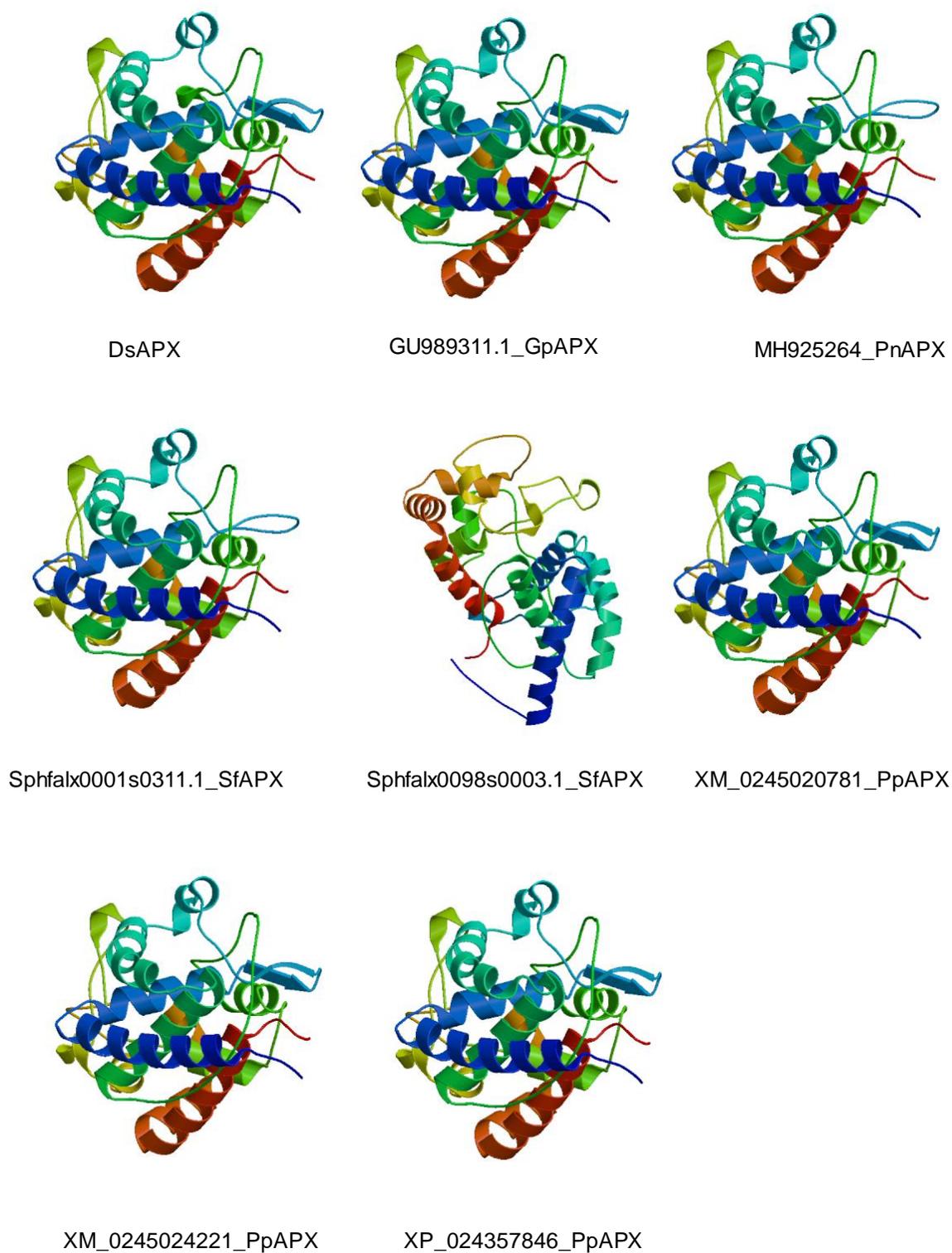


Рис. 40. Третичная структура DsAPX; *G. pilifera* (GU989311.1\_GpAPX); *P. nutans* (MH925264\_PnAPX); *S. fallax* (Sphfalx0001s0311.1\_SfAPX, Sphfalx0098s0003.1\_SfAPX и Sphfalx0098s0003.1\_SfAPX); *P. patens* (XM\_0245020781\_PpAPX, XM\_0245024221\_PpAPX и XP\_024357846\_PpAPX).

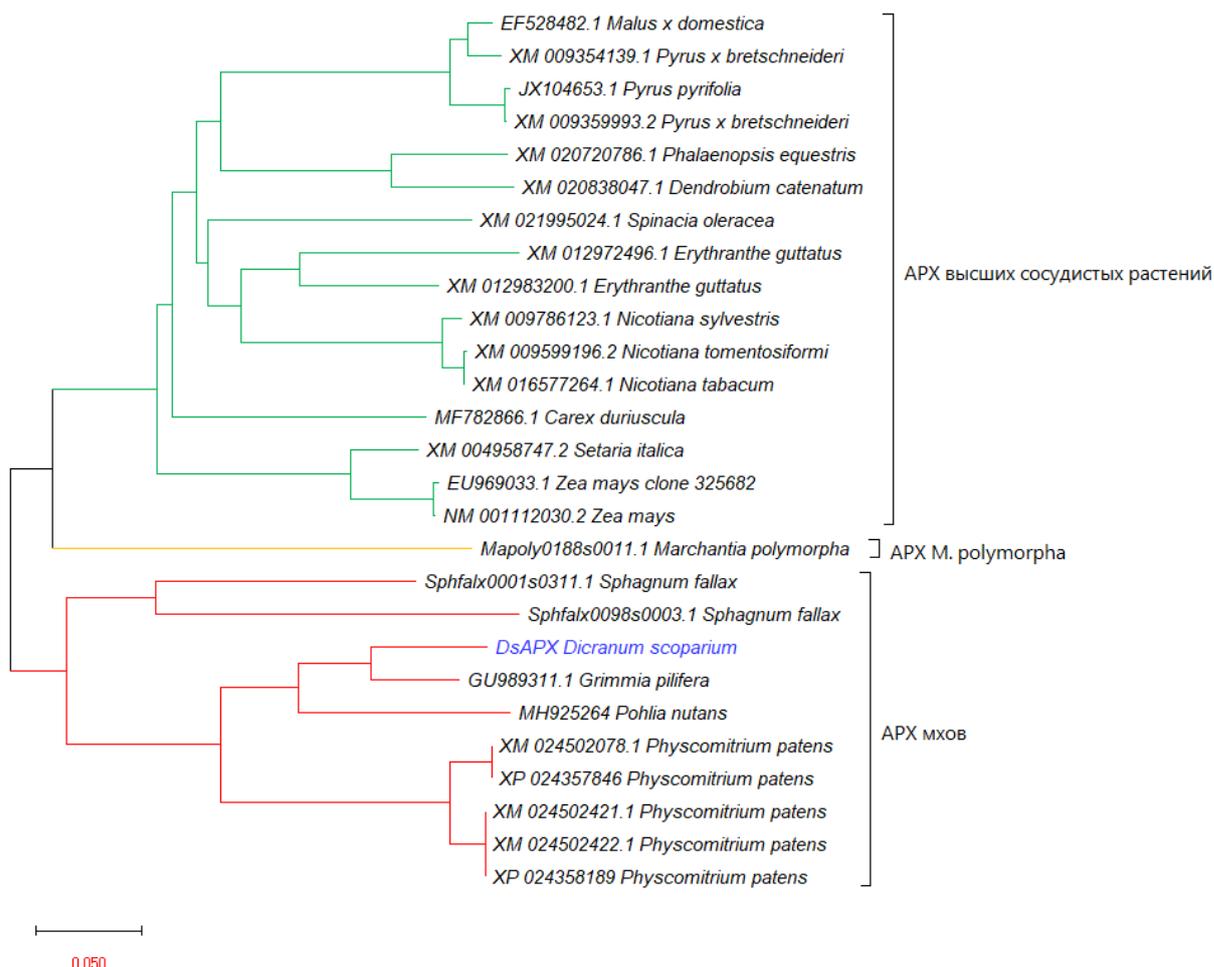


Рис. 41. Филогенетическое древо, показывающее взаимосвязь между аминокислотными последовательностями DsAPX и APX других растений. Масштабная линия представляет 5% расчетное расхождение последовательностей. Разные группы были отмечены разными цветами.

растений, и располагается между APX мхов и сосудистых растений (рис. 41). При этом, *M. polymorpha* занимает критическое положение в эволюционном развитии наземных растений от водорослей, возможно, сохраняя черты предков наземных растений (Bowman et al., 2017).

### 3.3.5. Экспрессия гена аскорбатпероксидазы *D. scoparium* при температурном воздействии, обезвоживании/регидратации, действии CdCl<sub>2</sub> и параквата

Для сосудистых растений показано, что экспрессия гена APX увеличивается при абиотическом и биотическом стрессе, кроме того, экспрессия зависит от стадий развития растения и условий стрессового воздействия (Mittler, Zilinska, 1992; Agrawal et al., 2003; Park et al., 2004; Pandey et al., 2017b).

Для выявления особенностей активности гена DsAPX нами был проведен анализ уровня экспрессии с помощью ПЦР-РВ при воздействии CdCl<sub>2</sub>, параквата, положительных и отрицательных температур и при обезвоживании/регидратации побегов *D. scoparium*. Было

обнаружено, что экспрессия гена *DsAPX* не менялась после 1 ч воздействия  $\text{CdCl}_2$ , но увеличивалась после 12 ч воздействия. Обработка побегов мха прооксидантом паракватом приводила к незначительному снижению уровня экспрессии после кратковременного (1 ч) воздействия, однако длительное (12 ч) воздействие паракватом повышало уровень экспрессии гена *DsAPX* почти в два раза (рис. 42А). При 1 ч действии положительных температур ( $+30^\circ\text{C}$ ) наблюдалась тенденция к увеличению экспрессии *DsAPX*, которая сохранялась и при длительном воздействии (12 ч) (рис. 42Б). При низкотемпературном воздействии ( $-20^\circ\text{C}$ ) экспрессия *DsAPX* недостоверно снижалась к 12 ч воздействия (рис. 42Б). Можно предположить, что снижение экспрессии гена *DsAPX* при действии отрицательных температур, может приводить и к снижению активности APX (рис. 33), и соответственно к усилению образования АФК.

Кроме того, было обнаружено, что экспрессия *DsAPX* увеличивается при прохождении побегов мха через цикл обезвоживание/регидратация мха *D. scoparium* (рис. 42В), что коррелирует с увеличением активности фермента при обезвоживании над силикагелем (рис. 32). Аналогичные результаты были получены для мха *G. pilifera*, где обезвоживание активировало экспрессию *GpAPX* (Song et al., 2012). Было показано, что активность APX коррелировала с экспрессией *DsAPX* с коэффициентом 0,7 (рис. 32, 42В). Корреляция между содержанием  $\text{H}_2\text{O}_2$ , активностью APX *D. scoparium* (рис. 10, см. главу 3.1.; рис. 32, см. главу 3.3.1.) и экспрессией гена (рис. 42В соответственно) в наших экспериментах по изучению действия обезвоживания/регидратации на мох *D. scoparium* предполагает, что ключевой ролью фермента является удаление  $\text{H}_2\text{O}_2$ , избыток которой образуется при обезвоживании. Возможно, что изменение активности фермента при быстром обезвоживании связано с синтезом фермента *de novo*, поскольку на протяжении всего эксперимента активность APX коррелировала с экспрессией *DsAPX* (рис. 32, 42В).

Имеются данные, что экспрессия APX необходима для повышения устойчивости растений к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Например, APX в табаке может защитить листья от окислительного стресса, вызванного солевым воздействием (Lee et al., 2007). Сверхэкспрессия APX в *A. thaliana* показала, что трансгенные растения проявляют повышенную устойчивость к солевому стрессу (Lu et al., 2007) и дефициту воды (Yan et al., 2003). Интересно, что в литературе нет информации о влиянии температуры на экспрессию APX во мхах. Однако изменения уровня экспрессии *DsAPX* при обезвоживании и тепловом стрессе подтверждают нашу гипотезу о том, что APX участвует в защите мха *D. scoparium* от окислительного стресса.

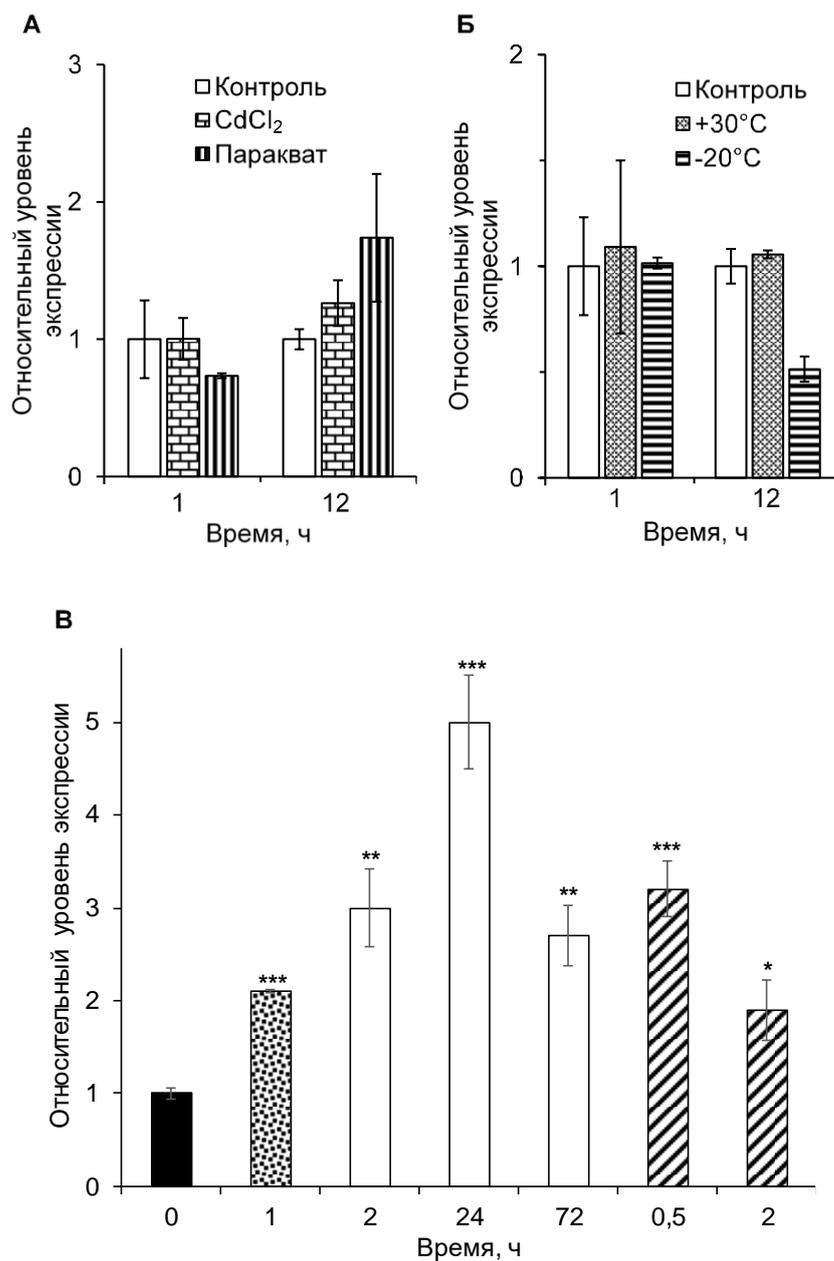


Рис. 42. Относительный уровень экспрессии *DsAPX* при выдерживании побегов *D. scorarium* в **А** –  $\text{CdCl}_2$  (100 мкМ) и параквате (100 мкМ) в течение 2 и 12 ч, **Б** – воздействие неблагоприятных температур ( $-20^\circ\text{C}$ ) и ( $+30^\circ\text{C}$ ) в течение 2 и 12 ч, при обезвоживании/регидратации (**В**). Черные столбики – сухой мох (контрольный вариант), столбики с точками - 1 ч гидратации до обезвоживания, белые столбики – обезвоживание над силикагелем, заштрихованные столбики – регидратация.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что пероксидазы высших несосудистых растений, таких как мхи, обладают функциями и свойствами, подобными таковым у пероксидаз высших сосудистых растений. Мох *D. scoparium* характеризуется наивысшей пероксидазной активностью среди совместно произрастающих лесных мхов. Можно полагать, что пероксидазы являются ключевыми факторами ответа *D. scoparium* на действие абиотических стрессоров. Наши данные демонстрируют, что высокая конститутивная активность пероксидазы может еще больше повышаться при абиотическом стрессе, в том числе, индуцированном обезвоживанием, регидратацией и неблагоприятными температурами. Обнаружено, что пероксидазы класса III в *D. scoparium* представлены множеством изоформ, проявляющих как анти-, так и прооксидантную активность. Прооксидантная активность некоторых пероксидаз класса III была ранее показана и для высших сосудистых растений (Bolwell et al., 2002; Minibayeva et al., 2009). Таким образом, образование АФК пероксидазами – эволюционно древний защитный механизм, способствующий повышению адаптации высших растений, их приспособлению к изменяющимся условиям внешней среды и, как следствие, успешной колонизации различных экологических ниш.

В настоящей работе с помощью биоинформатического анализа впервые идентифицированы 22 гена *DsPOD*, кодирующих пероксидазы III класса в *D. scoparium*. Показано, что два клонированных и секвенированных гена *DsPOD*, высокогомологичных по отношению к генам *P. patens*, характеризовались наибольшей стресс-индуцированной экспрессией. Биоинформатический анализ показал, что все белки DsPOD имеют классическую структуру пероксидазного домена. Увеличение активности фермента и повышение уровня экспрессии *DsPOD* в ответ на действие различных стрессоров предполагает, что пероксидазы III класса играют одну из ключевых ролей в формировании устойчивости мха *D. scoparium* к абиотическим стрессам. Нами впервые идентифицирована и секвенирована кодирующая последовательность цитозольной аскорбатпероксидазы *DsAPX* из мха *D. scoparium*, имеющая высокую гомологию с нуклеотидными последовательностями *APX* других растений. Изменение экспрессии гена *DsAPX* и уровня активности *DsAPX*, коррелирующее с содержанием  $H_2O_2$  при абиотических воздействиях, свидетельствует о вовлечении аскорбатпероксидазы в контроль уровня АФК, накапливаемых при стрессе. Стресс-индуцируемая активность ферментов и обнаруженные в результате *in silico* анализа консервативные элементы в структуре генов и белков пероксидаз I и III класса *D. scoparium*, а также филогенетический анализ свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса в клетках растений.

## ВЫВОДЫ

1. Обнаружено образование гидроксильного радикала, супероксидного анион-радикала и перекиси водорода в побегах мха *Dicranum scoparium*. Впервые показано, что в *D. scoparium* в образовании супероксидного анион-радикала принимают участие изопероксидазы класса III. Установлено, что пероксидазы класса III мха проявляют как анти-, так и прооксидантные свойства.

2. Показано, что *D. scoparium* обладает наивысшей пероксидазной активностью среди совместно произрастающих лесных мхов. Обнаружено, что пероксидазы III класса и аскорбатпероксидазы вовлечены в стрессовые ответы *D. scoparium* после воздействия обезвоживания/регидратации и неблагоприятных температур, что предполагает важные роли пероксидаз в формировании устойчивости мха дикранума к абиотическому стрессу.

3. Впервые идентифицированы гены пероксидаз III класса *DsPOD* дикранума. С использованием биоинформатического анализа в *DsPOD* кодируемых белках обнаружено наличие консервативных доменов, характерных для типичных пероксидаз III класса.

4. Впервые в *D. scoparium* идентифицирован ген аскорбатпероксидазы *DsAPX*, имеющий высокую степень гомологии с *APX G. pilifera* и *P. patens*. С помощью *in silico* анализа показано, что белок аскорбатпероксидазы *D. scoparium* содержит несколько высококонсервативных сайтов, важных для ферментативной активности. На основании биоинформатического анализа *DsAPX* выявлено, что идентифицированный ген *APX* кодирует типичную цитоплазматическую аскорбатпероксидазу.

5. Изменение уровня экспрессии генов *DsPOD* и *DsAPX* при воздействии обезвоживания/регидратации,  $\text{CdCl}_2$ , параквата и неблагоприятных температур предполагает, что эти белки могут играть защитную роль для предотвращения окислительных повреждений в дикрануме при стрессе. Стресс-индуцируемая активность и наличие консервативных элементов в структуре генов и белков пероксидаз *D. scoparium* свидетельствуют о сохранении этих последовательностей в геноме растений в ходе эволюции ввиду важности пероксидаз в поддержании окислительно-восстановительного статуса в клетках растений.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Авраменко, Т.В.** Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC* [Текст] // дис. канд. биол. наук: 03.01.06 – Владивосток. – 2015. – С. 121.
2. **Боголюбов, А.С.** Биотопическое распределение мхов рода *Dicranum* на Костромской таежной станции [Текст] / А.С. Боголюбов, Н. Комиссарова, С.А. Мошковский // Биологического кружка Дарвиновского музея "ВЕСТНИК ВООП" © Экологический центр "Экосистема"™, А.С. – 1997. [Электронный ресурс]: Режим доступа: [http://ecosystema.ru/voop/works/v03\\_04.htm](http://ecosystema.ru/voop/works/v03_04.htm) - Дата обращения: 05. 12. 2021.
3. **Болдырев А.А.** Окислительный стресс и мозг [Текст] // Сорос. образ. Журналю. – 2001. –Т. 7. – С. 21–28.
4. **Веселова, С.В.** Влияние этилена и активных форм кислорода на развитие патогена *Stagonospora podorum* Berk. в тканях растений пшеницы [Текст] / С.В. Веселова, Г.Ф. Бурханова, Т.В. Нужная, С.Д. Румянцев, И.В. Максимов // Биомика. – 2018. – Т. 10. – С. 387–399.
5. **Воронков, Л. А.** Изучение каталитических свойств пероксидазы хлоропластов [Текст] / Л. А. Воронков, И. В. Живописцева // Физиология здорового и больного растения – М.: Изд-во МГУ. – 1970. – С. 305–311.
6. **Газарян, И. Г.** Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений [Текст] / И.Г. Газарян, Д.М. Хушпульян, В.И. Тишков // Успехи биологической химии. – 2006. – Т. 46. – С. 303–322.
7. **Грин, Н.** Биология: В 3-х т [Текст] / Н. Грин, У. Стаут, Д. Тейлор // Т. 1.: Пер. с англ./Под ред. Р. Сопера. – М.: Мир. – С. 1990–368.
8. **Ибрагимова, С.С.** Роль различных метаболитов в формировании стрессоустойчивости растений [Текст] / С.С. Ибрагимова, В.В. Горелова, А.В. Кочетов, В.К. Шумный // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2010. – Т. 8. – Вып.3. – С. 98–103 – ISSN 1818–7943.
9. **Карелина, А.** 2016. *Dicranum scoparium* Hedw. [Текст] // Плантариум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран. 2007—2019. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.plantarium.ru/page/image/id/482308.html> - Дата обращения: 05. 12. 2021
10. **Ладыгина, М.Е.** Особенности изоэнзимного состава пероксидазы и полифенолоксидазы при вирусном патогенезе у табака [Текст] / М. Е. Ладыгина, Э. А. Таймла, Б. А. Рубин // Физиология растений. – 1970. – Т. 17. – С. 928–935.

11. **Лебедева, О.В.** Кинетическое изучение реакции окисления *o*-дианизидина перекисью водорода в присутствии пероксидазы из хрена [Текст] / О. В. Лебедева, Н. Н. Угарова, И. В. Березин // Биохимия. – 1977. – Т. 42. – Вып. 8. – С. 1372–1379.
12. **Маниатис, Т.** Гель-электрофорез [Текст] / Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук // Молекулярное клонирование. – 1984. – С. 157–167.
13. **Мерзляк, М.Н.** Активированный кислород и жизнедеятельность растений [Текст] // Сорос. образ. Журнал. – 1999. – Т. 9. – С. 20–26.
14. **Октябрьский, О.Н.** Редокс- регуляция клеточных функций [Текст] / О.Н. Октябрьский, Г.В. Смирнова // Биохимия. – 2007. – Т. 72. – Вып. 2. – С. 22–29.
15. **Олениченко, Н.А.** Низкотемпературный стресс и устойчивость растений [Text] / Н.А. Олениченко, Н.В. Загоскина // Биология в Школе, Издательство: ООО "Школьная Пресса" (Москва). – 2007. – С. 13–16. – ISSN:0320-9660 eISSN: 2409-8779.
16. **Роговина, В.В.** Пероксидазосомы клеток растений [Текст] / В. В. Роговина, Р. А. Муравьёва, В. А. Фомина, В. М. Муштакова // Изв. РАН. Сер. биол. – 1996. – С. 16–22.
17. **Рубин, Б. А.** Физиология и биохимия дыхания растений [Текст] / Б. А. Рубин, М. Е. Ладыгина // М: Изд-во МГУ. – 1974. – С. 512.
18. **Цветков, В.О.** Карты Рамачандрана: описание конформации белковой молекулы. Интерактивное дополнение к пособию [Текст] // Сборник заданий по биоинформатике: учебное пособие. – 2017. – Уфа: РИЦ БашГУ, ISBN 978-5-7477-4467-7.
19. **Часов, А.В.** Действие экзогенных фенолов на супероксидобразующую способность экстраклеточной пероксидазы корней проростков пшеницы [Текст] / А.В. Часов, Ф.В. Минибаева // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – Вып. 7. – С. 946–955.
20. **Часов, А.В.** Методические подходы к исследованию редокс-активности апопласта. 2. Регуляция активности пероксидаз [Текст] / А.В. Часов, Ф.В. Минибаева // Физиология растений. – 2014. – Т. 61. – С. 668–675.
21. **Шакула, Ф.В.** *Dicranum scorarium* Hedw. [Текст] // Плантариум: открытый онлайн атлас-определитель растений и лишайников России и сопредельных стран. 2007—2021. [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.plantarium.ru/page/image/id/589905.html> - Дата обращения: 05.04.2021.
22. **Шугалей, Н.А.** Поиск промышленных источников выделения растительных пероксидаз, области практического использования полученного фермента [Текст] / Н.А. Шугалей, А.Б. Власова, А.Т. Федорова, А.Л. Федулов // Труды Белорусского государственного университета. – 2010. – Т. 5. – № 2. – С. 53–62.

23. **Agrawal, G.K.** Importance of ascorbate peroxidase OsAPX1 and OsAPX2 in the rice pathogen response pathways and growth and reproduction revealed by their transcriptional profiling [Text] / N.S. Jwa, H. Iwahashi, R. Rakwal // *Gene*. – 2003. – V. 322. – P. 93–103.
24. **Ahmad, Q.** Purification and Characterization of Peroxidase from Broccoli (*Brassica oleracea* L. Var. *Italica*) Stems [Text] / Q. Ahmad, A. Mehmood, Z. Saeed, M. Fayyaz // *Electronic J Biol*. – 2019. – V. 15. – P. 1.
25. **Aicart-Ramos, C.** Protein palmitoylation and subcellular trafficking [Text] / C. Aicart-Ramos, R.A. Valero, I. Rodriguez-Crespo // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – V. 1808. – P. 2981–94.
26. **Alam, A.** RAPD and morphological analysis of bryophytes — *Thuidium tamariscinum* (Hedw.) Schimp, and *Hyophyla comosa* Dixon in P. de la Varde [Text] / A. Alam, S. Khan, V. Sharma, S.C. Sharma, A. Rani // *Researcher*. – 2012. – V. 4. – P. 98–103.
27. **Almagro, L.** Class III peroxidases in plant defence reactions [Text] / L. Almagro, L.V. Gomez Ros, S. Belchi-Navarro, R. Bru, A. Ros Barcelo, M.A. Pedreno // *J. Exp. Bot*. – 2009. – V. 60. – P. 377–390.
28. **Altschul, S.F.** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [Text] / T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D.J. Lipman // *Nucleic Acids Res*. – 1997. – V. 25. – P. 3389–3402.
29. **Alvarez, M.E.** Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity [Text] / M.E. Alvarez, R.I. Pennel, P.J. Meijer // *Cell*. – 1998. – V. 92. – P. 1–20.
30. **Andrews, J.** Subcellular localization of peroxidase in tomato fruit skin and the possible implication for the regulation of fruit growth [Text] / J. Andrews, S. R. Adams, K. S. Burton, C. E. Evered // *J. Exp. Bot*. – 2002. – V. 53. – P. 2185–2191.
31. **Andrews, S.** FastQC: A quality control tool for high throughput sequence [Электронный ресурс]: Режим доступа: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> - Дата обращения: 05.04.2021.
32. **Anjum, N.A.** Catalase and ascorbate peroxidase—representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-detoxifying heme enzymes in plants [Text] / N.A. Anjum, P. Sharma, S.S. Gill, M. Hasanuzzaman, E.A. Khan, K. Kachhap, A.A. Mohamed, P. Thangavel, G.D. Devi, P. Vasudhevan, A. .Sofa, N.A. Khan, A.N. Misra, A.S. Lukatkin, H.P. Singh, E. Pereira, N. Tuteja // *Environ Sci Pollut Res Int*. – 2016. – V.23. – P. 19002–19029.
33. **Anjun, T.** Desiccation-induced changes in viability, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in *Mimusops elengi* seeds [Text] // *Afr. J. Biotechnol*. – 2012. – V. 11. – № 44.
34. **Apel, K.** Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction [Text] / K. Apel, H. Hirt // *Annu Rev Plant Biol*. – 2004. – V. 55. – P. 373–399.

35. **Apostol, J.** Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells [Text] / J. Apostol, P.F. Heinstejn, P.S. Low // *J. Plant Physiol.* – 1989. – V. 90. – P. 109–114.
36. **Asada, K.** Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide scavenging enzyme in plants [Text] // *Physiol. Plant.* – 1992. – V. 85. – P. 235–241.
37. **Asada, K.** Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions [Text] // *Plant Physiol* – 2006. – V. 141. – P. 391–396.
38. **Bailey, T.L.** MEME SUITE: tools for motif discovery and searching [Text] T.L. Bailey, M. Boden, F.A. Buske, M. Frith, C.E. Grant, L. Clementi, J. Ren, W.W. Li, W.S. Noble // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – (suppl\_2) – W202–W208.
39. **Bakardjieva, N.T.** Effect of calcium and zinc ions on the sensitivity of peroxidase from mosses (*Mnium* sp.) and ferns (*Polypodium vulgare*) to high temperature [Text] / N.T. Bakardjieva, N. Christova, K. Christov // *Can. J. Bot.* – 1996. – V. 74. – P. 1665–1670.
40. **Baroli, C.G.** Drought and watering-dependent oxidative stress: effect on antioxidant content in *Triticum aestivum* L. leaves [Text] / C.G. Baroli, M. Simontacci, E. Tambussi, J. Beltrano, E. Montaldi, S. Puntarulo // *J Exp Bot.* – 1999. – V. 50. – P. 375–383.
41. **Bartels, D.** Drought and salt tolerance in plants [Text] / D. Bartels, R. Sunkar // *Critical Reviews in Plant Sciences.* – 2005. – V. 24. – P. 23–58.
42. **Basile, A.** Heavy metal deposition in the Italian “triangle of death” determined with the moss *Scorpiurum circinatum* [Text] / A. Basile, S. Sorbo, G. Aprile, B. Conte, R.C. Cobianchi, T. Pisani, S. Loppi // *Environmental Pollution* / – 2009. – V. 157. – P. 2255–2260.
43. **Basile, A.** Ultrastructural changes and Heat Shock Proteins 70 induced by atmospheric pollution are similar to the effects observed under in vitro heavy metals stress in *Conocephalum conicum* (Marchantiales -Bryophyta) [Text] / A. Basile, S. Sorbo, B. Conte, M. Cardi, S. Esposito // *Environ. Pollut.* – 2013. – V. 182. – P. 209–216.
44. **Bates, J.W.** Effects of intermittent desiccation on nutrient economy and growth of two ecologically contrasted mosses [Text] // *Annals of Botany.* – 1997. – V. 79. – P. 299–309.
45. **Bay, G.** Boreal feather mosses secrete chemical signals to gain nitrogen [Text] / G. Bay, N. Nahar, M. Oubre, M. Whitehouse, D. Wardle, O. Zackrisson, M. Nilsson, U. Rasmussen // *The New Phytologist.* – 2013. – V. 200. – P. 54–60.
46. **Beckett, R.P.** Reactive oxygen species metabolism in desiccation-stressed thalli of the liverwort *Dumortiera hirsuta* (SW) Nees [Text] / R.P. Beckett, F.V. Minibayeva., S. Lüthje, M. Böttger // *Physiologia Plantarum.* – 2004. – V. 122. – P.3–10.
47. **Benikhlef, L.** Perception of soft mechanical stress in Arabidopsis leaves activates disease resistance [Text] / L. Benikhlef, F. L’Haridon, E. Abou-Mansour, M. Serrano, M. Binda, A. Costa, S. Lehmann, J.P. Métraux // *BMC Plant Biol.* – 2013. – V. 13. – P. 133.

48. **Berg, T.** Use of mosses (*Hylocomium splendens* and *Pleurozium schreberi*) as biomonitors of heavy metal deposition: from relative to absolute deposition values [Text] / T. Berg, E. Steinnes // Environmental Pollution. – 1997. – V. 98. – P. 61–71.
49. **Bewley, J. D.** Physiological aspects of desiccation-tolerance [Text] // Ann. Rev. Plant Physiol. – 1979. – V. 30. – P. 195–238.
50. **Bewley, J.D.** Desiccation and survival in plants. Drying without dying [Text] / J.D. Bewley, M. Black, H.W. Pritchard (eds) // Ann Bot. – 2003. – V. 91. – P. 105.
51. **Bewley, J.D.** Desiccation tolerance [Text] / J.D. Bewley, J.E. Krochko // In Encyclopedia of Plant Physiology. Physiological Ecology II, ed. O. L. Lange, P. S. Nobel, C. B. Osmond & H. Ziegler, Berlin: Springer-Verlag. – 1982. – V. 12. – P. 325–78.
52. **Bewley, J.D.** Desiccation-tolerance in vegetative plant tissues and seeds: Protein synthesis in relation to desiccation and a potential role for protection and repair mechanisms, in *Eater and life: A comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular levels* [Text] / J.D. Bewley, M.J. Oliver // Osmond, C. B. & Somero, G (eds), Springer-Verlag, Berlin. –1992. – P. 141–160.
53. **Bewley, J.D.** Evolving Strategies in the adaptation to desiccation. Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. Current Topics in Plant Physiology [Text] / J.D. Bewley, T.L Reynolds, M.J. Oliver // In:Close, T. J. & Bray, E. A. (eds), American Society Plant Physiology. – 1993. – V. 10. – P. 193–201.
54. **Bhattarai, H.D.** Antioxidant activity of *Sanionia uncinata*, a polar moss species from King George Island, Antarctica, Phytother [Text] / H.D. Bhattarai, B. Paudel, H.S. Lee, Y.K. Lee, J. Yim // Res. – 2008. – V. 22. – P. 1635–1639.
55. **Bhattarai, H.D.** In vitro antioxidant capacities of two benzonaphthoxanthenones: Ohiensis F and G, isolated from the Antarctic moss *Polytrichastrum alpinum* [Text] / H.D. Bhattarai, B. Paudel, H.K. Lee, H. Oh, J.H. Yim // Z Naturforsch C J Biosci. – 2009. – V. 64. – P. 197–200.
56. **Biczak, R.** Quaternary ammonium salts with tetrafluoroborate anion: Phytotoxicity and oxidative stress in terrestrial plants [Text] // J. Hazard. Mater. – 2016. – V. 304. – P. 173–185.
57. **Bindschedler, L.** Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in Arabidopsis required for pathogen resistance [Text] / L. Bindschedler, J. Dewdney, K.A. Blee // The Plant Journ. – 2006. – V. 47. – P. 851–863.
58. **Bolger, A.M.** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data [Text] / A.M. Bolger, M. Lohse, B. Usadel // Bioinformatics. – 2014. – V. 30. – P. 2114–2120.
59. **Bolwell, G.P.** The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system [Text] / G.P. Bolwell, L.V. Bindschedler, K.A. Blee, V.S. Butt, D.R. Davies, S.L. Gardner, C. Gerrish, F.V. Minibayeva // J Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1367–1376.

60. **Bonifacio, A.** Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress [Text] / A. Bonifacio, M.O. Martins, C.W. Ribeiro, A.V. Fontenele, F.E. Carvalho, M. Margis-Pinheiro, J.A. Silveira // *Plant Cell Environ.* – 2011. – V. 34. – P. 1705–1722.
61. **Boquete, M.T.** Assessing the effects of heavy metal contamination on the proteome of the moss *Pseudoscleropodium purum* cross-transplanted between different areas [Text] / M.T. Boquete, J. Bermúdez-Crespo, J.R. Aboal, A. Carballeira, J.Á Fernández // *Environmental Science and Pollution Research.* – 2014. – V. 21. – P. 2191–2200.
62. **Borel, C.** Dicranin, an antimicrobial and 15-lipoxygenase inhibitor from the moss *Dicranum scoparium* [Text] / C. Borel, D.H. Welti, I. Fernandez, M. Colmenares // *J Nat Prod.* – 1993. – V. 56. – P. 1071–7.
63. **Bowman, J.L.** WGS assembly of *Marchantia polymorpha* [Text] / J.L. Bowman, T. Kohchi, K.T. Yamato, J. Jenkins, S. Shu, K. Ishizaki, S. amaoka, R. Nishihama, Y. Nakamura, F. Berger, C. Adam, S.S. Aki, F. Althoff, T. Araki, M. A. Arteaga-Vazquez, S. Balasubramanian, D. Bauer, C. R. Boehm, L. Briginshaw, J. CaballeroPerez, B. Catarino, F. Chen, S. Chiyoda, M. Chovatia, K.M. Davies, M. Delmans, T. Demura, T. Dierschke, L. Dolan, A.E. Dorantes-Acosta, D.M. klund, S.N. Florent, E. Flores-Sandoval, A. Fujiyama, H. Fukuzawa, B. Galik, D. Grimanelli, J. Grimwood, U. Grossniklaus, T. Hamada, J. Haseloff, A.J. Hetherington, A. Higo, Y. Hirakawa, H.N. Hundley, Y. Ikeda, K. Inoue, S. Inoue, S. Ishida, Q. Jia, M. Kakita, T. Kanazawa, Y. Kawai, T. Kawashima, M. Kennedy, K. Kinose, T. Kinoshita, Y. Kohara, E. Koide, K. Komatsu, S. Kopsischke, M. Kubo, J. Kyozuka, U. Lagercrantz, S.S. Lin, E. Lindquist, A.M. Lipzen, C. Lu, E. D. Luna, R.A. Martienssen, N. Minamino, M. Mizutani, M. Mizutani, N. Mochizuki, I. Monte, R. Mosher, H. Nagasaki, H. Nakagami, S. Naramoto, K. Nishitani, M. Ohtani, T. Okamoto, M. Okumura, J. Phillips, B. Pollak, A. Reinders, M. Roevekamp, R. Sano, S. Sawa, M.W. Schmid, M. Shirakawa, R. Solano, A. Spunde, N. Suetsugu, S. Sugano, A. Sugiyama, R. Sun, Y. Suzuki, M. Takenaka, D. Takezawa, H. Tomogane, M. Tsuzuki, T. Ueda, M. Umeda, J.M. Ward, Y. Watanabe, K. Yazaki, R. Yokoyama, Y. Yoshitake, I. Yotsui, S. Zachgo, J. Schmutz // *Cell.* – 2017. – V. 171. – P. 287–304.e15.
64. **Breusegem, F.V.** The role of active oxygen species in plant signal transduction [Text] / F.V. Breusegem, E. Vranova, J.F. Dat // *Plant Sci.* – 2001. – V. 161. – P. 405–414.
65. **Bruns, I.** Cadmium lets increase the glutathione pool in bryophytes [Text] / I. Bruns, K. Sutter, S. Menge, D. Neumann, G.J. Krauss // *Journal of Plant Physiology.* – 2001. – V. 158. – P. 79–89.
66. **Buck, W.R.** Morphology, anatomy, and classification of the Bryophyta [Text] / W.R. Buck, A.J. Shaw // In Goffinet B, Shaw A (ed) *Bryophyte Biology*. Cambridge: Cambridge University Press. – 2008. – P. 55–138.

67. **Buffard, D.** Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells [Text] / D. Buffard, C. Breda, R van Huystee // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 1990. – V. 87. – P. 8874–8878.
68. **Bunkelmann, J.R.** Ascorbate peroxidase, a prominent membrane protein in oil seed glyoxysomes [Text] / J.R. Bunkelmann, R.N. Trelease // Plant Physiol. – 1996. – V. 110. – P. 589–598.
69. **Burner, U.** Transient-state and steady-state kinetics of the oxidation of aliphatic and aromatic thiols by horseradish peroxidase [Text] / U. Burner, C. Obinger // FEBS Letter. – 1997. – V. 411. – P. 269–274.
70. **Bursey, E.H.** Two substrate binding sites in ascorbate peroxidase: the role of arginine 172 [Text] / E.H. Bursey, T.L. Poulos // Biochemistry. – 2000. – V. 39. – P. 7374–7379.
71. **Cansev, A.** The activities of catalase and ascorbate peroxidase in olive (*Olea europaea* L. cv. Gemlik) under low temperature stress [Text] / A. Cansev, H. Gulen, A. Eris // Hortic Environ Biotechnol. – 2011. – V. 52. – P. 113–120.
72. **Cao, Y.** Structural, evolutionary, and functional analysis of the Class III peroxidase gene family in Chinese pear (*Pyrus bretschneideri*) [Text] / Y. Cao, Y. Han, D. Meng, D. Li, Q. Jin, Y. Lin, Y. Cai // Front Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 1874.
73. **Capelli, N.** Eleven cDNA clones from *Arabidopsis thaliana* encoding isoperoxidases (Accession Nos X98313, X98314, X98315, X98316, X98317, X98318, X98319, X98320, X98321, X98322, and X98323) [Text] / N. Capelli, M. Tognolli, J. Flach // Plant Physiology. – 1996. – V. 112. – P. 446.
74. **Carey, S.B.** The *Ceratodon purpureus* genome uncovers structurally complex, gene rich sex chromosomes. [Text] / S.B. Carey, J. Jenkins, J.T. Lovell, F. Maumus, A. Sreedasyam, A.C. Payton, S. Shu, G.P. Tiley, N. Fernandez-Pozo, K. Barry, C. Chen, M. Wang, A. Lipzen, C. Daum, C.A. Saski, J.C. McBreen, R.E. Conrad, L.M. Kollar, S. Olsson, S. Huttunen, J.B. Landis, J.G. Burleigh, N.J. Wickett, M.G. Johnson, S.A. Rensing, J. Grimwood, J. Schmutz, S.F. McDaniel // bioRxiv – 2020.07.03 – [Электронный ресурс]: Режим доступа: doi.org/10.1101/2020.07.03.163634.
75. **Carginale, V.** Accumulation, localisation, and toxic effects of cadmium in the liverwort *Lunularia cruciate* [Text] / V. Carginale, S. Sorbo, C. Capasso, F. Trinchella, G. Cafiero, A. Basile // Protoplasma. – 2004. – V. 223. – P. 53–61.
76. **Carocho, M.** A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives [Text] / M. Carocho, I.C. Ferreira // Food Chem. Toxicol. – 2013. – V. 51. – P. 15–25.
77. **Caverzan, A.** Plant responses to stresses : Role of ascorbate peroxidase in the antioxidant protection [Text] / A. Caverzan, G. Passaia, S.B. Rosa, C.W. Ribeiro, F. Lazzarotto // Genet Mol Biol. – 2012. – V. 4. – P. 1011–1019.

78. **Celik, A.** Engineering the active site of ascorbate peroxidase [Text] / A. Celik, P.M. Cullis, M.J. Sutcliffe, R. Sangar, E.L. Raven // *European Journal of Biochemistry* – 2001 – V.268 – P.78–85.
79. **Chakraborty, U.** High temperature-induced oxidative stress in *Lens culinaris*, role of antioxidants and amelioration of stress by chemical pre-treatments [Text] / U. Chakraborty, D. Pradhan // *J. Plant Interact.* – 2011. – V. 6. – P. 43–52.
80. **Chance, B.** Physical limitations to sensitivity in the recording of rapid enzyme reactions within living cells [Text] // *Trans. N. Y. Acad. Sci.* – 1954. – V. 16. – P. 250–261.
81. **Chance, B.** The properties of the enzyme-substrate compounds of horseredish peroxidase and lactoperoxidase [Text] // *Science.* – 1949. – V. 109. – P. 204–208.
82. **Chasov, A.V.** Activity of redox enzymes in the thallus of *Anthoceros natalensis* [Text] / A.V. Chasov, R.P. Beckett, F.V. Minibayeva // *Biochemistry (Moscow).* – 2015. – V. 80. – P. 1157–1168.
83. **Chauhan, V.** Comparative analysis of amino acid sequence diversity and physiochemical properties of peroxidase superfamily [Text] / V. Chauhan, V. Kumari, S.S. Kanwar // *J Protein Res Bioinform.* – 2020. – V. 2. – P. 003.
84. **Chen, C.** TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data [Text] / C. Chen, R. Xia, H. Chen, Y. He // *Mol Plant.* – 2020. – V. 13. – P. 1194–1202.
85. **Chen, G.X.** Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and the differences in their enzymatic and molecular properties [Text] / G.X. Chen, K. Asada // *Plant and Cell Physiology.* – 1989. – V. 30. – P. 987–998.
86. **Chen, K.H.** Differential gene expression associated with fungal trophic shifts along the senescence gradient of the moss *Dicranum scoparium* [Text] / K.H. Chen, H.L. Liao, J.P. Bellenger, F. Lutzoni // *Environ Microbiol.* – 2019. – V. 21. – P. 2273–2289.
87. **Chen, K.H.** RNA-based analyses reveal fungal communities structured by a senescence gradient in the moss *Dicranum scoparium* and the presence of putative multi-trophic fungi [Text] / K.H. Chen, H.L. Liao, A.E. Arnold, G. Bonito, F. Lutzoni // *New Phytol.* – 2018. – V. 218. – P. 1597–1611.
88. **Chen, S.X.** Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase [Text] / S.X. Chen, P. Schopfer // *European Journal of Biochemistry.* – 1999. – V. 260. – P.726–735.
89. **Chen, V.B.** MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography [Text] / V.B. Chen, W.B. Arendall, J.J. Headd, D.A. Keedy, R.M. Immormino, G.J. Kapral, L.W. Murray, J.S. Richardson, D.C. Richardson // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* – 2010. – V. 66. – P. 12–21.
90. **Chibbar, R.N.** Characterization of peroxidase in plant cells [Text] / R.N. Chibbar, R.B. Van Hyustee // *Plant Physiol.* – 1984. – V. 75. – P. 956–958.

91. **Chittoor, J.** Induction of peroxidase during defense against pathogens [Text] / J. Chittoor, J. Leach, F. White // in: Pathogenesis-Related Proteins in Plants. S. K. Datta and S. Muthukrishnan, eds. CRC Press, Boca Raton, FL, U.S.A.– 1999. – P. 171–193.
92. **Choudhury, S.** Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress [Text] / S. Choudhury, P. Panda, L. Sahoo, S.K. Panda // Plant Signal. Behav. – 2013. – 8:e23681.
93. **Choudhury, S.** Toxic effects, oxidative stress and ultrastructural changes in moss *Taxithelium nepalense* (Schwaegr.) Broth. under chromium and lead phytotoxicity [Text] / S. Choudhury, S.K. Panda // Water, Air, Soil Pollution – 2005. – V. 167. – P. 73–90.
94. **Chung, J.S.** Reactive oxygen species mediate Na<sup>+</sup> –induced SOS1 mRNA stability in Arabidopsis [Text] / J.S. Chung, J.K. Zhu, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, H. Shi // Plant J. – 2008. – V. 53. – P.554–565.
95. **Cosio, C.** An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation through its auxin oxidase activity [Text] / C. Cosio, L. Vuillemin, M. De Meyer, C. Kevers, C. Penel, C. Dunand // Planta. – 2009. – V. 229. – P. 823–836.
96. **Cosio, C.** Specific functions of individual class III peroxidase genes [Text] / C. Cosio, C. Dunand // J Exp Bot. – 2009. – V. 60. – P. 391–408.
97. **Costa, M.M.R.** Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidases involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* [Text] / M.M.R. Costa, F. Hilliou, P. Duarte, L.G. Pereira, I. Almeida, M. Leech, J. Memelink, A.R. Barcelo, M. Sottomayor // Plant Physiol. – 2008. – V. 146. – P. 403–417.
98. **Couée, I.** Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and response to oxidative stress in plants [Text] / I. Couée, C. Sulmon, G. Gouesbet, A. El Amrani // J Exp Bot. – 2006. – V. 57. – P. 449–459.
99. **Cove, D.** The moss *Physcomitrella patens* [Text] // Annu Rev Genet. – 2005. – V. 39. – P. 339–358.
100. **Cruz de Carvalho, R.** The impact of dehydration rate on the production and cellular location of reactive oxygen species in an aquatic moss [Text] / R. Cruz de Carvalho, M. Catala, J.M.D. Silva, C. Branquinho, E. Barreno // Ann Bot. – 2012. – V. 110. – P. 1007–1016.
101. **Dabrowska, G.** Characteristics of the plant ascorbate peroxidase family [Text] / G. Dabrowska, A. Kata, A. Goc, M. Szechynska-Hebda, E. Skrzypek // Acta Biol. – 2007. – V. 49. – P.7–17.
102. **Das, K.** Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants [Text] / K. Das, A. Roychoudhury // Frontiers in Environmental Science. – 2014. – V. 2. – P. 53.
103. **Dazy, M.** Induction of oxidative stress biomarkers associated with heavy metal stress in *Fontinalis antipyretica* Hedw [Text] / M. Dazy, J.F. Masfarau, J.F. Ferard // Chemosphere. – 2009. – V. 75. – P. 297–302.

104. **Degola, F.** A Cd/Fe/Zn responsive phytochelatin synthase is constitutively present in the ancient liverwort *Lunularia cruciata* (L.) Dumort [Text] / F. Degola, M. De Benedictis, A. Petraglia, A. Massimi, L. Fattorini, S. Sorbo, A. Basile, L.S. di Toppi // *Plant and Cell Physiology*. – 2014. – V. 55. – P. 1884–1891.
105. **Del Río, L.A.** Plant superoxide dismutases: Function under abiotic stress conditions [Text] / L.A. Del Río, F.J. Corpas, E. López-Huertas, J.M. Palma // In *Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants*; Gupta, D., Palma, J., Corpas, F., Eds.; Springer: Cham, Switzerland. – 2018. – P. 1–26.
106. **Devasagayam, T.P.A.** Methods for estimating lipid peroxidation: An analysis of merits and demerits [Text] / T.P.A. Devasagayam, K.K. Bloor, T. Ramasarma // *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* – 2003. – V. 40. – P. 300–308.
107. **Dey, A.** Antioxidative potential of bryophytes stress tolerance and commercial perspectives: a review [Text] / A. Dey, J.N. De // *Pharmacologia*. – 2012. – V.3. – P. 151–159.
108. **Dick, G.J.** Genomic insights into Mn(II) oxidation by the marine *alphaproteobacterium Aurantimonas* sp. strain SI85-9A1 [Text] / G.J. Dick, S. Podell, H.A. Johnson, Y. Rivera-Espinoza, R. Bernier-Latmani, J.K. McCarthy, J.W. Torpey, B.G. Clement, T. Gaasterland, B.M. Tebo // *Appl Environ Microbiol*. – 2008. – V. 74. – P. 2646–58.
109. **Dietrich, R.** Constitutive and induced resistance to pathogens in *Arabidopsis thaliana* depends on nitrogen supply [Text] / R. Dietrich, K. Ploss, M. Heil // *Plant, Cell and Environment*. – 2004. – V. 27. – P. 896–906.
110. **Dietz, K.J.** The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism [Text] / K.J. Dietz, S. Jacob, M.L. Oelze, M. Laxa, V. Tognetti, S.M.N. de Miranda, M. Baier, I. Finkemeier // *J Exp Bot*. – 2006. – V. 57. – P. 1697–1709.
111. **Dietz, K.J.** Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: Why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast? [Text] // *Mol Cells*. – 2016. – V. 39. – P. 20–25.
112. **Doke, N.** NADPH-dependent O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans* [Text] // *Physiol. Plant Pathol*. – 1985. – V. 27. – P. 311–317.
113. **Earnshaw, M.J.** Photosynthetic pathway, chilling tolerance and cell sap osmotic potential values of grasses along an altitudinal gradient in Papua New Guinea [Text] / M.J. Earnshaw, K.A. Carver, T.C. Gunn, K. Kerenga, V. Harvey, H. Griffiths, M.S.J. Broadmeadow // *Oecologia*. – 1990. – V. 84. – P. 280–288.
114. **El-Gebali, S.** The Pfam protein families database in 2019 [Text] / S. El-Gebali, J. Mistry, A. Bateman, S.R. Eddy, A. Luciani, S.C. Potter, M. Qureshi, L.J. Richardson, G.A. Salazar, A. Smart,

- E.L.L. Sonnhammer, L. Hirsh, L. Paladin, D. Piovesan, S.C.E. Tosatto, R.D. Finn // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – D427–D432.
115. **Elstner, E.F.** Formation of hydrogen peroxide by isolated cell walls from horseradish (*Armoracia lapathifolia Gilib*) [Text] / E.F. Elstner, A.L. Heupel // *Planta.* – 1976. – V. 130. – P. 175–180.
116. **Espellie, K.E.** Immunocytochemical localisation and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue [Text] / K.E. Espellie, V.R. Francheschi, P.E. Kollattukudy // *Plant Physiol.* – 1986. – V. 81. – P. 487–492.
117. **Espiñeira, J.M.** Distribution of lignin monomers and the evolution of lignification among lower plants [Text] / J.M. Espiñeira, E. Novo-Uzal, L.V. Gómez-Ros, J.S. Carrión, F. Merino, A. Ros Barceló, F. Pomar // *Plant Biol.* – 2011. – V. 13. – P. 59–68.
118. **Fini, A.** Isoprene responses and functions in plants challenged by environmental pressures associated to climate change [Text] / A. Fini, C. Brunetti, F. Loreto, M. Centritto, F. Ferrini, M. Tattini // *Front. Plant Sci.* – 2017. – V. 8. – P. 1281.
119. **Fischer, B.B.** SINGLET OXYGEN RESISTANT 1 links reactive electrophile signaling to singlet oxygen acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii* [Text] / B.B. Fischer, H.K. Ledford, S. Wakao, S.G. Huang, D. Casero, M. Pellegrini, S.S. Merchant, A. Koller, R.I.L. Eggen, K.K. Niyogi // *Proc Natl Acad Sci.* – 2012. – V. 109. – E1302–E1311.
120. **Flowers, T.J.** Salinity tolerance in halophytes [Text] / T.J. Flowers, T.D. Colmer // *New Phytol.* – 2008. – V. 179. – P. 945–963.
121. **Fotopoulos, V.** Involvement of AsA/DHA and GSH/GSSG ratios in gene and protein expression and in the activation of defense mechanisms under abiotic stress conditions [Text] / V. Fotopoulos, G. Tanou, V. Ziogas, A. Molassiotis // *In Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*; Anjum, N.A., Chan, M.T., Umar, S., Eds.; Springer: Dordrecht, the Netherlands. – 2010. – P. 265–302.
122. **Foyer, C.H.** Ascorbate and glutathione: The heart of the redox hub [Text] / C.H. Foyer, G. Noctor // *Plant Physiol.* – 2011. – V. 155 – P. 2–18.
123. **Foyer, C.H.** Reactive oxygen species, oxidative signaling and the regulation of photosynthesis [Text] // *Environ Exp Bot.* – 2018. – V. 154. – P. 134–142.
124. **Foyer, C.H.** Redox signaling in plants [Text] / C.H. Foyer, G. Noctor // *Antioxid. Redox Signal.* – 2013. – V.18. – P. 2087–2090.
125. **Francoz, E.** Roles of cell wall peroxidases in plant development [Text] / E. Francoz, P. Ranocha, H. Nguyen-Kim, E. Jamet, V. Burlat, C. Dunand // *Phytochemistry.* – 2015. – V.112. – P. 15–21.
126. **Frank, G.** Transcriptional profiling of maturing tomato (*Solanum lycopersicum* L.) microspores reveals the involvement of heat shock proteins, ROS scavengers, hormones, and sugars in the heat

- stress response [Text] / G. Frank, E. Pressman, R. Ophir, L. Althan, R. Shaked, M. Freedman, S. Shen, N. Firon // *J Exp Bot.* – 2009. – V. 60. – P. 3891–3908.
127. **Fryer, M.J.** Control of *Ascorbate Peroxidase 2* expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organization of *Arabidopsis* leaves [Text] / M.J. Fryer, L. Ball, K. Oxborough, S. Karpinski, P.M. Mullineaux, N.R. Baker // *Plant J.* – 2003. – V. 33. – P. 691–705.
128. **Gabaldón, C.** Cloning and molecular characterization of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans*, an enzyme involved in lignin biosynthesis [Text] / C. Gabaldón, M. López-Serrano, M.A. Pedreño, A. Ros Barceló // *Plant Physiol.* – 2005. – V. 139. – P. 1138–1154.
129. **Gadjev, I.** Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis* [Text] / I. Gadjev, S. Vanderauwera, T.S. Gechev, C. Laloi, I.N. Minkov, V. Shulaev, K. Apel, D. Inzé, R. Mittler, F. Van Breusegem // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – P. 436–445.
130. **Gao, B.** De novo transcriptome characterization and gene expression profiling of the desiccation tolerant moss *Bryum argenteum* following rehydration [Text] / B. Gao, D. Zhang, X. Li, H. Yang, Y. Zhang, A. Wood // *BMC Genomics.* – 2015. – V. 16. – P. 416.
131. **Gao, B.** Desiccation tolerance in bryophytes: the dehydration and rehydration transcriptomes in the desiccation-tolerant bryophyte *Bryum argenteum* [Text] / B. Gao, X. Li, D. Zhang, Y. Liang, H. Yang, M. Chen, Y. Zhang, J. Zhang, A. Wood // *Scientific Reports.* – 2017. – V. 7. – № 7571.
132. **Gasteiger, E.** The Proteomics Protocols Handbook [Text] / E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M.R. Wilkins, R.D. Appel, A. Bairoch // Humana Press, New York. – 2005. – P. 571–607.
133. **Gasulla, F.** Advances in understanding of desiccation tolerance of Lichens and lichen-forming Algae [Text] / F. Gasulla, E.M. del Campo, L.M. Casano, A. Guéra // *Plants.* – 2021. – V. 10 – P.807.
134. **Gay, C.** A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylene orange hydroperoxide assay [Text] / C. Gay, J.M. Gebicki // *Analytical Biochemistry.* – 2000. – V. 284. – P. 217–220.
135. **Gechev, T.** Systems biology of resurrection plants [Text] / T. Gechev, R. Lyall, V. Petrov, D. Bartels // *Cellular and Molecular Life Sciences.* – 2021. DOI: 10.1007/s00018-021-03913-8.
136. **Gechev, T.S.** Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death [Text] / T.S. Gechev, F. Van Breusegem, J.M. Stone, I. Denev, C. Laloi // *BioEssays.* – 2006. – V. 28. – P. 1091–1101.
137. **Geourjon, C.** SOPMA: Significant improvement in protein secondary structure prediction by consensus prediction from multiple alignments [Text] / C. Geourjon, G. Deléage // *Comput Appl Biosci.* – 1995. – V. 11. – P. 681–684.
138. **Gest, N.** Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? [Text] / N. Gest, H. Gautier, R. Stevens, // *J. Exp. Bot.* – 2013. – V. 64. – P. 33–53.

139. **Ghamsari, L.** The distinctive features of ascorbate peroxidase in dormant *Crocus sativus* L. corm [Text] / L Ghamsari, E. Keyhani // *Acta Horticulturae*. – 2004. – V. 650. – P. 119–125.
140. **Glime, J.M.** Temperature: Heat [Text] // In: Glime, J.M. *Bryophyte Ecology. Physiological Ecology*. – 2017. – V. 1. – P. 10–3.
141. **Gómez-Toribio, V.** Enhancing the production of hydroxyl radicals by *Pleurotus eryngii* via quinone redox cycling for pollutant removal [Text] / V. Gómez-Toribio, A.B. García-Martín, M.J. Martínez, Á.T. Martínez, F. Guillén // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2009. – V. 75. – P. 3954–3962.
142. **Graham, M. Y.** Rapid accumulation of anionic peroxidases and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma f. sp. glycinia* wall glucan [Text] / M. Y. Graham, T. Z. Graham // *Plant Physiol*. – 1991. – V. 91. – P. 1445–1455.
143. **Grenier, J.** Some pathogenesis-related proteins are chitosanases with lytic activity against fungal spores [Text] / J. Grenier, A. Asselin // *Molecular Plant–Microbe Interactions*. – 1990. – V. 3. – P. 401–407.
144. **Guo, F.X.** Relation of several antioxidant enzymes to rapid freezing resistance in suspension cultures cells from Alpine *Chorispora bungeana* [Text] / F.X. Guo, M.X. Zhang, Y. Chen, W.H. Zhang, S.J. Xu, J.H. Wang, L.Z. An // *Cryobiology*. – 2006. – V. 52. – P. 241–250.
145. **Gutteridge, J.M.C.** Ferrous-salt-promoted damage to deoxyribose and benzoate. The increased effectiveness of hydroxyl-radical scavengers in the presence of EDTA [Text] / J.M.C. Gutteridge // *Biochemical Journal*. – 1987. – V. 243. – P. 709–714.
146. **Haas, B.J.** De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis [Text] / B.J. Haas, A. Papanicolaou, M. Yassour, M. Grabherr, P.D. Blood, J. Bowden, M.B. Couger, D. Eccles, B. Li, M. Lieber, M.D. MacManes, M. Ott, J. Orvis, N. Pochet, F. Strozzi, N. Weeks, R. Westerman, T. William, C.N. Dewey, R. Henschel, R.D. LeDuc, N. Friedman, A. Regev // *Nat Protoc*. – 2013. – V. 8. – P. 1494–512.
147. **Hanson, D.T.** Evolutionary significance of isoprene emission from mosses [Text] / D.T. Hanson, S. Swanson, L.E. Graham, T.D. Sharkey // *Amer. J. Bot*. – 1999. – V. 86. – P. 634–639.
148. **Hasanuzzaman, M.** Physiological, biochemical, and molecular mechanisms of heat stress tolerance in plants [Text] / M. Hasanuzzaman, K. Nahar, M.M. Alam, R. Roychowdhury, M. Fujita // *Int. J. Mol. Sci*. – 2013. – V. 14. – P. 9643–9684.
149. **Hasanuzzaman, M.** Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: Revisiting the crucial role of a universal defense regulator [Text] / M. Hasanuzzaman, M.H.M.B. Bhuyan, F. Zulfiqar, A. Raza, S.M. Mohsin, J.A. Mahmud, M. Fujita, V. Fotopoulos // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – V. 9. – P. 681.

150. **Hasanuzzaman, M.** Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress [Text] / M. Hasanuzzaman, M. Bhuyan, T.I. Anee, K. Parvin, K. Nahar, J.A. Mahmud, M. Fujita // *Antioxidants*. – 2019. – V. 8. – P. 384.
151. **Hasegawa, P.M.** Plant cellular and molecular responses to high salinity [Text] / P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, J.K. Zhu, H.J. Bohnert // *Annu Rev Plant Biol*. – 2000. – V. 51. – P. 463–499.
152. **Havaux, M.** Carotenoid oxidation products as stress signals in plants [Text] // *Plant*. – 2014. – V. 79. – P. 597–606.
153. **Hemsley, P.A.** A proteomic approach identifies many novel palmitoylated proteins in *Arabidopsis* [Text] / P.A. Hemsley, T. Weimar, K.S. Lilley, P. Dupree, C.S. Grierson // *New Phytol*. – 2013. – V. 197. – P. 805–814.
154. **Henrissat, B.** Structural homology among the peroxidase enzyme family revealed by hydrophobic cluster analysis [Text] / B. Henrissat, M. Saloheimo, S. Lavaitte, J.K. Knowles // *Proteins*. – 1990. – V. 8. – P. 215–217.
155. **Hiraga, S.** A large family of class III plant peroxidases [Text] / S. Hiraga, K. Sasaki, H. Ito // *Plant Cell Physiol*. – 2001. – V. 42. – P. 462–468.
156. **Hirata, T.** A 37-kDa peroxidase secreted from liverworts in response to chemical stress [Text] / T. Hirata, Y. Ashida, H. Mori, D. Yoshinaga, L.J Goad // *Phytochemistry*. – 2000. – V. 55. – P. 197–202.
157. **Hu, C.** Role of carbohydrate moieties in peanut peroxidases [Text] / C. Hu, R.B. van Huystee // *Biochem J*. – 1989. – V. 263. – P. 129–135.
158. **Hu, R.** Dehydration-responsive features of *Atrichum undulatum* [Text] / R. Hu, L. Xiao, F. Bao, X. Li, Y. He // *J. Plant. Res*. – 2016. – V. 129. – P. 945–954.
159. **Hussain, H.A.** Chilling and drought Stresses in crop plants: Implications, cross talk, and potential management opportunities [Text] / H.A. Hussain, S. Hussain, A. Khaliq, U. Ashraf, S.A. Anjum, S. Men, L. Wang // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – V. 9. – P. 393.
160. **Intapruk, C.** Nucleotide sequence of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana* [Text] / C. Intapruk, N. Higashima // *Gene*. – 1991. – V. 98. – P. 237–241.
161. **Ishida, A.** Cell wall-associated peroxidase in cultured cells of liverwort, *Marchantia polymorpha* L. changes of peroxidase level and its localization in the cell wall [Text] / A. Ishida, K. Ono, T. Matsusaka // *Plant Cell Reports*. – 1985. – V. 4. – P. 54–57.
162. **Ishida, A.** Formation of hydrogen peroxide by NAD(P)H oxidation with isolated cell wall-associated peroxidase from cultured liverwort cells, *Marchantia polymorpha* L [Text] / A. Ishida, K. Ookubo, K. Ono // *Plant Cell Physiol*. – 1987. – V. 28. – P. 723–726.

163. **Ishikawa, T.** cDNAs encoding spinach stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidase, differing in the presence or absence of their 3'-coding regions [Text] / T. Ishikawa, K. Sakai, K. Yoshimura, T. Takeda, S. Shigeoka // *FEBS Letters* – 1996a. – V.384. – P. 289–293.
164. **Ishikawa, T.** Molecular characterization and physiological role of a glyoxysome-bound ascorbate peroxidase from spinach [Text] / T. Ishikawa, K. Yoshimura, K. Sakai, M. Tamoi, T. Takeda, S. Shigeoka // *Plant Cell Physiol.* – 1998. – V. 139. – P. 23–34.
165. **Ishikawa, T.** Purification and characterization of cytosolic ascorbate peroxidase from komatsuna (*Brassica rapa*) [Text] / T. Ishikawa, T. Takeda, S. Shigeoka // *Plant Science.* – 1996b. – V. 120. – P. 11–18.
166. **Janků, M.** On the origin and fate of reactive oxygen species in plant cell compartments [Text] / M. Janků, L. Luhová, M. Petřivalský // *Antioxidants (Basel).* – 2019. – V. 8. – P. 105.
167. **Jayaraman, D.** Staying in touch: mechanical signals in plant-microbe interactions [Text] / Jayaraman D, Gilroy S, Ané JM // *Curr Opin Plant Biol.* – 2014. – V. 20. – P. 104–109.
168. **Jeevan Kumar, S.** Seed birth to death: dual functions of reactive oxygen species in seed physiology [Text] / S. Jeevan Kumar, S. Rajendra Prasad, R. Banerjee, C. Thammineni // *Ann. Bot.* – 2015. – V. 116. – P. 663–668.
169. **Jespersen, H.M.** From sequence analysis of three novel ascorbate peroxidases from *Arabidopsis thaliana* to structure, function and evolution of seven types of ascorbate peroxidase [Text] / H.M. Jespersen, K.J. Aersgaard Ivh, L. Ostergaard, K.G. Welinder // *Biochem J.* – 1997. – V. 326. – P. 305–310.
170. **Jia, J.** A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network [Text] / J. Jia, B. Wong, A. Wu, G. Cheng, Z. Li, S. Dong // *Analytical Chemistry.* – 2002. – V. 74. – P. 2217–2223.
171. **Jiang, M.** Involvement of plasma-membrane NADPH oxidase in abscisic acid- and water stress-induced antioxidant defense in leaves of maize seedlings [Text] / M. Jiang, J. Zhang // *Planta.* – 2002a. – V. 215. – P. 1022–1030.
172. **Jiang, M.** Water stress-induced abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves [Text] / Jiang M, Zhang J // *J Exp Bot.* – 2002b. – V. 53. – P. 2401–2410.
173. **Jiang, X.** Physiological and biochemical responses to low temperature stress in hybrid clones of *Populususs uriensis* Kom.× *P. deltoides* Bartr. [Text] / X. Jiang, Y. Song, X. Xi, B. Guo, K. Ma, Z. Wang, B. Li, D. Zhang, X. An, Z. Zhang // *African J. Biotech.* – 2011. – V. 10. – P. 19011–19024.
174. **Johansson, A.** cDNA, amino acid and carbohydrate sequence of barley seed-specific peroxidase BP1 [Text] / A. Johansson, S. Rasmusse, J. Harthill // *Plant Mol.* – 1992. – V. 18. – P. 1151–1161.

175. **Jovanović, S.V.** Class III peroxidases: functions, localization and redox regulation of isoenzymes. In: Gupta D, Palma J, Corpas F (eds) Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants [Text] / S.V. Jovanović, B. Kukavica, M. Vidović, F. Morina, L. Menckhoff // Springer, Cham. – 2018. – P. 269–300.
176. **Karimzadeh, G.** Soluble proteins induced by low temperature treatment in the leaves of spring and winter wheat cultivars [Text] / G. Karimzadeh, G.R. Sharifi-Sirchi, M. Jalali-Javaran, H. Dehghani, D. Francis // Pakistan Journal of Botany. – 2006. – V. 38. – P. 1015–1026.
177. **Kaushal, N.** Food crops face rising temperatures: An overview of responses, adaptive mechanisms, and approaches to improve heat tolerance [Text] / N. Kaushal, K. Bhandari, K.H.M. Siddique, H. Nayyar // Cogent Food & Agriculture. – 2016. – V. 2. – 1134380.
178. **Kavitha, C.N.** Modulating role for antioxidant system in desiccation tolerance of *Dicranopteris linearis* [Text] / C.H. Kavitha, K. Murugan // Indian J.Sci.Res. – 2017. – V. 15. – P. 1–12.
179. **Kawano, T.** Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco cell suspension culture [Text] / T. Kawano, S. Muto // Journal of Experimental Botany. – 2000. – V. 51. – P. 685–693.
180. **Khanna-Chopra, R.** Acclimation to drought stress generates oxidative stress tolerance in drought-resistant than – susceptible wheat cultivar under field conditions [Text] / Khanna-Chopra R, Selote DS // Environ Exp Bot. – 2007. – V. 60. – P. 276–283.
181. **Kliebenstein, D.** Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization [Text] / D. Kliebenstein, R. Monde, R. Last // Plant Physiol. – 1998. – V. 118. – P. 637–650.
182. **Kobayashi, S.** An evidence of the peroxidase-dependent oxygen transfer from hydrogen peroxide to sulfides [Text] / S. Kobayashi, M. Nakano, T. Goto // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1986. – V. 135. – P. 166–171.
183. **Köller, G.** Peroxidative degradation of selected PCB: A mechanistic study [Text] / G. Köller, M. Möeder, K. Czihal // Chemosphere. – 2000. – V. 41. – P. 1827–1834.
184. **König, J.** Mechanisms and dynamics in the thiol/disulfide redox regulatory network: transmitters, sensors and targets [Text] / J. König, M. Muthuramalingam, K.J. Dietz // Curr. Opin. Plant Biol. – 2012. – V. 15. – P. 261–268.
185. **Kosuge, T.** The role of phenolics in host response to infection [Text] // Ann. Rev. Phytopathol. – 1969. – V. 7. – P. 195–201.
186. **Kovtun, Y.** Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants [Text] / Y. Kovtun, W.L. Chiu, G. Tena, J. Sheen // Proc Natl Acad Sci. – 2000. – V. 97. – P. 2940–2945.

187. **Koz, B.** Lead adsorption capacity of some moss species used for heavy metal analysis [Text] / B. Koz, U. Cevik // *Ecological Indicators* – 2014. – V. 36. – P. 491–494.
188. **Krishnan, R.** In vitro anticancer properties of flavonoids extracted from cell suspension culture of *Marchantia linearis* Lehm & Lindenb. (bryophyta) against sw480 colon cancer cell lines [Text] / R. Krishnan, K. Murugan // *Indo Am. J. Pharm. Res.* – 2013b. – V. 3. – P. 1427–1437.
189. **Krishnan, R.** Polyphenols from *Marchantia polymorpha* L. a bryophyta: a potential source as antioxidants [Text] / R. Krishnan, K. Murugan // *World J. Pharm. Pharm. Sci.* – 2013a. – V. 2. – P. 5182–5198.
190. **Kristensen, B.** Barley coleoptile peroxidases. Purification molecular cloning and induction by pathogens [Text] / B. Kristensen, H. Bloch, S. Rasmussen // *Plant Physiol.* – 1999. – V. 120. – P. 427–437.
191. **Krzyszowska, M.** Pb induces plant cell wall modifications – in particular – the increase of pectins able to bind metal ions level [Text] / M. Krzyszowska, I. Rabeda, M. Lewandowski, S. Samardakiewicz, A. Basinska, A. Napieralska, E.J. Mellerowicz, A. Woznyl // *E3S Web of Conferences* 1 – 2013. – № 26008.
192. **Kumar, R.R.** Differential expression of heat shock protein and alteration in osmolyte accumulation under heat stress in wheat [Text] / R.R. Kumar, S. Goswami, S.K. Sharma, K. Singh, K.A. Gadpayle, S.D. Singh, H. Pathak, R.D. Rai // *J Plant Biochem Biotechnol.* – 2013. – V. 22. – P. 16–26.
193. **Kumar, S.** MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms [Text] / S. Kumar, G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, K. Tamura // *Mol Biol Evol.* – 2018. – V. 35. – P. 1547–1549.
194. **Kurusu, T.** Plant signaling networks involving Ca<sup>2+</sup> and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress [Text] / T. Kurusu, K. Kuchitsu, Y. Tada // *Front Plant Sci.* – 2015. – V. 6. – P. 427.
195. **Labeeuw, L.** Ancient origin of the biosynthesis of lignin precursors [Text] / L. Labeeuw, P.T. Martone, Y. Boucher, R.J. Case // *Biol. Direct.* – 2015. – V. 10. – P. 23.
196. **Laemmli, U.K.** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4 [Text] // *Nature.* – 1970. – V. 227. – P. 680–685.
197. **Lagrimini, L.M.** Characterization of antisense transformed plants deficient in the tobacco anionic peroxidase [Text] / L.M Lagrimini, V. Gingas, F. Finger, S. Rothstein, T.T.Y. Liu // *Plant Physiol.* – 1997. – V. 114. – P. 1187–1196.
198. **Laloi, C.** Key players of singlet oxygen-induced cell death in plants [Text] / C. Laloi, M. Havaux // *Front Plant Sci.* – 2015. – V. 6. – P. 39.

199. **Laloue, H.** Identification of ascorbate and guaiacol peroxidase in needle chloroplasts of spruce trees [Text] / H. Laloue, F. Weber-Lofti, A. Lucau-Danila, P. Guillemaut // *Plant Physiol Biochem.* – 1997. – V. 35. – P. 341–346.
200. **Landrein, B.** Mechanical stress contributes to the expression of the STM homeobox gene in Arabidopsis shoot meristems [Text] / B. Landrein, A. Kiss, M. Sassi, A. Chauvet, P. Das, M. Cortizo, P. Laufs, S. Takeda, M. Aida, J. Traas, T. Vernoux, A. Boudaoud, O. Hamant // *Elife.* – 2015. – 4:e07811.
201. **Lange, O.L.** Untersuchungen über die Hitzeresistenz der Moose in Beziehung zu ihrer Verbreitung. 1. Die Resistenz stark ausgetrockneter Moose [Text] // *Flora, Jena.* – 1955. – V. 142. – P. 381–399.
202. **Lariguet, P.** Identification of a hydrogen peroxide signaling pathway in the control of light-dependent germination in Arabidopsis [Text] / P. Lariguet, P. Ranocha, M. De Meyer, O. Barbier, C. Penel, C. Dunand // *Planta.* – 2013. – V. 238. – P. 381 – 395.
203. **Laxa, M.** The role of the plant antioxidant system in drought tolerance [Text] / M. Laxa, M. Liebthal, W. Telman, K. Chibani, K.J. Dietz // *Antioxidants.* – 2019. – V. 8. – P. 94.
204. **Lee, Y.P.** Enhanced tolerance to oxidative stress in transgenic tobacco plants expressing three antioxidant enzymes in chloroplasts [Text] / Y.P Lee, S.H Kim, J.W. Bang, H.S. Lee, S.S. Kwak, S.Y. Kwon // *Plant Cell Rep.* – 2007. – V. 26. – P. 591–598.
205. **Lehtonen, M.T.** Involvement of a class III peroxidase and the mitochondrial protein TSPO in oxidative burst upon treatment of moss plants with a fungal elicitor [Text] / M.T. Lehtonen, M. Akita, W. Frank, R. Reski, J.P. Valkonen // *Molecular Plant-Microbe Interactions* – 2012. – V. 25. – P. 363–371.
206. **Lehtonen, M.T.** Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders [Text] / Lehtonen, M. Akita, N. Kalkkinen, E. Ahola-Iivarinen, G. Rönholm, P. Somervuo, M. Thelander, J.P.T Valkonen // *The New Phytologist.* – 2009. – V. 183. – P.432–443.
207. **Leinonen, R.** International nucleotide sequence database collaboration. The sequence read archive [Text] / R. Leinonen, H. Sugawara, M. Shumway // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – D19–21.
208. **Leshem, Y.** Induction of phosphatidylinositol 3-kinase-mediated endocytosis by salt stress leads to intracellular production of reactive oxygen species and salt tolerance [Text] / Y. Leshem, L. Seri, A. Levine // *Plant J.* – 2007. – V. 51. – P. 185–197.
209. **Leshem, Y.Y.** Plant senescence processes and free radical [Text] // *Free Rad. Biol. Med.* – 1988. – V. 5. – P. 39–49.
210. **Levitt, J.** Responses of plants to environmental stresses [Text] / J. Levitt, T.T. Kozlowski // *The Quarterly Review of Biology.* – 1981. – V. 56. – P. 480–481.

211. **Li, J.L.** Cell wall peroxidases in the liverwort *Dumortiera hirsuta* are responsible for extracellular superoxide production, and can display tyrosinase activity [Text] / J.L. Li, M. Sulaiman, R.P. Beckett, F.V Minibayeva // *Physiol. Plant.* – 2010. – V. 138. – P. 474–484.
212. **Liao, G.** Identification and expression profiling analysis of ascorbate peroxidase gene family in *Actinidia chinensis* (Hongyang) [Text] / G. Liao, Q. Liu, Y. Li, M. Zhong, C. Huang, D. Jia, X. Xu // *Journal of Plant Research.* – 2020. – V. 133. – P. 715–726.
213. **Liebthal, M.** The fundamental role of reactive oxygen species in plant stress response [Text] / Liebthal M, Dietz KJ // *Methods Mol Biol.* – 2017. – V. 1631. – P. 23–39.
214. **Liers, C.** Oxidoreductases from lichenized ascomycetes: purification and characterization of a heme-peroxidase from *Leptogium saturninum* that oxidizes high-redox potential substrates [Text] / C. Liers, C. Ullrich, M. Hofrichter, F.V. Minibayeva, R.P. Beckett // *Fungal Genet. Biol.* – 2011. – V. 48. – P. 1139–1145.
215. **Lin, K.H.** Cloning, expression and physiological analysis of broccoli catalase gene and Chinese cabbage ascorbate peroxidase gene under heat stress [Text] / K.H. Lin, H.C. Huang, C.Y. Lin // *Plant Cell Rep.* – 2010. – V. 29. – P. 575–593.
216. **Liszkay, A.** Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth [Text] / A. Liszkay, B. Kenk, P. Schopfer // *Planta.* – 2003. – V. 217. – P. 658–667.
217. **Little, P.** Biological monitoring of heavy metal pollution [Text] / P. Little, M.H. Martin // *Environmental Pollution.* – 1974. – V. 6. – P. 1–19.
218. **Liu, F.** A Novel L-ascorbate peroxidase 6 Gene, ScAPX6, Plays an important role in the regulation of response to biotic and abiotic stresses in Sugarcane [Text] / F. Liu, N. Huang, L. Wang, H. Ling, T. Sun, W. Ahmad, K. Muhammad, J. Guo, L. Xu, S. Gao, Y. Que, Y. Su // *Frontiers in Plant Science.* – 2018. – V. 8: 2262.
219. **Liu, Y.** Genomewide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in maize (*Zea mays*) [Text] / Y. Liu, H.Y. Jiang, W. Chen, Y. Qian, Q. Ma, B. Cheng // *Plant Growth Regul.* – 2011. – V. 63. – P. 225–234.
220. **Liu, Y.** The changes in membrane permeability of mosses under high temperature stress [Text] / Y. Liu, T. Cao, J.M. Glime // *Bryologist.* – 2003. – V. 106. – P. 53–60.
221. **Locato, V.** Strategies to increase vitamin C in plants: from plant defense perspective to food biofortification [Text] / V. Locato, S. Cimini, L.D. Gara // *Front. Plant Sci.* – 2013. – V. 4. – P. 152.
222. **López-Huertas, E.** Characterization of membrane polypeptides from pea leaf peroxisomes involved in superoxide radical generation [Text] / E. López-Huertas, F.J Corpas, L.M. Sandalio, L.A. Del Río // *Biochem J.* – 1999. – V. 337. – P. 531–536.

223. **Lowrenco, E.H.** Heat inactivation and kinetics of polyphenol oxidase from palmito (*Euterpe edulis*) [Text] / E.H. Lowrenco, J.D.H. Leao, V.A. Neves // J. Sci. Food and Agri. – 1990. – V. 52. – P. 249–260.
224. **Lu, Z.** Two rice cytosolic ascorbate peroxidases differentially improve salt tolerance in transgenic Arabidopsis [Text] / Z. Lu, D. Liu, S. Liu // Plant Cell Rep. – 2007. – V. 26. – P. 1909–1917.
225. **Lubaina, A.S.** Induction of oxidative stress and antioxidative response mechanisms in *Octoblepharum Albidum Hedw.* a bryophyte under desiccation – rehydration Stress [Text] / A.S. Lubaina, V.G. Meenu Krishnan, K. Murugan // Indian Journal of Plant Sciences. – 2013. – V. 2. – P.12–22.
226. **Lüthje, S.** Membrane-Bound Class III Peroxidases: Unexpected Enzymes with Exciting Functions [Text] / S. Lüthje, T. Martinez-Cortes // Int J Mol Sci. – 2018. – V. 19. – P. 2876.
227. **Ma, L.B.** cDNA cloning and sequence characterization of an ascorbate eroxidase from marine red alga *Porphyra yezoensis* [Text] / L.B. Ma, F.Y. Zhang, C.Y. Ma, S.J Wang // Journal of Fishery Sciences of China. – 2005. – V. 12. – P. 281–287.
228. **Macdonald, I.K.** Interaction of ascorbate peroxidase with substrates: a mechanistic and structural analysis [Text] / I.K. Macdonald, S.K. Badyal, L. Ghamsari, P.C. Moody, E.L. Raven // Biochemistry. – 2006. – V. 45. – P. 7808–17.
229. **Madhusudhan, R.** Characterization of an ascorbate peroxidase in plastids of tobacco BY–2 cells [Text] / R. Madhusudhan, T. Ishikawa, Y. Sawa, S. Shigeoka, H. Shibata // Physiol Plant. – 2003. – V. 117. – P. 550–557.
230. **Maehly, A. C.** Splitting of horseradish peroxidase into prosthetic group and protein as a means of studying the linkages between hemin and protein [Text] // Biochim. et biophys. acta. – 1952. – V. 8. – P. 1–8.
231. **Maksimov, I.V.** Structural-functional features of plant isoperoxidases [Text] / I.V. Maksimov, E.A. Cherepanova, G.F. Burkhanova, A.V. Sorokan', O.I. Kuzmina // Biochemistry (Mosc). – 2011. – V. 76. – P. 609–21.
232. **Marcelino, A.M.** Roles of beta-turns in protein folding: from peptide models to protein engineering [Text] / A.M. Marcelino, L.M. Gierasch // Biopolymers. – 2008. – V. 89. – P. 380–91.
233. **Marchler-Bauer, A.** CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures [Text] / A. Marchler-Bauer, Y. Bo, L. Han, J. He, C.J. Lanczycki, S. Lu, F. Chitsaz, M.K. Derbyshire, R.C. Geer, N.R. Gonzales, M. Gwadz, D.I. Hurwitz, F. Lu, G.H. Marchler, J.S. Song, N. Thanki, Z. Wang, R.A. Yamashita, D. Zhang, C. Zheng, L.Y. Geer, S.H. Bryant // Nucleic Acids Res. – 2017. – V. 45. – D200–D203.

234. **Marcum, K.B.** Cell membrane thermostability and whole-plant heat tolerance of Kentucky bluegrass [Text] // Crop Science. – 1998. – V. 38. – P. 1214–1218.
235. **Marjamaa, K.** The role of xylem class III peroxidases in lignification [Text] / K. Marjamaa, E. M. Kukkola, K. V. Fagerstedt // Journal of Experimental Botany. – 2009. – V. 60. – P. 367–376.
236. **Martínez-Cortés, T.** Evolutionary implications of a peroxidase with high affinity for Cinnamyl alcohols from *Physcomitrium patens*, a non-vascular plant [Text] / T. Martínez-Cortés, F. Pomar, E. Novo-Uzal // Plants. – 2021. – V. 10. – P. 1476.
237. **Martone, P.T.** Discovery of lignin in seaweed reveals convergent evolution of cell-wall architecture [Text] / P.T. Martone, J.M. Estevez, F. Lu, K. Ruel, M.W. Denny, C. Somerville, J. Ralph // Curr. Biol. – 2009. – V. 19. – P. 169–175.
238. **Maruta, T.** Ascorbate Peroxidase Functions in Higher Plants: The Control of the Balance Between Oxidative Damage and Signaling [Text] / T. Maruta, T. Ishikawa // in: Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J. (Eds.), Antioxidants and Antioxidant Enzymes in Higher Plants. Springer International Publishing, Cham. – 2018. – P. 41–59.
239. **Matsui, T.** Vesicular transport route of horseradish Cl<sub>a</sub> peroxidase is regulated by N- and C-terminal pro-peptides in tobacco cells [Text] / T. Matsui, H. Nakayam, K. Yoshid // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2003. – V. 62. – P. 517–522.
240. **Matysik, J.** Molecular mechanism of quenching of reactive oxygen species by proline under stress in plant [Text] / J. Matysik, B. Alia, B. Bhalu, P. Mohanty // Curr.Sci. – 2002. – V. 82. – P. 525–532.
241. **Mayaba, N.** An oxidative burst of hydrogen peroxide during rehydration following desiccation in the moss *Atrichum androgynum* [Text] / N. Mayaba, F. Minibayeva, R.P. Beckett // The New Phytologist. – 2002. – V. 155. – P.275–283.
242. **McDougall, G.J.** Cell wall-associated peroxidases and lignifications during growth of flax fibers [Text]//J. Plant Physiol. – 1991. – V. 139. – P. 25–32.
243. **McDougall, G.J.** Changes in cell wall-associated peroxidases during the lignification of flax fibers [Text] // Phytochemistry. – 1992. – V. 31. – P. 7–12.
244. **McKersie, B.** The role of oxygen free radicals in mediating freezing and desiccation stress in plants [Text] // American Society of Plant Physiologists Series. Rockville, Maryland. In: Pell, E. and Staffen, K. (eds), Active oxygen and oxidative stress and plant metabolism. Current Topics in Plant Physiology. – 1991. – V. 8. – P. 107–118.
245. **Mei, W.** Cotton GhPOX1 encoding plant class III peroxidase may be responsible for the high level of reactive oxygen species production that is related to cotton fiber elongation [Text] / W. Mei, Y. Qin, W. Song, J. Li, Y. Zhu // J. Genet. Genomics. – 2009. – V. 36. – P. 141–150.

246. **Melon, J.E.** Purification and characterization of isoperoxidases elicited by *Aspergillus flavus* in cotton ovule cultures [Text] // *Plant Physiol.* – 1991. – V. 95. – P. 14–20.
247. **Mika, A.** Membrane-bound class III peroxidases: identification, biochemical properties and sequence analysis of isoenzymes purified from maize (*Zea mays* L.) roots [Text] / A. Mika, F. Buck, S. Lüthje // *J Proteomics.* – 2008. – V. 71. – P. 412–424.
248. **Mika, A.** Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygen species [Text] / A. Mika, F. Minibayeva, R. Beckett, S. Lüthje // *Phytochemistry Reviews.* – 2004. – V. 3. – P. 173–193.
249. **Mikko, T.L.** Quickly-released peroxidase of moss in defense against fungal invaders [Text] / T.L. Mikko, A. Motomu, K. Nisse, A. Elina, R. Gunilla, S. Panu, T. Mattias, P.T. Jari // *New Phytologist.* – 2009. – V. 183. – P. 432–443.
250. **Minami, A.** Abscisic acid-induced freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* is accompanied by increased expression of stress-related genes [Text] / A. Minami, M. Nagao, K. Arakawa, S. Fujikawa, D. Takezawa // *Journal of Plant Physiology.* – 2003. – V. 160. – P. 475–483.
251. **Minibayeva, F.** High rates of extracellular superoxide production in bryophytes and lichens, and an oxidative burst in response to rehydration following desiccation [Text] / Minibayeva F, Beckett RP // *New Phytologist.* – 2001. – V. 152. – P. 333–343.
252. **Minibayeva, F.** Wound-induced apoplastic peroxidases activities: their roles in the production and detoxification of reactive oxygen species [Text] / F. Minibayeva, O. Kolesnikov, A. Chasov, R.P. Beckett, S. Lüthje, N. Vylegzhanina, F. Buck, M. Böttger // *Plant Cell Environ.* – 2009. – V. 32. – P. 497–508.
253. **Mitchell, A.L.** InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations [Text] / A.L. Mitchell, T.K. Attwood, P.C. Babbitt, M. Blum, P. Bork, A. Bridge, S.D. Brown, H.Y. Chang, S. El-Gebali, M.I. Fraser, J. Gough, D.R. Haft, H. Huang, I. Letunic, R. Lopez, A. Luciani, F. Madeira, A. Marchler-Bauer, H. Mi, D.A. Natale, M. Necci, G. Nuka, C. Orengo, A.P. Pandurangan, T. Paysan-Lafosse, S. Pesseat, S.C. Potter, M.A. Qureshi, N.D. Rawlings, N. Redaschi, L.J. Richardson, C. Rivoire, G.A. Salazar, A. Sangrador-Vegas, C.J.A. Sigrist, I. Sillitoe, G.G. Sutton, N. Thanki, P.D. Thomas, S.C.E. Tosatto, S.Y. Yong, R.D. Finn // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 27. – D351–D360.
254. **Mittler, R.** Molecular cloning and characterization of a gene encoding pea cytosolic ascorbate peroxidase [Text] / R. Mittler, B.A. Zilinskas // *Journal of Biological Chemistry.* – 1992. – V. 267. – P. 21802–21807.
255. **Mittler, R.** Purification and characterization of pea cytosolic ascorbate peroxidase [Text] / R. Mittler, B.A. Zilinskas // *Plant Physiology.* – 1991. – V. 97. – P. 962–968.

256. **Mittler, R.** Reactive oxygen gene network of plants [Text] / R. Mittler, S. Vanderauwera, M. Gollery, F. Van Breusegem // Trends in Plant Science. – 2004. – V. 9. – P. 490–498.
257. **Mittler, R.** ROS are good [Text] // Trends Plant Sci. – 2017. – V. 22. – P. 11–19.
258. **Mittler, R.** ROS signaling: The new wave? [Text] / R. Mittler, S. Vanderauwera, N. Suzuki, G. Miller, V.B. Tognetti, K. Vandepoele, M. Gollery, V. Shulaev, F. Van Breusegem // Trends Plant Sci. – 2011. – V. 16. – P. 300–309.
259. **Mittova, V.** Salinity upregulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii* [Text] / V. Mittova, M. Guy, M. Tal, M. Volokita // Journal of Experimental Botany – 2004. – V. 55. – P. 1105–1113.
260. **Miyake, C.** Purification and molecular properties of thylakoid-bound ascorbate peroxidase from spinach chloroplasts [Text] / C. Miyake, W.H. Cao, K. Asada // Plant Cell Physiol. – 1993. – V. 343. – P. 881–889.
261. **Mizobutsi, G.P.** Effect of pH and temperature on peroxidase and polyphenoloxidase activities of litchi pericarp [Text] / G.P. Mizobutsi, F.L. Finger, R.A. Ribeiro, R. Puschmann, L.L. Neves, W.F. Mota // Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). – 2010. – V. 67. – P. 213–217.
262. **Montenegro, G.** Biological properties of the Chilean native moss *Sphagnum magellanicum* [Text] / G. Montenegro, M.C. Portaluppi, F.A. Salas, M.F. Díaz // Biol. Res. – 2009. – V. 42. – P. 233–237.
263. **Moon, H.** NDP kinase 2 interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants [Text] / H. Moon, B. Lee, G. Choi, D. Shin, D.T. Prasad, O. Lee, S.S. Kwak, D.H. Kim, J. Nam, J. Bahk, J.C. Hong, S.Y. Lee, M.J. Cho, C.O. Lim, D.J. Yun // Proc Natl Acad Sci. – 2003. – V. 100. – P. 358–363.
264. **Morimoto, R.I.** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators [Text] // Genes Dev. – 1998. – V. 12. – P. 3788–3796.
265. **Mujer, C.V.** Coconut peroxidase isoenzymes: isolation, partial purification and physicochemical properties [Text] / C.V. Mujer, E.M.T. Mendoza, D.A. Ramirez // Phytochemistry. – 1983. – V. 22. – P. 1335–1340.
266. **Nagao, M.** Accumulation of theanderose in association with development of freezing tolerance in the moss *Physcomitrella patens* [Text] / M. Nagao, K. Oku, A. Minami, K. Mizuno, M. Sakurai, K. Arakawa, S. Fujikawa, D. Takezawa // Phytochemistry. – 2006. – V. 67. – P. 702–709.
267. **Narendra, S.** The Arabidopsis ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for Arabidopsis growth and development [Text] / S. Narendra, S. Venkataramani, G.X. Shen, J. Wang, V. Pasapula, Y. Lin, D. Korniyev, A.S. Holaday, H. Zhang // Journal of Experimental Botany. – 2006. – V. 57. – P. 3033–3042.

268. **Nath, M.** Microbe-mediated enhancement of nitrogen and phosphorus content for crop improvement [Text] / M. Nath, D. Bhatt, M.D. Bhatt, R. Prasad, N. Tuteja // In Crop Improvement through Microbial Biotechnology; Prasad, R., Gill, S.S., Tuteja, N., Eds.; Academic Press: Cambridge, UK. – 2018. – P. 291–301.
269. **Neill, S.J.** Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants [Text] / S.J. Neill, R. Desikan, A. Clarke // J. Exp. Bot. – 2002. – V. 53. – P. 1237–1247.
270. **Newman, T.** Genes galore: A summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous Arabidopsis cDNA clones [Text] / T. Newman, F.J. De Bruijn, P. Green, K. Keegstra, H. Kende, L. McIntosh, J. Ohlrogge, N. Raikhel, S. Somerville, M. Thomashow // Plant Physiol. – 1994. – V. 106. – P. 1241–1255.
271. **Nickrent, D.L.** Multigene phylogeny of land plants with special reference to bryophytes and the earliest land plants [Text] / D.L. Nickrent, C.L. Parkinson, J.D. Palmer, R.J. Duff // Molecular Biology and Evolution. – 2000. – V. 17. – P. 1885–1895.
272. **Nishikawa, F.** Ascorbate metabolism in harvested broccoli [Text] / F. Nishikawa, M. Kato, H. Hyodo, Y. Ikoma, M. Sugiura, M. Yano // Journal of Experimental Botany. – 2003. – V. 54. – P. 2439–2448.
273. **Niyogi, K.K.** Photoprotection revised: genetic and molecular approaches [Text] // Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. – 1999. – V. 50. – P. 23–27.
274. **Noctor, G.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control [Text] / G. Noctor, C.H. Foyer // Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. – 1998. – V. 49. – P. 249–279.
275. **Norr, M.** Hitzeresistenz bei Moosen [Text] // Flora. – 1974. – V. 163. – P. 388–397.
276. **Ohtsubo, Y.** Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls [Text] / Y. Ohtsubo, T. Kudo, M. Tsuda, Y. Nagata // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2004. – V. 65. – P. 250–258.
277. **Oldenhof, H.** Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: an in situ Fourier transform infrared spectroscopic study [Text] / H. Oldenhof, W.F. Wolkers, J.L. Bowman, F. Tablin, J.H. Crowe // Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects. – 2006. – V. 1760. – P. 1226–1234.
278. **Oliver, K.J.** The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis [Text] / K.J. Oliver, S.E. Dowd, J. Zaragoza, S.A. Mauger, P.R. Payton // BMC Genomics. – 2004. – V. 5. – P. 89.
279. **Oliver, M.** The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants [Text] / M. Oliver, Z. Tuba, B. Mishler // Plant Ecol. – 2000b. – V. 151. – P. 85–100.

280. **Oliver, M.J.** Biochemical and molecular mechanisms of desiccation tolerance in bryophytes [Text] / M.J. Oliver, B. Goffinet // *Bryophyte Biology*. – 2008. – P. 269–298.
281. **Oliver, M.J.** Bryophytes as experimental models for the study of environmental stress tolerance: *Tortula ruralis* and desiccation tolerance in mosses [Text] / M.J. Oliver, J. Velten, A.J. Wood // *Plant Ecology*. – 2000a. – V. 151. – P. 73–84.
282. **Oliver, M.J.** Desiccation-tolerance in plant cells. A mini review [Text] // *Physiol. Plant*. – 1996. – V. 97. – P. 779–787.
283. **Oliver, M.J.** Desiccation-tolerance of plant tissues: A mechanistic overview [Text] / M.J. Oliver, J.D. Bewley // *Hortic. Rev.* – 1997. – V. 18. – P. 171–214.
284. **Onele, A.O.** Biochemical characterization of peroxidases from the moss *Dicranum scoparium* [Text] / A.O. Onele, A. Chasov, L. Viktorova, R.P. Beckett, T. Trifonova, F. Minibayeva // *S. Afr. J. Bot.* – 2018. – V. 119. – P. 132–141.
285. **Onele, A.O.** Characterization and expression analysis of ascorbate peroxidase from the moss *Dicranum scoparium* during abiotic stresses [Text] / A.O. Onele, A.V. Chasov, L.V. Viktorova, F.V. Minibayeva, R.P. Beckett // *Bryologist*. – 2021. – V. 124. – P. 68–84.
286. **Østergaard, L.** Computational analyzes and annotations of the Arabidopsis peroxidase gene family [Text] / L. Østergaard, A.G. Pedersen, H.M. Jespersen // *FEBS Letters*. – 1998. – V. 433. – P. 98–102.
287. **Otter, T.** Characterization of acidic and basic apoplastic peroxidase from needles of Norway spruce (*Picea abies* L., Karrsten) with respect to lignifying substrates [Text] / T. Otter, A. Polle // *Plant Cell Physiol*. – 1997. – V. 38. – P. 16–23.
288. **Otter, T.** The influence of apoplastic ascorbate on the activities of cell-wall associated peroxidase and NADH oxidase in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.) [Text] / T. Otter, A. Polle // *Plant Cell Physiol*. – 1994. – V. 35. – P. 595–602.
289. **Paciolla, C.** The ascorbate system in two bryophytes: *Brachythecium velutinum* and *Marchantia polymorpha* [Text] / C. Paciolla, F. Tommasi // *Biol. Plant*. – 2003. – V. 47. – P. 387–393.
290. **Pan, S.Q.** A technique for detection of chitinase, b-1,3-glucanase, and protein patterns after a single separation using polyacrylamide gel electrophoresis or isoelectrofocussing [Text] / S.Q. Pan., X.S. Ye, J. Kuc // *Phytopathology*. – 1991. – V. 81. – P. 970–974.
291. **Pandey, S.** Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase [Text] / S. Pandey, D. Fartyal, A. Agarwal, T. Shukla, D. James, T. Kaul, Y.K. Negi, S. Arora, M.K. Reddy // *Front. Plant Sci*. – 2017b. – V. 8. – P. 581.
292. **Pandey, V.P.** A comprehensive review on function and application of plant peroxidases [Text] / Pandey VP, Awasthi M, Singh S, Tiwari S, Dwivedi UN // *Biochem Anal Biochem*. – 2017a. – V. 6. – P. 1–16.

293. **Pandey, V.P.** Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume [Text] / V.P. Pandey, U.N. Dwivedi // J Mol Catal B Enzym. – 2011. – V. 68. – P. 168–173.
294. **Park, S.Y.** Molecular cloning of a cytosolic ascorbate peroxidase cDNA from cell cultures of sweetpotato and its expression in response to stress [Text] / S.Y. Park, S.H. Ryu, I.C. Jang, S.Y. Kwon, J.G. Kim, S.S. Kwak // Molecular Genetics and Genomics. – 2004. – V. 271. – P. 339–346.
295. **Passardi, F.** Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall [Text] / F. Passardi, C. Penel, C. Dunand // Trends Plant Sci. – 2004a. – V. 9. – P. 534–540.
296. **Passardi, F.** PeroxiBase: the peroxidase database [Text] / F. Passardi, G. Theiler, M. Zamocky, C. Cosio, N. Rouhier, F. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, V. Ioannidis, C. Penel, L. Falquet, C. Dunand // Phytochemistry. – 2007a. – V. 68. – P. 1605–11.
297. **Passardi, F.** Peroxidases have more functions than a Swiss army knife [Text] / F. Passardi, C. Cosio, C. Penel, C. Dunand // Plant Cell Rep. – 2005. – V. 24. – P. 255–265.
298. **Passardi, F.** Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos? [Text] / F. Passardi, M. Zamocky, J. Favet, C. Jakopitsch, C. Penel, C. Obinger, C. Dunand // Gene. – 2007b. – V. 397. – P. 101–13.
299. **Passardi, F.** Prokaryotic origins of the non-animal peroxidase superfamily and organelle-mediated transmission to eukaryotes [Text] / F. Passardi, N. Bakalovic, F.K. Teixeira, M. Margis-Pinheiro, C. Penel, C. Dunand // Genomics. – 2007c. – V. 89. – P. 567–579.
300. **Passardi, F.** The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants [Text] / F. Passardi, D. Longet, C. Penel, C. Dunand // Phytochemistry. – 2004b. – V. 65. – P. 1879–1893.
301. **Pederson, E.R.A.** Genome Sequencing of *Pleurozium schreberi*: The Assembled and Annotated Draft Genome of a Pleurocarpous Feather Moss [Text] / E.R.A. Pederson, D. Warshan, U. Rasmussen // G3: Genes, Genomes, Genetics. – 2019. – V. 9. – P. 2791–2797.
302. **Pettersen, E.F.** UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis [Text] / E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin // J Comput Chem. – 2004. – V. 25. – P. 1605–1612.
303. **Pitsch, N.T.** Comparison of the chloroplast peroxidase system in the chlorophyte *Chlamydomonas reinhardtii*, the bryophyte *Physcomitrella patens*, the lycophyte *Selaginella moellendorffii* and the seed plant *Arabidopsis thaliana* [Text] / N.T. Pitsch, B. Witsch, M. Baier // BMC Plant Biol. – 2010. – V. 10. – P.133.
304. **Pizarro, M.** Desiccation tolerance in the Antarctic moss *Sanionia uncinata* [Text] / M. Pizarro, R. A. Contreras, H. Köhler, E.Z. Gustavo // Biol Res. – 2019. – V. 52. – P. 46.

305. **Pleniscar, M.** Peroxidase associated with higher plant mitochondria [Text] / M. Pleniscar, W. D. Bonner, B. T. Storey // *Plant Physiol.* – 1967. – V. 42. – P. 366 – 370.
306. **Ponce de León, I.** Activation of Defense Mechanisms against Pathogens in Mosses and Flowering Plants [Text] / I. Ponce de León, M. Montesano // *Int J Mol Sci.* – 2013. – V. 14. – P. 3178–3200.
307. **Ponce de León, I.** Adaptation Mechanisms in the evolution of moss defenses to microbes [Text] / I. Ponce de León, M. Montesano // *Front Plant Sci.* – 2017. – V. 8. – P. 366.
308. **Potter, S.C.** HMMER web server: 2018 update [Text] / S.C. Potter, A. Luciani, S.R. Eddy, Y. Park, R. Lopez, R.D. Finn // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – W200–W204.
309. **Proctor, M.C.F.** Desiccation tolerance in bryophytes: a review [Text] / M.C.F. Proctor, M.J. Oliver, A.J. Wood, P. Alpert, L.R. Stark, N.L. Cleavitt, B.D. Mishler // *The Bryologist.* – 2007. – V. 110. – P. 595–621.
310. **Ramsey, J.** Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants [Text] / Ramsey J, Schemske DW // *Annu Rev Ecol Evol Syst.* – 1998. – V. 29. – P. 467–501.
311. **Rani, B.** High temperature induced changes in antioxidative enzymes in *Brassica juncea* (L) Czern & Coss. [Электронный ресурс]: Режим доступа:  
[http://www.australianoilseeds.com/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0003/6861/46\\_High\\_temperature\\_induced\\_changes\\_in\\_antioxidative\\_enzymes\\_in\\_Brassica\\_juncea.pdf](http://www.australianoilseeds.com/__data/assets/pdf_file/0003/6861/46_High_temperature_induced_changes_in_antioxidative_enzymes_in_Brassica_juncea.pdf) - Дата обращения: 05.04.2019.
312. **Rast, D.M.** Cell wall associated enzymes in fungi [Text] / D.M. Rast, D. Baumgartner, C. Mayer, G.O. Hollenstein // *Phytochemistry.* – 2003. – V. 64. – P. 339–366.
313. **Regalado, G.** Purification and properties of two acid peroxidases from *Brussels sprouts* [Text] / G. Regalado, O. Perez-Arvizu, B. Garcia-Almendarez, J.R. Whitaker // *J Food Biochem.* – 1999. – V. 23. – P. 435–450.
314. **Ren, LL.** Subcellular relocalization and positive selection play key roles in the retention of duplicate genes of *Populus* class III peroxidase family [Text] / L.L. Ren, Y.J. Liu, H.J. Liu, T.T. Qian, L.W. Qi, X.R. Wang, Q.Y. Zeng // *Plant Cell.* – 2014. – V. 26. – P. 2404–2419.
315. **Renault, H.** Harnessing lignin evolution for biotechnological applications [Text] / H. Renault, D. Werck-Reichhart, J.K. Weng // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2019. – V. 56. – P. 105–111.
316. **Rensing, S.A.** An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens* [Text] / S.A. Rensing, J. Ick, J. A. Fawcett, D. Lang, A. Zimmer, Y. Van de Peer // *BMC Evol. Biol.* – 2007. – V. 7. – P. 130.
317. **Rensing, S.A.** The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants [Text] / S.A. Rensing, D. Lang, A.D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P. Perroud, E.A. Lindquist, Y. Kamisugi, T. Tanahashi, K. Sakakibara, T. Fujita, K.

- Oishi, T. Shin-I, Y. Kuroki, A. Toyoda, Y. Suzuki, S. Hashimoto, K. Yamaguchi, S. Sugano, Y. Kohara, A. Fujiyama, A. Anterola, S. Aoki, N. Ashton, W.B. Barbazuk, E. Barker, J.L. Bennetzen, R. Blankenship, S.H. Cho, S.K. Dutcher, M. Estelle, J.A. Fawcett, H. Gundlach, K. Hanada, A. Heyl, K.A. Hicks, J. Hughes, M. Lohr, K. Mayer, A. Melkozernov, T. Murata, D.R. Nelson, B. Pils, M. Prigge, B. Reiss, T. Renner, S. Rombauts, P.J. Rushton, A. Sanderfoot, G. Schween, S. Shiu, K. Stueber, F.L. Theodoulou, H. Tu, Y. Van de Peer, P.J. Verrier, E. Waters, A. Wood, L. Yang, D. Cove, A.C. Cuming, M. Hasebe, S. Lucas, B.D. Mishler, R. Reski, I.V. Grigoriev, R.S. Quatrano, J.L. Boore // *Science*. – 2008. – V. 319. – P. 64–69.
318. **Rentel, M.C.** OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis* [Text] / M.C. Rentel, D. Lecourieux, F. Ouaked, S.L. Usher, L. Petersen, H. Okamoto, H. Knight, S.C. Peck, C.S. Grierson, H. Hirt, M.R. Knight // *Nature*. – 2004. – V. 427. – P. 858–861.
319. **Resh, M.** Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins [Text] // *Nat Chem Biol*. – 2006. – V. 2 – P. 584–590.
320. **Richards, S.** The hydroxyl radical in plants: from seed to seed [Text] / S. Richards, K. Wilkins, S. Swarbreck, A. Anderson, N. Habib, A. Smith, M. McAinsh, J. Davies // *Journal of Experimental Botany*. – 2015. – V. 66. – P. 37–46.
321. **Riddle, V. M.** Conversion of tryptophane to indoleacetic acid by plant preparations [Text] / V. M. Riddle, M. Mazelis // *Plant Physiol*. – 1965. – V. 40. – P. 481–484.
322. **Roach, T.** Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds [Text] / T. Roach, R.P. Beckett, F.V. Minibayeva, L. Colville, C. Whitaker, H. Chen, C. Bailly, I. Kranner // *Plant Cell Environ*. – 2010. – V. 33. – P. 59–75.
323. **Rosa, S.B.** Cytosolic APx knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice [Text] / S.B. Rosa, A. Caverzan, F.K. Teixeira, F. Lazzarotto, J.A. Silveira, S.L. Ferreira-Silva, J. Abreu-Neto, R. Margis, M. MargisPinheiro // *Phytochemistry*. – 2010. – V. 71. – P. 548 – 558.
324. **Rousk, K.** Moss-cyanobacteria associations as biogenic sources of nitrogen in boreal forest ecosystems [Text] / K. Rousk, D.L. Jones, T.H. DeLuca // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – V. 4. – P. 150.
325. **Rushmore, T.H.** The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity [Text] / T.H. Rushmore, M.R. Morton, C.B. Pickett // *J Biol Chem*. – 1991. – V. 266. – P. 11632–9.
326. **Sajitha Rajan, S.** Purification and kinetic characterization of the liverwort *Pallavicinia lyelli* (Hook.) S. Gray. cytosolic ascorbate peroxidase [Text] / Sajitha Rajan S, Murugan K // *Plant Physiol Biochem*. – 2010. – V. 48. – P. 758–763.

327. **Sarkar, S.** Structural-functional analyses of textile dye degrading azoreductase, laccase and peroxidase: A comparative in silico study [Text] / S. Sarkar, A. Banerjeeb, N. Chakraborty, K. Sorena, P. Chakraborty // *Elect J Biotech.* – 2019. – V. 43. – P. 48–54.
328. **Sassmann, S.** Comparing copper resistance in two bryophytes: *Mielichhoferia elongata* Hornsch. versus *Physcomitrella patens* Hedw [Text] / S. Sassmann, S. Wernitznig, I.K. Lichtscheidl, I. Lang // *Protoplasma.* – 2010. – V. 246. – P. 119–123.
329. **Sato, Y.** Interrelationship between lignin deposition and the activities of peroxidase isoenzymes in differentiating tracheary elements of *Zinnia* [Text] / Y. Sato, M. Sugiyama, R.J. Górecki, H. Fukuda, A. Komamine // *Planta.* – 1993. – V. 189. – P. 584–589.
330. **Schopfer, P.** Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening *in vitro* and *in vivo*: implications for the control of elongation growth [Text] // *Plant J.* – 2001a. – V. 28. – P. 679–688.
331. **Schopfer, P.** Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid [Text] / P. Schopfer, C. Plachy, G. Frahry // *Plant Physiol.* – 2001b. – V. 125. – P. 1591–1602.
332. **Seel, W.E.** Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and antioxidants in mosses [Text] / W.E. Seel, G.A.F. Hendry, J.A. Lee // *Journal of Experimental Botany.* – 1992b. – V. 43. – P. 1031–1037.
333. **Seel, W.E.** The combined effects of desiccation and irradiance on mosses from xeric and hydric habitats [Text] / W.E. Seel, G.A.F. Hendry, J.A. Lee // *Journal of Experimental Botany.* – 1992a. – V. 43. – P. 1023–1030.
334. **Sgherri, C.** Early production of activated oxygen species in root apoplast of wheat following copper excess [Text] / C. Sgherri, M. Quartacci, F. Navari-Izzo // *Journ. of Plant Physiol.* – 2007. – V. 164. – P. 1152–1160.
335. **Sharma, P.** Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions [Text] / P. Sharma, A.B. Jha, R.S. Dubey, M. Pessarakli // *Journal of Botany.* – 2012. – V. 2012: Article ID 217037.
336. **Shaw, A.J.** The Sphagnum Genome Project: a new model for ecological and evolutionary genomics [Text] / A.J. Shaw, J. Schmutz, N. Devos, S. Shu, A.A. Carrell, D.J. Weston // *Adv Bot Res.* – 2016. – V. 78. – P. 167–187.
337. **Shaw, J.** Potential for the evolution of heavy metal tolerance in *Bryum argenteum*, a moss. I. Variation within and among populations [Text] / J. Shaw, S.C. Beer, J. Lutz // *Bryologist.* – 1989. – V. 92. – P.73–80.

338. **Shi, W.M.** Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana* [Text] / W.M. Shi, Y. Muramoto, A. Ueda, T. Takabe // *Gene*. – 2001. – V. 273. – P. 23–27.
339. **Shigeoka, R.** Properties of monodehydroascorbate reductase and dehydroascorbate reductase and their participation in the regeneration of ascorbate in *Euglena gracilis* [Text] / R. Shigeoka, T. Yasumoto, Y. Onishi, S. Nakano, S. Kitaoka // *J. Gen. Microbiol.* – 1987. – V. 133. – P. 227–232.
340. **Shigeoka, S.** Cellular redox regulation, signaling, and stress response in plants [Text] / S. Shigeoka, T. Maruta // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2014. – V. 78. – P. 1457–1470.
341. **Shigeoka, S.** Purification and some properties of L-ascorbic acid-specific peroxidase in *Euglena gracilis* Z [Text] / S. Shigeoka, Y. Nakano, S. Kitaoka // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1980. – V. 201. – P. 1221–1227.
342. **Shigeoka, S.** Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes [Text] / S. Shigeoka, T. Ishikawa, M. Tamoi, Y. Miyagawa, T. Takeda, Y. Yabuta, K. Yoshimura // *Journal of Experimental Botany*. – 2002. – V. 53. – P. 1305–1319.
343. **Shigeto, J.** Diverse functions and reactions of class III peroxidases [Text] / J. Shigeto, Y. Tsutsumi // *New Phytol.* – 2016. – V. 209. – P. 1395–402.
344. **Shishova, M.F.** Proteome and Lipidome of Plant Cell Membranes during Development [Text] / M.F. Shishova, V.V. Yemelyanov // *Russ J Plant Physiol.* – 2021. – V. 68. – P. 800–817.
345. **Silva, A.T.** To dry perchance to live: insights from the genome of the desiccation-tolerant biocrust moss *Syntrichia caninervis* [Text] / A.T. Silva, B. Gao, K.M. Fisher, B.D. Mishler, J.T.B. Ekwealor, L.R. Stark et al. // *Plant J.* – 2020. – V. 105. – P. 1339–1356.
346. **Skulachev, V.P.** Cytochrome C in the apoptotic and antioxidant cascades [Text] // *FEBS Letters*. – 1998. – V. 423. – P. 275–280.
347. **Slater, G.S.** Automated generation of heuristics for biological sequence comparison [Text] / G.S. Slater, E. Birney // *BMC Bioinformatics*. – 2005. – V. 6. – P. 31.
348. **Smirnoff, N.** Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule [Text] // *Curr. Opin. Plant Biol.* – 2000. – V. 3. – P. 229–235.
349. **Smirnoff, N.** Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes [Text] / N. Smirnoff, Q.J. Cumbes // *Phytochemistry*. – 1989. – V. 28. – P. 1057–1060.
350. **Smirnoff, N.** The role of active oxygen in the response of plants to water-deficit and desiccation [Text] // *New Phytologist*. – 1993. – V. 125. – P. 27–58.
351. **So'derhall, K.** Invertebrate immunity [Text] // *Dev Comp Immunol.* – 1999. – V. 23. – P. 263–266.

352. **Soengas, P.** Effect of Temperature Stress on Antioxidant Defenses in *Brassica oleracea* [Text] / P. Soengas, V.M. Rodríguez, P.P. Velasco, M.E. Cartea // ACS Omega. – 2018. – V. 3. – P. 5237–5243.
353. **Sofa, A.** Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses [Text] / A. Sofa, A. Scopa, M. Nuzzaci, A. Vitti // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – V. 16. – P. 13561–13578.
354. **Song, X.H.** Characterization and Expression Analysis of a Cytosolic Ascorbate Peroxidase Gene from *Grimmia Pilifera* [Text] / X. H. Song, W. Sha, Z.M. Jin, Y.F Zhang // Advances in Intelligent and Soft Computing. – 2012. – V. 134. – P. 433–440.
355. **Sottomayor, M.** A vacuolar class III peroxidase and the metabolism of anticancer indole alkaloids in *Catharanthus roseus* [Text] / M. Sottomayor, P. Duarte, R. Figueiredo, A.R. Barceló // Plant Signall. Behav. – 2008. – V. 3. – P. 899–901.
356. **Srivastava, V.** Proteomic analysis of a poplar cell suspension culture suggests a major role of protein S-acylation in diverse cellular processes [Text] / V. Srivastava, J.R. Weber, E. Malm, B.W. Fouke, V. Bulone // Front Plant Sci. – 2016. – V. 7. – P. 477.
357. **Stanković, J.** Bryophytes and heavy metals: a review [Text] / J. Stanković, A. Sabovljević, M.S. Sabovljević // Acta Botanica Croatica. – 2018. – V. 77. – P. 109–118.
358. **Sun, S.Q.** Heavy Metal-induced physiological alterations and oxidative stress in the moss *brachythecium piligerum* chad [Text] / S.Q. Sun, M. He, G.X. Wang, T. Cao // Environ Toxicol. – 2010a. – V. 26. – P. 453–458.
359. **Sun, S.Q.** Heavy metal-induced physiological alterations and oxidative stress in the moss *Brachythecium piligerum* chad [Text] / S.Q. Sun, M. He, G.X. Wang, T. Cao // Environmental Toxicology. – 2010b. – V. 26. – P. 453–458.
360. **Sutherland, M.W.** The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase [Text] / M.W. Sutherland, B.A. Learmonth // Free Radic. Res. – 1997. – V. 27. – P. 283–289.
361. **Takahashi, D.** Plant plasma membrane proteomics for improving cold tolerance [Text] / D. Takahashi, B. Li, T. Nakayama, Y. Kawamura, M. Uemura // Front. Plant Sci. – 2013. – V. 4. – P. 90.
362. **Takeda, T.** Purification and characterization of ascorbate peroxidase in *Chlorella vulgaris* [Text] / T. Takeda, K. Yoshimura, T. Ishikawa, S. Shigeoka // Biochimie. – 1998. – V. 80. – P. 295–301.
363. **Teixeira, F.K.** Rice ascorbate peroxidase gene family encodes functionally diverse isoforms localized in different subcellular compartments [Text] / F.K. Teixeira, L. Menezes-Benavente, V.C. Galvão, R. Margis, M. Margis-Pinheiro // Planta. – 2006. – V. 224. – P. 300–314.
364. **Theorell, H.** Crystalline peroxidase [Text] // Enzimologia. – 1942. – V. 10. – P. 250–252.

365. **Tobias, M.N.** Drought and desiccation-tolerance and sensitivity in plants [Text] // Botany, John Kiogora Mworira, IntechOpen. – 2012. doi:10.5772/33584.
366. **Tognolli, M.** A genetic and enzymatic survey of *Arabidopsis thaliana* peroxidase [Text] / M. Tognolli, S. Overney, C. Penel // Plant Perox. Newslett. – 2000. – V. 14. – P. 3–12.
367. **Tognolli, M.** Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana* [Text] / M. Tognolli, C. Penel, H. Greppin // Gene. – 2002. – V. 288. – P. 129–138.
368. **Torres, M.A.** Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development [Text] / M.A. Torres, J.L. Dangel // Curr Opin Plant Biol. – 2005. – V. 8. – P. 397–403.
369. **Traverso, J.A.** Expanded impact of protein N-myristoylation in plants [Text] / J.A. Traverso, T. Meinel, C. Giglione // Plant Signal Behav. – 2008. – V. 3. – P. 501–502.
370. **Triantaphylidès, C.** Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling [Text] / C. Triantaphylidès, M. Havaux // Trends Plant Sci. – 2009. – V. 14. – P. 219–228.
371. **Turetsky, M.R.** The resilience and functional role of moss in boreal and arctic ecosystems [Text] / M.R. Turetsky, B. Bond-Lamberty, E. Euskirchen, J. Talbot, S. Frohking, A.D. McGuire, E.S. Tuittila // New Phytol. – 2012. – V. 196. – P. 49–67.
372. **Turetsky, M.R.** The role of bryophytes in carbon and nitrogen cycling [Text] // Bryologist. – 2003. – V. 106. – P. 395–409.
373. **Uarrota, V.G.** The role of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase, and polysaccharides in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots under postharvest physiological deterioration [Text] / V.G. Uarrota, R. Moresco, E.C. Schmidt, Z.L. Bouzon, E. da Costa Nunes, E. de Oliveira Neubert, M. Maraschin // Food Chem. – 2016. – V. 197. – P. 737–746.
374. **Vandenabeele, S.** Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana* [Text] / S. Vandenabeele, S. Vanderauwera, M. Vuylsteke, S. Rombauts, C. Langebartels, H.K. Seidlitz, M. Zabeau, M. Van Montagu, D. Inzé, F. Van Breusegem // Plant J. – 2004. – V. 39. – P. 45–58.
375. **Vanderauwera, S.** Genome-wide analysis of hydrogen peroxide-regulated gene expression in *Arabidopsis* reveals a high light-induced transcriptional cluster involved in anthocyanin biosynthesis [Text] / S. Vanderauwera, P. Zimmermann, S. Rombauts, S. Vandenabeele, C. Langebartels, W. Gruissem, D. Inzé, F. Van Breusegem // Plant Physiol. – 2005. – V. 139. – P. 806–821.
376. **Vogel, J.C.** Carbon and nitrogen dynamics of boreal jack pine stands with and without a green alder understory [Text] / J.C. Vogel, S.T. Gower // Ecosystems. – 1998. – V. 1. – P. 386–400.
377. **Wang, P.** Guard-cell signaling for hydrogen peroxide and abscisic acid [Text] / P. Wang, C.P. Song // New Phytol. – 2008. – V. 178. – P. 703–718.

378. **Wang, R.C.** Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation [Text] / R.C. Wang, Y. Wei, Z. An, Z. Zou, G. Xiao, G. Bhagat, M. White, J. Reichelt, B. Levine // *Science*. – 2012. – V. 338. – P. 956–9.
379. **Wang, W.** Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance [Text] / W. Wang, B. Vinocur, A. Altman // *Planta*. – 2003. – V. 218. – P.1–14.
380. **Wang, X.** Proteomic analysis of the cold stress response in the moss, *Physcomitrella patens* [Text] / X. Wang, P. Yang, X. Zhang, Y. Xu, T. Kuang, S. Shen, Y. He // *Proteomics*. – 2009. – V. 9. – P. 4529–38.
381. **Wang, Y.** Systematic analysis of maize class III peroxidase gene family reveals a conserved subfamily involved in abiotic stress response [Text] / Y. Wang, Q. Wang, Y. Zhao, G. Han, S. Zhu // *Gene*. – 2015. – V. 566. – P. 95–108.
382. **Waterhouse, A.** SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes [Text] / A. Waterhouse, M. Bertoni, S. Bienert, G. Studer, G. Tauriello, R. Gumienny, F.T. Heer, T.A.P. Beer, C. Rempfer, L. Bordoli, R. Lepore, T. Schwede // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – W296–W303.
383. **Welinder, K. G.** Structure and evolution of peroxidase [Text] / K. G. Welinder, S. K. Rasmussen, M. Gajhede, C. Penel, H. Greppin // *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology. - Rochat-Baumann, Imprimerie Nationale, Geneva*. – 1993. – P. 35–42.
384. **Welinder, K.** Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana* [Text] / K. Welinder, A. Justesen, I. Kjærsgård // *Eur. J. Biochem.* – 2002. – V. 269. – P. 6063–6081.
385. **Welinder, K.G.** Plant peroxidases: structure–function relationships [Text] // In: Penel C, Gaspar T, Greppin H (eds) *Plant Peroxidases*, University of Geneva, Geneva. – 1992. – P. 1–24.
386. **Wells, J.M.** Kinetic analysis of Cd uptake in Cd-tolerant and intolerant populations of the moss *Rhytidiadelphus squarrosus* (Hedw.) Warnst and the lichen *Peltigera membranacea* (Ach.) Nyl [Text] / J.M. Wells, D.H. Brown, R.P Beckett // *New phytologist*. – 1995. – V. 129. – P. 477–486.
387. **Wen, X.** Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*-a white rot fungus [Text] / X. Wen, Y. Jia, J. Li // *Chemosphere*. – 2009. – V. 75. – P. 1003–1007.
388. **Whitaker, C.** Production of reactive oxygen species in excised, desiccated and cryopreserved explants of *Trichilia dregeana* [Text] / C. Whitaker, R.P. Beckett, F.V. Minibayeva, I. Kranner // *S. Afr. J. Bot.* – 2010. – V. 76. – P. 112–118.

389. **Wilson, J.P.** Proteomic analysis of fatty-acylated proteins in mammalian cells with chemical reporters reveals S-acylation of histone H3 variants [Text] / J.P. Wilson, A.S. Raghavan, Y.Y. Yang, G. Charron, H.C. Hang // *Mol Cell Proteomics*. – 2011. – V. 10:M110.001198.
390. **Wolterbeek, B.** Biomonitoring of trace element air pollution: principles, possibilities and perspectives [Text] // *Environmental Pollution*. – 2002. – V. 120. – P. 11–21.
391. **Wood, A.** Bryophytes as model systems [Text] / A.J. Wood, M.J. Oliver, D.J. Cove // *Bryologist*. – 2000. – V. 103. – P. 128–133.
392. **Wood, A.J.** The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses [Text] // *Bryologist*. – 2007. – V. 110. – P. 163–177.
393. **Wu, C.** The class III peroxidase (POD) gene family in cassava: identification, phylogeny, duplication, and expression [Text] / C. Wu, X. Ding, Z. Ding, W. Tie, Y. Yan, Y. Wang, H. Yang, W. Hu // *Int J Mol Sci*. – 2019. – V. 20. – P. 2730.
394. **Xiao, H.** Genome-wide identification of the class III POD gene family and their expression profiling in grapevine (*Vitis vinifera* L) [Text] / H. Xiao, C. Wang, N. Khan, M. Chen, W. Fu, L. Guan, X. Leng // *BMC genomics*. – 2020. – V. 21. – P. 1–13.
395. **Xie, Y.** GPS-Lipid: a robust tool for the prediction of multiple lipid modification sites [Text] / Y. Xie, Y. Zheng, H. Li, X. Luo, Z. He, S. Cao, Y. Shi, Q. Zhao, Y. Xue, Z. Zuo, J. Ren // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6. – P. 1–9.
396. **Xu, Z.** Comparative genome analysis of lignin biosynthesis gene families across the plant kingdom [Text] / Z. Xu; D. Zhang; J. Hu, X. Zhou, X. Ye, K.L. Reichel, N.R. Stewart, R.D. Syrenne, X. Yang, P. Gao et al. // *BMC Bioinform*. – 2009. – V. 10:S3.
397. **Xue, Y.** GPS 2.0, a tool to predict kinase-specific phosphorylation sites in hierarchy [Text] / Y. Xue, J. Ren, X. Gao, C. Jin, L. Wen, X. Yao // *Mol. Cell. Proteom*. – 2008. – V. 7. –P. 1598–608.
398. **Yadav, S.K.** Heavy metals toxicity in plants: an overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants [Text] // *South African Journal of Botany*. 2010. – V. 76. – P. 167–179.
399. **Yamaguchi, K.** A novel isoenzyme of ascorbate peroxidase localized on glyoxysomal leaf peroxisomal membranes in pumpkin [Text] / K. Yamaguchi, H. Mori, M. Nishimura // *Plant Cell Physiol*. – 1995. – V. 36. – P. 1157–1162.
400. **Yan, J.** Photosynthesis and seed production under water-deficit conditions in transgenic tobacco plants that overexpress an Arabidopsis ascorbate peroxidase gene [Text] / J. Yan, J. Wang, D. Tissue, A.S. Holaday, R. Allen, H. Zhang // *Crop Science*. – 2003. – V. 43. – P. 1477–1483.
401. **Yatskievych, G.** "Broom moss" [Text] // *Encyclopedia Britannica* - 2018 [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.britannica.com/plant/broom-moss> - Дата обращения: 8. 09. 2021.

402. **Yoshida, K.** Molecular biology and application of plant peroxidase genes [Text] / K. Yoshida, P. Kaothien, T. Matsui, A. Kawaoka, A. Shinmyo // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2003. – V. 60. – P. 665–670.
403. **Yoshimura, K.** Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in responses to oxidative stresses [Text] / K. Yoshimura, Y. Yabuta, T. Ishikawa, S. Shigeoka // *Plant Physiol.* – 2000. – V. 123. – P. 223–233.
404. **Yu, C.S.** Predicting subcellular localization of proteins for Gram-negative bacteria by support vector machines based on n-peptide compositions [Text] / C.S. Yu, C.J. Lin, J.K. Hwang // *Protein Sci.* – 2004. – V. 13. – P. 1402–1406.
405. **Yu, C.W.** Hydrogen peroxide-induced chilling tolerance in mung beans mediated through ABA-independent glutathione accumulation [Text] / C.W. Yu, T.M. Murphy, C.H. Lin // *Funct Plant Biol.* – 2003. – V. 30. – P. 955–963.
406. **Yusupova, Z.R.** The activity of peroxidase in various cell fractions of wheat plants infected with *Septoria nodorum* berk. [Text] / Z.R. Yusupova, R.M. Khairullin, I.V. Maksimov // *Russ J Plant Physiol.* – 2006. – V. 53. – P. 807–813.
407. **Zamocky, M.** Phylogenetic relationships in class I of the superfamily of bacterial, fungal, and plant peroxidases [Text] // *European Journal of Biochemistry.* – 2004. – V. 271. – P. 3297–3309.
408. **Zapata, J.M.** Identification of a thylakoid peroxidase of barley which oxidizes hydroquinone [Text] / J.M. Zapata, B. Sabater, M. Martin // *Phytochemistry.* – 1998. – V. 48. – P. 1119–1123.
409. **Zhang, M.M.** Protein S-palmitoylation in cellular differentiation [Text] / M.M. Zhang, H.C. Hang // *Biochem Soc T.* – 2017. – V. 45. – P. 275–285.
410. **Zhang, W.** Transcriptome sequencing and physiological analysis of *Pohlia nutans* under salt stress reveal the important roles of ROS-scavenging system [Text] / W. Zhang, S. Liu, C. Li, P. Zhang, P. Zhang // NCBI database [Электронный ресурс]: Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/QCF46614.1> - Дата обращения: 05.04.2021.
411. **Zhao, Z.** Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings [Text] / Z. Zhao, G. Chen, C. Zhang // *Aust J Plant Physiol.* – 2001. – V. 28. – P. 1055–1061.
412. **Zhu, B.** The three-dimensional structure of the horseradish (*Armoracia rusticana*) peroxidase isoenzyme C1a (Protein Data Bank: 1ATJ) [Text] / B. Zhu, T. Mizoguchi, T. Kojima, H. Nakano // *PLoS ONE* – 2015. – 10(5):e0127479.
413. **Zhu, T.** Xin F, Wei S, Liu Y, Han Y, Xie J, Ding Q, Ma L Genome-wide identification, phylogeny and expression profiling of class III peroxidases gene family in *Brachypodium distachyon* [Text] / T. Zhu, F. Xin, S. Wei, Y. Liu, Y. Han, J. Xie, Q. Ding, L. Ma // *Gene.* – 2019. – V. 700. – P. 149–162.

414. **Zhuo, L.** Thermal tolerance of dried shoots of the moss *Bryum argenteum* [Text] / L. Zhuo, Y. Liang, H. Yang, X. Li, Y. Zhang, Y. Zhang, K. Guan, D. Zhang // *Journal of thermal biology*. – 2020. – V. 89:102469.
415. **Zimmer, A.D.** Reannotation and extended community resources for the genome of the non-seed plant *Physcomitrella patens* provide insights into the evolution of plant gene structures and functions [Text] / A.D. Zimmer, D. Lang, K. Buchta, S. Rombauts, T. Nishiyama, M. Hasebe // *BMC Genomics*. – 2013. – V. 14. – P. 498.
416. **Zipor, G.** Do vacuolar peroxidases act as plant caretakers? [Text] // G. Zipor, M. Oren-Shamir // *Plant Science*. – 2013. – V. 199. – P. 41 – 47.
417. **Zou, Q.** Heat injury and heat acclimation in wheat plants [Text] // *Journal of Integrative Plant Biology*. – 1988. – V. 30. – P. 388–399.