

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Биолого-почвенный институт
Дальневосточного отделения Российской академии наук

На правах рукописи



Авраменко Татьяна Викторовна

**Активность и продукция пероксидаз III класса в клеточных культурах
растений, трансформированных генами *rolB* и *rolC***

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Ю. Н. Шкрыль

Владивосток – 2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	11
1.1. <i>Agrobacterium rhizogenes</i> – природная система трансформации высших растений.....	11
1.2. Характеристика агробактериальных генов <i>rol</i>	12
1.2.1. Опухолеобразующая функция генов <i>rol</i>	12
1.2.2. Гены <i>rol</i> – активаторы вторичного метаболизма.....	15
1.4. Влияние генов <i>rol</i> на защитную систему клетки	17
1.3. Роль PR-белков и активных форм кислорода при патогенезе.....	19
1.4. Растительные пероксидазы III класса: структурные и каталитические особенности	21
1.6. Разнообразие функций пероксидаз III класса	23
1.6.1. Пероксидазы III класса в жизненном цикле растений	23
1.6.2. Роль пероксидаз при стрессах различного происхождения	24
1.6.3. Лигнификация и суберизация клеточной стенки.....	26
1.6.4. Регуляция катаболизма ауксинов	28
1.6.5. Участие в биосинтезе вторичных метаболитов	29
1.7. Области практического применения ферментов пероксидаз	31
1.7.1. Способы получения растительных пероксидаз	31
1.7.2. Использование пероксидаз в иммуноферментном анализе.....	33
1.7.3. Использование пероксидаз в биосенсорах	35
1.7.4. Применение пероксидаз в биотрансформациях.....	36
1.7.5. Другие области применения пероксидаз	36
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1. Культивирование клеточных культур и растений	38
2.2. Идентификация генов пероксидаз III класса.....	40
2.3. Анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз	44
2.4. Филогенетический анализ пероксидаз	45
2.5. Определение активности и изоферментов пероксидаз	45

2.6. Определение уровня внутриклеточных активных форм кислорода.....	47
2.7. Статистический анализ	47
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	48
3.1. Идентификация и анализ генов пероксидаз III класса <i>R. cordifolia</i>	48
3.2. Анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса <i>R. cordifolia</i>	48
3.3. Филогенетический анализ пероксидаз III класса.....	52
3.4. Эффект трансформации генами <i>rolB</i> , <i>rolC</i> и диким штаммом A4 A. <i>rhizogenes</i> на пероксидазы III класса <i>R. cordifolia</i>	54
3.4.1. Экспрессия генов пероксидаз в тканях листа, стебля и в клеточных культурах <i>R. cordifolia</i>	55
3.4.2. Активность и изоферментный анализ пероксидаз III класса в листе, стебле и в клеточных культурах <i>R. cordifolia</i>	58
3.5. Влияние повышенного уровня АФК на активность пероксидаз III класса <i>R. cordifolia</i>	62
3.5.1. Анализ содержания АФК в клеточных культурах <i>R. cordifolia</i> , трансформированных мутантными формами <i>AtCPK1</i>	62
3.5.2. Анализ пероксидаз III класса в клеточных культурах <i>R. cordifolia</i> , трансформированных мутантными формами <i>AtCPK1</i>	62
3.6. Влияние уровня экспрессии <i>rolB</i> на активацию пероксидаз III класса.....	64
3.6.1. Анализ экспрессии генов <i>RcPrx</i> в <i>rolB</i> -трансформированных клеточных культурах <i>R. cordifolia</i>	64
3.6.2. Анализ активности и изоферментного состава пероксидаз III класса в <i>rolB</i> -трансформированных культурах <i>R. cordifolia</i>	66
3.7. Активирующий эффект <i>rolB</i> на пероксидазы III класса в клеточных культурах <i>R. cordifolia</i> в разных фазах роста	67
3.7.1. Динамика экспрессии генов пероксидаз III класса <i>R. cordifolia</i>	67
3.7.2. Динамика изоферментного состава и активности пероксидаз III класса	70
3.7.3. Динамика накопления биомассы и продукции пероксидаз III класса...	73

3.8. Активация пероксидаз под влиянием других стрессовых факторов	76
3.8.1. Влияние абиотических воздействий и метилжасмоната на экспрессию генов пероксидаз III класса <i>R. cordifolia</i>	76
3.8.2. Активность и изоферментный состав пероксидаз III класса в условиях абиотического стресса.....	79
3.9. Эффект трансформации геном <i>rolB</i> на пероксидазы III класса <i>Rhodiola roseus</i> и <i>Silene vulgaris</i>	81
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	91

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важнейших достижений последних десятилетий в области физиологии растений стал прогресс в понимании молекулярных механизмов опухолеобразования у растений при встраивании генов *rol* из *Agrobacterium rhizogenes* в растительный геном. Для этих генов были отмечены такие свойства, как изменение фитогормонального и кальциевого статуса растительных клеток, индукция морфогенеза и регуляция процессов роста и развития растений. В результате исследования функций индивидуальных генов Т-ДНК Ri-плазмиды *A. rhizogenes* установлено, что гены *rolB* и *rolC* являются эффективными активаторами биосинтеза вторичных метаболитов. Это открытие значительно расширило современные представления о роли генов *rol*, а также имело основополагающее значение для создания стабильных штаммов-суперпродуцентов ценных веществ растительного происхождения. Последние данные свидетельствуют, что влияние этих генов не ограничивается регуляцией вторичного метаболизма и сопровождается значительными изменениями в защитном аппарате растительных клеток. В лаборатории биоинженерии БПИ ДВО РАН показано, что каллусные культуры марены сердцелистной (*Rubia cordifolia* L.), трансформированные генами *rolB* и *rolC*, характеризуются устойчивостью к стрессовым воздействиям и пониженным уровнем внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) (Bulgakov et al., 2013). Баланс АФК в значительной мере влияет на жизнеспособность растительной клетки, в связи с чем особый интерес вызывают ферментные системы, участвующие в их метаболизме.

Ферменты пероксидазы III класса представляют важное звено антиоксидантной системы защиты растений и относятся к патоген-обусловленным (pathogenesis-related, PR) белкам семейства PR-9. В случае атаки патогена пероксидазы реализуют один из самых ранних механизмов защиты, связанный с повышением уровня АФК, и способны индуцировать редокс-чувствительные сигнальные системы растения, а также проявляют

бактерицидную активность, разрушая клеточные стенки патогенов. Защитные функции пероксидаз III класса значительны и разнообразны, однако, индукция их синтеза при бактериальном патогенезе в настоящее время изучена недостаточно. Несмотря на известную роль генов *rol* в модуляции защитных систем растений, в литературных источниках практически отсутствует информация об их влиянии на пероксидазы III класса. Вместе с тем, актуальной задачей является поиск новых потенциальных источников пероксидаз в связи с их широким использованием в различных отраслях производства.

Растительные пероксидазы являются ценными ферментами для биотехнологии. Востребованность пероксидаз обусловлена их практическим применением во многих областях, в частности, в медицинской диагностике и биокатализе, в промышленном и пищевом производстве, а также при создании высокочувствительных биосенсоров и систем очистки сточных вод (Ryan et al., 2006). Поэтому, трансгенные клеточные культуры растений с повышенным содержанием пероксидаз могли бы найти применение в рамках крупномасштабного получения ферментов. По предварительным оценкам, если повысить продукцию пероксидаз с помощью генно-инженерных технологий всего лишь на 5%, это приведет к почти двукратному увеличению рентабельности производства (Hailu et al., 2010). Одним из возможных способов решения данной проблемы является трансформация клеточных культур растений агробактериальными генами *rol*. Но, несмотря на достигнутые успехи в области регуляции вторичного метаболизма, практически ничего не известно о способности этих генов влиять на продукцию ферментов в растительных клетках. Настоящая работа призвана восполнить этот пробел, и посвящена изучению влияния генов *rol* на продукцию и активность ферментов растительных пероксидаз III класса.

В соответствии с вышеизложенным, сформулирована **цель работы** – исследовать регуляторное влияние генов *rol* в отношении растительных пероксидаз III класса в трансгенных клеточных культурах *Rubia cordifolia*.

В рамках поставленной цели предполагалось решить следующие **задачи**:

1. идентифицировать полноразмерные последовательности генов растительных пероксидаз III класса *R. cordifolia*;
2. провести филогенетический анализ пероксидаз III класса *R. cordifolia* и других растений;
3. провести сравнительный анализ влияния агробактериальных генов *rol* на растительные пероксидазы III класса *R. cordifolia*;
4. определить наличие взаимосвязи между уровнем экспрессии трансгена и активации пероксидаз III класса в *rolB*-трансформированных клеточных культурах *R. cordifolia*;
5. установить закономерности накопления и изменения ферментативной активности пероксидаз III класса в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* в разных фазах роста;
6. провести сравнительную оценку влияния сверхэкспрессии гена *rolB* и абиотических стрессовых факторов на пероксидазы III класса в клеточных культурах *R. cordifolia*;
7. оценить способность гена *rolB* активировать пероксидазы III класса в клеточных культурах других растений на примере родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) и смоловки обыкновенной (*Silene vulgaris* (M.) G.).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Сверхэкспрессия гена *rolB* приводит к значительной активации пероксидаз III класса в *rolB*-трансгенных культурах *R. cordifolia*. Данный эффект является специфичной функцией трансгена и положительно коррелирует с уровнем его экспрессии, а также сохраняется на всех фазах роста в течение пассажа.
2. Индукция растительных пероксидаз III класса на фоне сверхэкспрессии гена *rolB* значительно сильнее, чем при культивировании в условиях абиотического стресса и добавлении элиситора.
3. Сверхэкспрессия гена *rolB* в клеточных культурах *Rh. rosea* и *S. vulgaris* также приводит к активации растительных пероксидаз III класса.

4. Трансформация диким штаммом A4 *A. rhizogenes* и геном *rolC* не оказывают существенного эффекта на содержание и активность пероксидаз III класса в клеточных культурах *R. cordifolia*.

Научная новизна и практическая значимость. Впервые изучено регуляторное действие агробактериальных генов *rol* в отношении растительных пероксидаз III класса, представляющих патоген-обусловленные белки семейства PR-9, в трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia*. Показано, что активация пероксидаз III класса в условиях сверхэкспрессии *rolB* является специфичной функцией трансгена и не характерна для *rolC*. Совместная экспрессия генов *rolB* и *rolC* в составе дикого штамма pRiA4 также не оказывает значительного эффекта на пероксидазы III класса, что указывает на компенсирующее действие гена *rolC* в отношении *rolB*. Проведено исследование молекулярных механизмов *rolB*-индуцируемой активации пероксидаз III класса и показано отсутствие взаимосвязи с общим изменением уровня внутриклеточных АФК на фоне трансформации. Очевидно, что данный эффект является специфическим ответом клетки на сигнал, генерируемый белком RolB. Установлено, что *rolB*-индуцируемая активация пероксидаз III класса положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена и вызывает транскрипционную и ферментативную активацию белков пероксидаз, а также значительно увеличивает их продукцию. Показано, что данный эффект сохраняется на всех фазах роста в течение пассажа. Установлено, что *rolB* является более сильным индуктором пероксидаз III класса по сравнению с другими абиотическими стрессами, включая низкую и высокую температуры, обработку NaCl и метилжасмонатом. Получены данные о способности гена *rolB* активировать пероксидазы в трансгенных клеточных культурах других растений, в частности, *Rh. rosea* и *S. vulgaris*. Полученные результаты вносят вклад в понимание регуляторного действия генов *rolB* и *rolC* из *A. rhizogenes* на защитный аппарат растительной клетки и дополняют имеющиеся сведения о молекулярных механизмах взаимодействия растений и бактериальных патогенов. В контексте практического применения возможно использование

генов *rol* для создания клеточных культур растений – суперпродуцентов пероксидаз III класса с целью биотехнологического производства ферментов. Полученные сведения о роли индивидуальных изоформ пероксидаз III класса в условиях абиотического стресса могут служить основой для создания трансгенных растений, устойчивых к неблагоприятным условиям.

Апробация результатов. Результаты исследований представлены на XI Региональной конференции студентов, аспирантов вузов и научных организаций Дальнего Востока России (Владивосток, 2012), 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition (Тэгу, Южная Корея, 2013), The 8th International Conference on European Science and Technology (Мюнхен, Германия, 2014), Second European Conference on Biology and Medical Sciences (Вена, Австрия, 2014), XV Всероссийской молодежной школе-конференции по актуальным проблемам химии и биологии (Владивосток, 2014), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), VI Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины» (Ростов-на-Дону, 2015).

Личный вклад автора. Автором самостоятельно были проведены исследования по определению общей пероксидазной активности и изоферментного состава пероксидаз. Филогенетический и статистический анализы проведены совместно с к.б.н., в.н.с. Шкрыль Ю.Н., определение уровня экспрессии генов пероксидаз выполнено совместно с к.б.н., с.н.с. Веремейчик Г.Н., исследование уровня активных форм кислорода проводили совместно с к.б.н., с.н.с. Горпенченко Т.Ю. (лаб. биотехнологии БПИ ДВО РАН).

Работа выполнена в лаборатории биоинженерии Федерального государственного учреждения науки Биолого-почвенного института ДВО РАН при финансовой поддержке грантов РФФИ (№ 11-04-00113-а и № 14-04-31913).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах и 7 тезисов докладов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы включает 290 публикаций. Диссертация изложена на 121 странице машинописного текста, содержит 9 таблиц и 14 рисунков.

Благодарности. Автор выражает благодарность своему научному руководителю – кандидату биологических наук Юрию Николаевичу Шкрыль. Автор выражает свою искреннюю признательность сотрудникам БПИ ДВО РАН: кандидату биологических наук Галине Николаевне Веремейчик за неоценимую помощь в организации и проведении исследований методом ПЦР в реальном времени, кандидату биологических наук Татьяне Юрьевне Горпенченко (лаборатория биотехнологии БПИ ДВО РАН) за помощь в проведении исследований методом конфокальной микроскопии и всем сотрудникам лаборатории биоинженерии БПИ ДВО РАН.

1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. *Agrobacterium rhizogenes* – природная система трансформации высших растений

История изучения почвенных бактерий рода *Agrobacterium* берет начало в XX веке, когда впервые была установлена природа опухолевых образований, возникающих на поверхности древесных растений (Smith, Townsend, 1907). Один из наиболее ярких представителя рода – *Agrobacterium rhizogenes* – известен своей способностью вызывать образование дифференцированных опухолей в виде массы корней (Ricker et al., 1930). Стратегия заражения заключается в переносе бактериальной транспортной ДНК (Т-ДНК) в клетку хозяина, где происходит ее встраивание в растительный геном и активируются бактериальные гены, то есть, осуществляется процесс генетической колонизации (Zupan, Zambryski, 1995). В результате трансформации опухолевые клетки растений начинают синтезировать опины, которые бактерия использует в качестве источника азота и углерода. Процесс сопровождается стимуляцией корнеобразования, в связи с чем заболевание получило название «бородатый корень». В отличие от нормальных корней, они характеризуются повышенной тенденцией к росту и увеличенным содержанием вторичных метаболитов, отсутствием гравитропизма и нечувствительности к экзогенным фитогормонам (Guillon et al., 2006).

Исследования показали, что индукция опухоли обусловлена бактериальными мегаплазмидами – в случае *A. rhizogenes* это Ri-плазмиды (от англ. root inducing) размером от 200 до 800 кб (Fakhrai, 1990). В составе плазмиды содержатся генетические компоненты, переносимые агробактерией и необходимые для трансформации: Т-ДНК, в которой заключена информация о бактериальных белках, гены vir-области – их продукты осуществляют транспорт Т-ДНК, а также локусы, контролирующие размножение плазмиды в

бактериальной клетке и ее перенос при бактериальной конъюгации (Chandra et al., 2012).

Индукция заболевания «бородатого корня» бактериями *A. rhizogenes* осуществляется следующим образом: под контролем транспортных белков vir-области участок Т-ДНК плазмиды переносится в растительный геном (Chilton et al., 1982). В бактериях агропинового штамма таких областей две – T_L - и T_R -ДНК (Trovato, Linhares, 1999). T_R -ДНК Ri-плазмиды содержит гены, кодирующие опины, и два гена биосинтеза ауксина – *aux1* и *aux2* (Nemoto et al., 2009). T_L -ДНК полностью секвенирована, она содержит 18 открытых рамок считывания, сходных с эукариотическими, которые снабжены необходимыми элементами промоторов и сигналами полиаденелирования (Slightom et al., 1986). Вся информация, необходимая для поддержания опухолевого состояния, локализуется в T_L -ДНК, поэтому для поддержания фенотипа «бородатого корня» нет абсолютной необходимости в T_R -ДНК, однако, штаммы *Agrobacterium*, несущие как T_L -, так и T_R -ДНК, более вирулентны и заражают большее число видов растений, чем штаммы, несущие только одну Т-ДНК (Дрейпер и соавт., 1991). Области Т-ДНК ограничены прямыми повторами длиной 25 п.н., необходимыми для узнавания белками Vir. Общая организация генов Т-ДНК и их flankирующих областей сходна с таковой эукариотических генов, хотя они не содержат инtronов (Tinland, 1996). В растительную ДНК может включаться одна или несколько копий Т-ДНК, и хотя множественные копии могут образовывать tandemные повторы, они могут быть разбросаны по всему геному.

1.2. Характеристика агробактериальных генов *rol*

1.2.1. Опухолеобразующая функция генов *rol*

Четыре локуса в T_L -ДНК ответственны за возникновение синдрома «бородатых корней» – это так называемые root loci – гены *rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*,

которым соответствуют открытые рамки считывания (open reading frame – ORF) 10, 11, 12 и 15 соответственно. Эти гены имеют бактериальную природу, однако снабжены регуляторными последовательностями, схожими с эукариотическими, что обеспечивает их активность в клетках растений (Mishra, Ranjan, 2008). Экспрессия индивидуальных генов *rol* позволила выявить их морфогенетические эффекты, отражавшиеся множественными изменениями в фенотипе растений. Так, *rolA*-трансгенные растения характеризовались сморщенными листьями, уменьшенными междуузлиями и цветками неправильной формы (Schmülling et al., 1988; Sinkar et al., 1988; Carneiro, Vilaine, 1993), *rolB* – повышенным образованием придаточных корней, некрозом и потемнением листьев, увеличением размеров цветков и гетеростилией (Cardarelli et al., 1987; Schmülling et al., 1988), *rolC* – карликовостью и изменением морфологии листовых пластин, стерильностью и отсутствием апикального доминирования (Schmülling et al., 1988), а *rolD*-трансгенные растения отличались ранним цветением и ускоренным переходом из вегетативной в репродуктивную фазу развития (Costantino et al., 1994). Среди генов *rol*, только *rolD* не способен самостоятельно вызывать синдром «бородатого корня» (Mauro et al., 1996), тогда как *rolB*, напротив, является самым сильным онкогеном и его инактивация в составе Т-ДНК приводит к полному подавлению синдрома (White et al., 1985). Кроме того, *rolB* индуцирует формирование меристемных зон, действуя как сильный индуктор морфогенеза (Altamura et al., 1998; Altamura, 2004). Недавно в *rolC*-трансгенных клеточных культурах *Panax ginseng* C. A. Meyer также были обнаружены свидетельства органогенеза и соматического эмбриогенеза, вызванные экспрессией трансгена (Gorpenchenko et al., 2006).

Растения, трансформированные генами *rol*, демонстрировали измененный фитогормональный статус. Так, *rolA* значительно понижает уровень ауксина, цитокинина, гиббереллина и абсцизовой кислоты в растениях табака (Dehio et al., 1993). Ген транскрибируется, в основном, в клетках флоэмы и в стеблях, меньше – в корнях и листьях (Sinkar et al., 1988; Carneiro, Vilaine, 1993). Белок

RolA не имеет известных гомологов, однако, его вторичная структура имеет сходство с одним из доменов папилломавируса, а сам он обладает способностью связываться с ДНК (Rigden, Carneiro, 1999). Однако имеющиеся данные о локализации белка свидетельствуют о его ассоциации с цитоплазматической мембраной (Vilaine et al., 1998). И хотя достоверно биохимическая функция белка RolA неизвестна, экспрессия гена приводит к уменьшению содержания некоторых гормонов (ауксинов, цитокининов, гиббереллинов, этилена и абсцизовой кислоты) (Dehio et al., 1993).

Эффекты *rolB* связывают со способностью гена регулировать восприятие/чувствительность клеток к ауксинам. В промоторной области *rolB*, как и *rolD*, обнаружен сайт связывания с транскрипционными факторами NtBBF1 и RBF1, чувствительными к ауксинам (De Paolis et al., 1996), а добавление экзогенного ауксина приводило к активному синтезу транскриптов *rolB*. Однако было показано, что белок RolB не изменяет внутриклеточную концентрацию ауксинов (Delbarre et al., 1994) и в настоящее время установлено, что продукт гена обладает тирозинфосфатазной активностью (Filippini et al., 1996). Предполагают, что RolB может активировать экспрессию ауксин-связывающих белков и/или увеличивать их активность (Venis et al., 1992).

У трансгенных растений *Nicotiana tabacum* L. белок RolB штамма pRiA1724 локализован в ядерной мемbrane и способен взаимодействовать с белком Nt14-3-3ωII. Причем у обоих белков отсутствуют сигналы ядерной локализации, и, вероятно, они оба взаимодействуют с некоторыми членочными белками для транспорта в ядро. Возможно, в этом случае продукт гена *rolB* играет роль транскрипционного коактиватора или вторичного мессенджера (Moriuchi et al., 2004).

Ген *rolC* обнаружен во всех изученных штаммах *A. rhizogenes* и является самым консервативным из всех генов *rol* (Dandecar et al., 2008). Экспрессия гена *rolC* орган-специфична и максимальна в корнях, уменьшаясь в ряду корни-стебель-цветки-листья. Примечательно, что накопление транскриптов во всех органах происходит в клетках флоэмы (Guivarc'h et al., 1996). Обработка

сахарозой приводила к активации *rolC* и в других тканях, а позднее в промоторной области гена был обнаружен сайт, чувствительный к сахарозе (Sugaya, Uchimiya, 1992; Yokoyama et al., 1994; Nilsson et al., 1996). Было высказано предположение, что RolC использует сахарозу в качестве субстрата, что может способствовать делению клеток (Nilsson, Olsson, 1997). В другой серии экспериментов была установлена специфическая β -глюкоглиптическая активность белка RolC, что приводит к высвобождению цитокининов из комплексов с глюкозидами и изменению гормонального баланса (Estruch et al., 1991). Тем не менее, несмотря на достигнутые успехи, точных представлений о биохимической активности белкового продукта *rolC* на сегодняшний день нет.

В отличие от других генов, для *rolD* не характерна тканеспецифичность экспрессии, однако, его активность значительно изменяется в течение цикла развития растения: наибольшая активность гена обнаруживается в растущих органах, но никогда – в апикальной меристеме, и снижается по мере старения растения (Trovato et al., 1997). Аминокислотная последовательность RolD схожа с бактериальной орнитин циклодеаминазой, осуществляющей превращение орнитина в пролин, в связи с чем была высказана гипотеза о том, что фенотип *rolD*-трансгенных растений вызван изменениями в продукции пролина (Trovato et al., 2001).

1.2.2. Гены *rol* – активаторы вторичного метаболизма

Исследование феномена «бородатых корней» привело к накоплению данных о способности генов *rol* активировать продукцию антрахинонов (Shin, Kim, 1996), гинзенозидов (Kunshi et al., 1998), гинкголидов (Ayadi, Tremouillaux-Guiller, 2003) и других вторичных метаболитов в культурах более чем 12 различных семейств растений (Bonhomme et al., 2000; Li et al., 2009; Shinde et al., 2009; Lan, Quan, 2010; Chandra, 2012). Функции вторичных метаболитов в растении очень обширны: они регулируют процессы роста и дифференцировки клеток растений, защищают их от поедания животными,

оказывают антимикробное действие, а кроме того, выделяясь в атмосферу в виде летучих эфиров, могут осуществлять передачу сигнала об опасности, активируя защитные реакции в здоровых растениях (Maleck, Dietrich, 1999; Demain, Fang, 2000).

Анализ функций индивидуальных генов Т-ДНК установил, что два гена – *rolB* и *rolC* – являются наиболее эффективными индукторами вторичного метаболизма (Bulgakov et al., 1998; Palazón et al., 1998; Bonhomme et al., 2000; Bulgakov et al., 2002; Shkryl et al., 2008). Сравнение эффектов индивидуальных генов в культурах *R. cordifolia* позволило установить, что ген *rolB* обладает самым сильным стимулирующим действием, увеличивая продукцию антрахинонов в 15 раз, но, в отличие от *rolC*, значительно ингибирует клеточный рост (Shkryl et al., 2008). В трансформированных культурах *Vitis amurensis* экспрессия *rolB* активировала продукцию резвератрола, и уровень активации коррелировал с силой экспрессии трансгена (Kiselev et al., 2007). Аналогичный эффект активации наблюдался в *rolC*-трансформированных культурах табака (Palazón et al., 1998), женьшения, где уровень продукции гинзенозидов достигал значений, близких к биосинтетическому максимуму клеток (Bulgakov et al., 1998), и марены сердцелистной, где увеличение экспрессии *rolC* сопровождалось увеличением содержания антрахинонов и активацией гена изохоризматсинтазы – ключевого гена их биосинтеза (Shkryl et al., 2008). Однако известен и обратный эффект экспрессии *rolC*. Например, в культурах *Eritrichium sericeum* он ингибировал продукцию нафтохинонов в течение 10 лет культивирования (Bulgakov et al., 2005). В совокупности эти данные указывают на способность генов *rol* регулировать экспрессию генов биосинтетических путей вторичного метаболизма, вероятно, посредством взаимодействия с соответствующими транскрипционными факторами (Bulgakov et al., 2013).

Трансформация генами *rol* является эффективной стратегией стимуляции вторичного метаболизма, особенно в тех случаях, когда классические методы (селекция, добавление элиситоров и биосинтетических предшественников) не

оказывают влияния. Примечательно, что уровень активации варьирует в зависимости от типа вторичных метаболитов и вида растения (Bulgakov, 2008а). В ходе изучения механизмов активации вторичного метаболизма генами *rol*, было сделано несколько важных наблюдений. Во-первых, они выполняют свои регуляторные функции не затрагивая традиционных сигнальных путей. В частности, было выдвинуто предположение о возможном пересечении метаболических путей генов *rol* и традиционных индукторов вторичного метаболизма (этилена, салициловой и жасмоновой кислот), однако, их добавление не оказало эффекта на биосинтез вторичных метаболитов в трансформированных культурах (Bulgakov et al., 2002). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии взаимосвязи между этими молекулами и генами *rol*. Во-вторых, на примере клеточных культур *R. cordifolia* показано, что каждый из генов имеет индивидуальные регуляторные механизмы, определяющие степень активации вторичного метаболизма (Shkryl et al., 2008). В-третьих, оказалось, что экспрессия генов *rol* сопровождается значительными изменениями во всем защитном аппарате растительного организма, воздействуя на сигнальные системы, контролирующие редокс-статус клетки и, как следствие, устойчивость трансформированных растений.

1.4. Влияние генов *rol* на защитную систему клетки

Окислительно-восстановительный баланс клетки является важным показателем ее жизнеспособности, особенно, в условиях постоянного стресса, вызванного экспрессией чужеродных генов. Как правило, в случае стрессового воздействия наблюдается повышение уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК), которые являются медиаторами различных защитных путей и выполняют сигнальную функцию, а кроме того, оказывают стимулирующий эффект на биосинтез вторичных метаболитов (Jacobo-Velázquez et al., 2015).

Результаты исследования редокс-статуса клеток, трансформированных генами *rol*, оказались противоречивыми – в *rolB*- и *rolC*-трансформированных

клеточных культурах растений уровень внутриклеточных АФК был значительно ниже, чем в контроле, тогда как их совместная экспрессия изменяла его незначительно (Bulgakov et al., 2008b; 2012). Исследование этого феномена привело к открытию двух разных механизмов индуцируемого понижения уровня АФК. Так, *rolB* активирует экспрессию генов НАДФН-оксидазы – фермента, генерирующего АФК и генов антиоксидантных ферментов – каталазы, аскорбатпероксидазы и супероксиддисмутазы, осуществляющих своевременную деградацию новообразованных АФК, а *rolC*, напротив, ингибирует экспрессию генов как АФК-генерирующих, так и АФК-элиминирующих ферментов (Bulgakov et al., 2013). Также обнаружено, что в *rolC*-трансформированных культурах *Panax ginseng*, *Vitis amurensis* и *Eritrichium sericeum* изменялась экспрессия генов кальцийзависимых протеинкиназ и появлялись укороченные транскрипты с последовательностями, соответствующими Ser/Thr субдоменам (Kiselev et al., 2008). Модуляция активности кальцийзависимых протеинкиназ имеет особенное значение, поскольку эти ферменты являются известными регуляторами активности ферментов НАДФН-оксидаз (Kobayashi et al., 2007; Takahashi et al., 2011; Kimura et al., 2012).

Исследования устойчивости трансформированных культур растений к абиотическим стрессам показали, что сверхэкспрессия индивидуальных генов *rol* увеличивает устойчивость клеток к действию низких/высоких температур, аргонового лазера и высоких концентраций NaCl (Bulgakov et al., 2008b; 2012). Низкий уровень внутриклеточных АФК, обусловленный экспрессией *rolB* и *rolC*, предотвращал окислительные повреждения, которые являются главным фактором клеточной гибели при абиотическом стрессе (Bulgakov et al., 2013). Кроме того, в *rolB*-трансформированных клетках экспрессия трансгена предотвращала индукцию апоптоза (Gorpenchenko et al., 2012). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о дуализме действия генов *rol*: с одной стороны, понижая уровень внутриклеточных АФК, они ослабляют иммунитет растительного организма, лишая его эффективной сигнальной системы; с

другой – активируют защитные механизмы, способствующие увеличению устойчивости и адаптации растений к неблагоприятным условиям.

Согласно современным представлениям, характер модуляции уровня АФК генами *rol* схож с неспецифичными механизмами патогенеза, что, вероятно, объясняется природой их происхождения (Bulgakov et al., 2013). В этом случае важную роль в обеспечении резистентности растительного организма выполняют патоген-обусловленные белки (PR-белки), которые активируются в процессе патогенеза (Stintzi et al., 1993).

1.3. Роль PR-белков и активных форм кислорода при патогенезе

Реализация защитных функций на первых этапах патогенеза в растении осуществляется комплексно и носит системный характер. В результате восприятия сигнала извне наблюдается быстрая транзиторная генерация активных форм кислорода (АФК) – окислительный взрыв – одна из самых первых неспецифических реакций, необходимых для запуска большинства защитных сигнальных путей (Hammond-Kosack, Jones, 1996). Этот процесс сопровождается активацией экспрессии защитных генов, включая гены ферментов биосинтеза вторичных метаболитов с выраженным фунгицидными и бактерицидными свойствами (Полесская, 2007). В ответ на атаку патогена также включаются ранее «молчавшие» гены, экспрессия которых связана исключительно с инфекцией. Эти гены кодируют синтез *de novo* патоген-обусловленных белков как в месте поражения, так и в тканях, удаленных от источника инфекции (Bell et al., 1986; Somssich et al., 1986).

В зависимости от их биохимических и молекулярных особенностей, PR-белки подразделяются на 17 семейств (Sudisha et al., 2012). Они реализуют различные механизмы защиты клеток, наиболее ранним из которых является усиление образования АФК, особенно супероксидрадикала и перекиси водорода – их накопление в месте внедрения патогена провоцируют гибель клеток – так называемый *гиперчувствительный ответ*, тогда как их миграция в

здоровые ткани способствует развитию системной устойчивости (Alvarez et al., 1998). Вероятно, что в обоих случаях ведущую роль выполняет перекись водорода, которая, в отличие от других форм АФК, отличается высокой стабильностью и способна диффундировать на значительные расстояния от места генерации (Levine et al., 1994; Vanacker et al., 2000).

Множественные эффекты перекиси водорода (H_2O_2) при инфицировании растений известны и хорошо изучены: она оказывает прямую бактерицидную активность в сайтах проникновения патогена (Peng, Kud, 1992), способствует укреплению клеточной стенки, а также регулирует синтез фитоалексинов (Lamb et al., 1989). Перекись используется для окислительного сшивания богатых гидроксипролином белков клеточной стенки (Bradley et al., 1992) и участвует в усилении их нерастворимости, что делает полимеры более устойчивыми к ферментам патогенов и ограничивает доступность питательных веществ (Otte, Barz, 1996). Совместно с салициловой кислотой перекись может инициировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ), что служит сигналом для запуска защитных реакций и развития системного ответа в здоровых тканях растения (Chen et al., 1993; Martinez et al., 2000). Кроме того, в результате деградации липидов образуются фитогормоны, например, жасмонат и метилжасмонат, абсцизовая кислота, а также большая группа C_6 - и C_{12} -оксилипинов, которые выполняют защитную и сигнальную функции при атаке патогена (Feussner, Wastonack, 2002). В результате этих изменений растение выживает и приобретает системную устойчивость к последующему инфицированию данным патогеном. В то же время, взаимодействуя с NO , перекись может вызывать запрограммированную гибель клеток (апоптоз), ограничивая распространение инфекции (Wang et al., 2006; Lombardi et al., 2010; Lin et al., 2012).

Существуют четыре механизма образования H_2O_2 при патогенезе, три из них реализуются на уровне матрикса клеточной стенки и включают участие пероксидазы, полигидроксилазы и оксалат оксидазы, один – на уровне поверхности плазматической мембранны и опосредован действием НАДФН-

оксидазы (Удинцев и др., 2011). Из всех перечисленных ферментов, участвующих в индукции системной устойчивости, большой интерес вызывают пероксидазы, которые включают три класса ферментов, отличающихся по функциям и строению. К пероксидазам I класса относятся бактериальные пероксидазы, хлоропластные и цитозольные аскорбатпероксидазы высших растений и митохондриальные цитохром С пероксидазы дрожжей, ко II – пероксидазы грибов, а к III классу – секреторные растительные пероксидазы, которые нельзя отнести к аскорбатпероксидазам (Almagro et al., 2009). Последний класс ферментов представлен группой белков, которые отнесены к патоген-связанным белкам семейства PR-9 и известны своими защитными свойствами.

1.4. Растительные пероксидазы III класса: структурные и каталитические особенности

Растительные пероксидазы III класса (КФ 1.11.1.7) относятся к группе гликозилированных белков весом от 28 до 60 кДа, в составе которых имеются гем, представленный протопорфирином IX, два иона кальция и одна полипептидная цепь (Wang et al., 2015). Последняя включает от 203 до 308 аминокислот и формирует компактную третичную структуру в форме глобулы, содержащей 43% α -спиральных участков (Strickland, 1968), и представленную двумя доменами – большим и малым (Welinder et al., 1985). За формирование третичной структуры отвечают восемь остатков цистеина, формирующие между собой дисульфидные связи (Hiraga et al., 2001). В составе ферmenta три консервативных домена – центральный домен неизвестной функции (Buffard et al., 1990), каталитический гистидиновый и проксимальный гем-связывающие домены (Hiraga et al., 2001). Гем нековалентно закреплен в углублении полипептидной цепи между доменами и удерживается там за счет гидрофобных связей (Угарова и др., 1978). В позициях 40, 42 и 170 содержатся три остатка гистидина, последний из которых является проксимальным лигандом железа и

отвечает за прочное связывание гема в активном центре (Газарян и др., 2006). Полагают, что His170 образует водородную связь с остатком Asp247, что увеличивает его основность, облегчает стабилизацию заряда в окисленных формах пероксидазы и поддерживает атом железа с координационным числом 5 (Gajhede et al., 1997). N-терминальный участок содержит сигнальный пептид для транспорта через эндоплазматический ретикулум (Cesarino et al., 2013), а в C-терминальном участке может располагаться удлинение, характерное только для вакуолярных пероксидаз (Hiraga et al., 2001).

Установление кристаллической структуры пероксидазы арахиса (Schuller et al., 1996), рекомбинантной пероксидазы хрена (Gajhede et al., 1997), пероксидазы ячменя (HenrikSEN, et al., 1998) и двух изоформ фермента из арабидопсиса (Nielsen et al., 2001) позволили предложить механизм, описывающий гетеролитическое расщепление перекиси водорода и ее последующее восстановление молекулой фенольного субстрата. Главную роль в этом процессе играют дистальные остатки His42 и Arg38: His42 отвечает за расщепление H_2O_2 , а Arg38 участвует в стабилизации восстановленных соединений и в связывании ароматических субстратов, а также играет важную роль в связывании и ориентировании доноров электронов в активном центре фермента (Bhattacharyya et al. 1993). Кроме того, His42 соединен водородными связями с аминокислотными остатками Asn70 и Glu64, что обеспечивает каталитическую активность фермента (Nagano et al., 1995).

Основной функцией пероксидаз III класса является участие в процессах генерации и детоксикации активных форм кислорода (Passardi et al., 2004). В присутствии перекиси водорода пероксидазы окисляют электрон-донорные субстраты, в первую очередь, полифенольной структуры, преобразуя излишки перекиси в воду, а также участвуют в утилизации активных форм азота (Yonetani et al., 1972; Ascenzi et al., 1989). Однако при избытке субстратов, обладающих высоким восстанавливающим потенциалом, пероксидазы начинают проявлять оксигеназную активность, катализируя генерацию H_2O_2 (Passardi et al., 2007). Кроме этого известно о способности пероксидаз

участвовать как в образовании гидроксилрадикала (Chen, Schopfer, 1999), так и гидропероксила (Francoz et al., 2014), что возможно благодаря наличию у фермента нескольких редокс-состояний (Газарян и др., 2006).

1.6. Разнообразие функций пероксидаз III класса

В растениях пероксидазы III класса представлены большими мультигенными семействами: 138 форм генов обнаружено у *Oriza sativa*, 73 формы – у арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*), 181 – у эвкалипта (*Eucalyptus grandis*) и 143 – у брахиподиума (*Brachypodium distachyon*) (Fawal et al., 2013). Наличие большого количества изоформ, двух возможных каталитических циклов, а также широкий спектр потенциальных субстратов указывают на участие пероксидаз во многих физиологических процессах на протяжении всей жизни растений.

1.6.1. Пероксидазы III класса в жизненном цикле растений

Пероксидазы, как и другие PR-белки, всегда присутствуют в растениях в определенном количестве и принимают участие во многих процессах, связанных с ростом и развитием растения (Удинцев и др., 2011). Уже на первых стадиях – при прорастании семян – наблюдается увеличение экспрессии генов пероксидаз. Так, например, в прорастающих семенах томата, когда эндосперм особенно подвержен поражению патогенами, генерация гидроксильных радикалов $\cdot\text{OH}$, осуществляемая пероксидазами, особенно важна для его защиты и поддержания жизнеспособности (Morohashi, 2002). Кроме того, аккумуляция гидроксильных радикалов облегчает разрыв семенной оболочки при прорастании семени (Passardi et al., 2004). Пероксидазы создают градиент H_2O_2 , инициируя растяжение клеток и ограничивая их рост по достижению определенных размеров в тканях листьев (Abarca et al., 2001), корней (Joo et al., 2001) и гипокотелей (Schopfer, 1994; Dunand et al., 2003). В период роста

наблюдается ауксин-индуцируемая генерация пероксидазами супероксидрадикала, который вызывает разрыхление клеточной стенки и способствуют процессу растяжения (Passardi et al., 2004), тогда как аскорбат, напротив, оказывает ингибирующее действие на активность пероксидаз (Córdoba-Pedregosa et al., 1996). Пероксидазы также принимают участие в процессе созревания плодов – в этот период активность этих ферментов увеличивается и они регулируют не только плотность клеточной стенки, но и окраску плода (Andrews et al., 2000). На более поздних стадиях жизненного цикла пероксидазы могут участвовать в генерации супероксидрадикалов, которые провоцируют запуск свободнорадикальных процессов, ассоциированных с переходом в фазу старения (Abarca et al., 2001).

1.6.2. Роль пероксидаз при стрессах различного происхождения

Пероксидазы и биотический стресс. Пероксидазы являются индуцируемыми ферментами, реагируя на самые разнообразные воздействия, либо изменяя при этом набор своих изоферментов, либо повышая активность уже присутствующих молекулярных форм. Наряду с НАДФН-оксидазами, они являются одним из главных источников АФК при развитии окислительного взрыва в клетках арабидопсиса (Torres et al., 2002; O'Brien et al., 2012; Daudi et al., 2012), каштана (*Castanea sativa*) (Roach et al., 2010), моркови (*Daucus carota*) (Wally, Punja, 2010) и других (Blee et al., 2001; Ranieri et al., 2003; Li et al., 2010). Инокуляция растений капусты (*Lactuca sativa*) патогеном приводила к быстрому увеличению уровня перекиси и активацией апопластных пероксидаз, в месте проникновения патогена (Bestwick et al., 1998). Аналогичный эффект активации пероксидаз наблюдали при инфицировании других растений (Yi, Hwang, 1998; el-Turk et al., 1996).

Большая часть пероксидаз клеточной стенки связана с ней ионными или ковалентными связями, однако, на поверхности клеток растений присутствуют пероксидазы, которые при контакте с патогеном способны легко отделяться и

циркулировать по апопласту всего растения, запуская реакции иммунного ответа (Минибаева, Гордон, 2003). Авторами установлено, что индукция отсоединения слабосвязанных форм пероксидаз происходит в результате контакта тиоловых групп и железосодержащих кластеров ферментов с молекулами супероксидрадикалов. Аналогично, в инфицированных растениях риса (*Oryza sativa*) наблюдалась активация одной изоформы пероксидазы в клетках паренхимы ксилемы, которая затем секретировалась в сосуды и накапливалась в поровых мембранах, представляющих мишень при проникновении патогена внутрь растения (Hilaire et al., 2001). Таким образом, растения могут реагировать на присутствие патогена либо изменения активность фермента, либо высвобождая пероксидазы из связанного состояния.

Защитная роль отдельных изоформ пероксидаз при абиотическом стрессе. Активация пероксидаз является известной реакцией на абиотический стресс (Park et al. 2003; Passardi et al., 2005). Благодаря методам ДНК-микрочипов и гетерологичной экспрессии стало возможным определить специфические функции некоторых изоформ пероксидаз. Так, 14 изоформ пероксидаз, как минимум, реагируют на присутствие солей металлов, в частности, алюминия (Richards et al., 1998; Kumari et al., 2008), кадмия (Weber et al., 2006; Kumari et al., 2008) и мышьяка (Abercrombie et al., 2008). Установлено, что AtPrx22 реагирует на дефицит фосфора (Kang et al., 2004), AtPrx28 и AtPrx37 участвуют в защите от насекомых и паразитов (Tung et al., 2005; Vieira Dos Santos et al., 2003), а AtPrx71 – в адаптации к гипоосмотическим условиям (Rouet et al., 2006). Три изоформы – AtPrx21, AtPrx62, и AtPrx71 – индуцировались не только в ответ на присутствие грибного патогена (Chassot et al., 2007) и при поранениях (Cheong et al., 2002), но и при других типах абиотического стресса (Weber et al., 2006; Little et al., 2007; Mohr, Cahill, 2007; Kumari et al., 2008), что свидетельствует об их участии в реакциях неспецифического иммунитета. Среди пероксидаз также можно обнаружить изоформы, чувствительные к отдельным стрессовым факторам, например,

AtPpx3 реагирует на низкие температуры (Llorente et al., 2002), а AtPrx33 и AtPrx34 – на присутствие патогена (Bindschedler et al., 2006).

1.6.3. Лигнификация и суберизация клеточной стенки

В процессе индукции резистентности участие пероксидаз определяется не только генерацией высокотоксичных молекул H_2O_2 , но и установлением структурных барьеров в результате стимуляции процессов лигнификации и суберизации клеточной оболочки.

Лигнификация, осуществляемая пероксидазами III класса, играет чрезвычайно важную роль в защите растительных тканей от патогенов (Heitefuss, 2001). Известно, что формирование лигнина вокруг инфекционных структур является одним из основных механизмов защиты растений на пути проникновения грибных фитопатогенов (Удинцев и др., 2011). В растениях имеются белки, способные специфически связываться с хитином и глюканом клеточной стенки фитопатогенных грибов, – лектины, хитиназы и глюканазы (Лахтин, 1994). Однако непосредственно в процессах лигнификации эти белки не участвуют, тогда как пероксидазы обладают способностью катализировать полимеризацию фенольных соединений с образованием лигнина (Kawano, 2003; Keren-Keiserman et al., 2004).

Лигнин является одним из главных компонентов вторичной клеточной стенки и состоит из трех основных мономеров ароматической природы: н-кумарового, кониферилового и синапового спиртов, называемых монолигнолами. И поскольку фенольные соединения – одна из основных мишеней действия пероксидазы в клеточной стенке, эти ферменты принимают самое активное участие в их метаболизме. Так, пусковым механизмом для инициации биосинтеза лигнина служит образование пероксидазами (и/или лакказами) молекул пероксида водорода, после чего активируется пероксидазный цикл образования феноксильных радикалов и их окисления с образованием полимеров лигнина (Рогожин, 2004). Вместе с клетчаткой,

воскообразными веществами и церином, он формирует механический барьер, который не только ограничивает водный обмен и поступление питательных веществ в зону проникновения патогенных микроорганизмов, но и защищает растение в условиях избыточного испарения, низких температур и при механических повреждениях (Moura et al., 2010).

Суберин откладывается в перидерме и между стенками клеток энтодермы в виде восковых утолщений – так называемых Каспаровых полос (Francoz et al., 2014). Суберизация помогает избежать избыточной потери влаги в условиях засухи, а кроме того, является важным репаративным механизмом при поранениях (Borchert, 1978; Kolattukudy, 1980). Суберин относится к сложным полимерам нерегулярного строения, и кроме ароматических элементов содержит жирнокислотные и иногда глицерин. Ароматический компонент суберина отчасти напоминает лигнин, но помимо монолигнолов, в него могут входить оксикоричные кислоты и их производные, например, ферулоилтирамин (Bernards et al., 2004). Главная роль в биосинтезе суберина отведена трансферазам (Bernards, Lewis, 1998), однако, некоторые анионные пероксидазы также участвуют в сборке ароматических компонентов подобно тому, как это происходит при биосинтезе лигнина, только с использованием других субстратов (Bernards et al., 1999; Keren-Keiserman et al., 2004; Arrieta-Baez, Stark, 2006). В пользу участия пероксидаз в процессах суберизации также свидетельствуют иммуноцитохимические (Espelie et al., 1986) и биохимические (Bernards et al., 1999) данные об их локализации.

В процессе индукции резистентности пероксидазы выполняют целый ряд сопутствующих функций по укреплению клеточной стенки: осуществляют сшивание структурных белков экстенсинов (Jackson et al., 2001), димеризацию феруловой кислоты (Schweikert et al., 2000; Fry, 2004) и тирозиновых остатков белковых молекул (Chen et al., 2002), а также катализируют образование сшивок между различными полимерами (полисахаридами, белками, лигнином, суберином), содержащими фенольные компоненты (Удинцев и др., 2011).

1.6.4. Регуляция катаболизма ауксинов

Пероксидазам, как окислительно-восстановительным ферментам, принадлежит важная роль в регуляции содержания эндогенных физиологически активных веществ, в частности, ауксинов и фенольных соединений (Шуканов и др., 2012). Несмотря на то, что о способности пероксидаз катализировать окисление ауксинов *in vitro* известно давно (Gaspar et al., 1982; Beffa et al., 1990), существование взаимосвязи между пероксидазами и ауксинами *in vivo* долгое время подвергалось сомнениям (Lagrimini et al., 1992; Kerk et al., 2000). Тем не менее, в последние годы были получены данные, позволяющие утверждать, что ауксины способны сильно и разнонаправлено влиять на активность разных изоформ пероксидаз. В частности, установлено влияние анионной апопластной изоформы пероксидазы кабачка *CpPrx01* на эндогенный уровень индолилуксусной кислоты (ИУК) (Cosio et al., 2009). Сверхэкспрессия этого гена в трансгенных растениях *A. thaliana* приводила к значительному уменьшению уровня внутриклеточной ИУК, тогда как антисмысловая супрессия гена вызывала обратный эффект. Кроме того, сверхэкспрессия гена сопровождалась увеличением содержания конъюгата ИУК и аспартата – известного продукта распада ауксинов (Woodward, Bartel, 2005). Окисление ауксинов пероксидазами способствует генерации свободных радикалов, и, как следствие, активации перекисного окисления липидов. В семенах эти процессы сопровождаются возрастанием дыхания, повышением общего уровня метаболизма и прорастанием (Андреева, 1988; Рогожин, 2004).

В то же время имеются и противоположные данные о регуляции пероксидаз ауксинами (Gutiérrez et al., 2009). В частности, известно о способности ИУК модулировать активность пероксидаз, участвующих в лигнификации клеток ксилемы (Ros Barcelo, Munoz, 1992). Обработка ауксинами в низких концентрациях приводит к увеличению активности пероксидаз в клетках гипокотеля люпина и арабидопсиса (Ferrer et al., 1991; Cosio et al., 2009). Недавно установлена способность ИУК в физиологической

концентрации 1 мкМ активировать фермент *in vivo* (Пожванов и др., 2010). Однако активация пероксидаз ауксинами, вероятно, носит дозо-зависимый характер, поскольку в экспериментах с добавлением 2,4-дихлорфеноксусной кислоты (2,4-Д) эффект снимался с увеличением концентрации фитогормона и приводил к уменьшению уровня мРНК *APRX* (Cosio et al., 2009). Аналогично, присутствие высоких концентраций ауксинов ИУК, 2,4-Д и нафтил- α -уксусной кислоты (АНУ) приводило к подавлению биосинтеза и снижению ферментативной активности разных фракций пероксидаз в клеточных культурах ели (*Picea abies*) (Mensen et al., 1998). Более того, в присутствии ауксинов отсутствовала патоген-индуцируемая активация пероксидаз клеточной стенки, что вызывало ослабление иммунитета и способствовало инфицированию растительных клеток (Mensen et al., 1998). В пользу этих данных также свидетельствует наличие в промоторной области *APRX cis*-элементов, содержащих чувствительные к ауксинам последовательности (Cosio et al., 2009). Аналогично, в промоторной области гена *AtPrx52* находятся сайты связывания транскрипционных факторов, активируемых фитогормонами, а также установлено, что ауксины могут напрямую активировать *AtPrx52* (Herrero et al., 2014).

1.6.5. Участие в биосинтезе вторичных метаболитов

Пероксидазы принимают участие в биосинтезе фитоалексинов – соединений, обладающих antimикробными и/или противогрибковыми свойствами. Показано, что пероксидазы катализируют реакции биосинтеза стильбенов у винограда (*Vitis vinifera*) (Ros Barceló, Pomar, 2002); фенольных фитоалексинов – у овса (*Avena sativa*) (Okazaki et al., 2007); изофлавоноидов – у люцерны (*Medicago truncatula*) (Farag et al., 2008). Пероксидазы также катализируют процессы образования вторичных метаболитов, обладающих фармакологическими свойствами, при этом функция этих соединений в растительной клетке достоверно неизвестна. Например, пероксидаза

катарантуса (*Catharanthus roseus*) катализирует димеризацию катарантина и виндолина с образованием ангидровинбластина – основного алкалоида растения (Costa et al., 2008). При иммобилизации клеток протопластов *C. roseus* в агарозном геле также наблюдали стимуляцию синтеза индольных алкалоидов, сопровождающуюся ростом активности пероксидазы и а-галактозидазы, которые аккумулировались в растущей клеточной стенке (Mera et al., 2003).

В то же время, ввиду использования пероксидазами фенольных соединений в качестве субстратов, между уровнем активности ферментов и содержанием вторичных метаболитов может наблюдаться отрицательная корреляция (Savio et al., 2012). Например, изофермент RsPrx1, выделенный из корней редьки (*Raphanus sativus longipinnatus*), использует антиоцианы в качестве субстратов, изменяя при этом окраску тканей растения (Wang et al., 2004). Аналогично, щелочная пероксидаза BcPrx01 катализирует распад антиоцианов в цветках брунфельсии чашевидной (*Brunfelsia calycina*) (Zipor et al., 2015).

Несмотря на то, что функции и субстратная специфичность многих изоформ пероксидаз до сих пор неизвестны, нуклеотидные последовательности генов и аминокислотные последовательности белков пероксидаз III класса имеют очень низкую гомологию между собой, а по количеству изоферментов они превосходят все другие пероксидазы как растительного, так и животного происхождения (Hiraga et al., 2001). Появляется все больше сведений о функциях конкретных изоформ, хотя большинство из них до сих пор являются не охарактеризованными и трудно поддаются изучению ввиду множественности изоформ, которые оказывают компенсаторное действие в мутантах, а также способны окислять большое количество соединений *in vitro*, тогда как мало известно об используемых ими субстратах в условиях *in vivo* (Cosio et al., 2009).

В последние годы отмечен возросший интерес к изучению пероксидаз, что обусловлено не только появлением новых аналитических методов, но также

использованием этих ферментов в биотехнологическом производстве, например, в диагностических и биоаналитических целях, что стало возможным благодаря их необычным катализитическим и химическим свойствам (Ngo, 2010). В связи с этим, в настоящее время активно ведется поиск методов по получению суперпродуцентов и рекомбинантных молекул пероксидаз с заданными свойствами, что является актуальным направлением ввиду использования этих ферментов в самых разнообразных отраслях промышленного производства.

1.7. Области практического применения ферментов пероксидаз

1.7.1. Способы получения растительных пероксидаз

Пероксидаза – один из наиболее востребованных ферментов биотехнологии. Классическим методом получения пероксидаз является их выделение из корней растения, например, хрена (*Armoracia rusticana*) с последующей очисткой методом аффинной хроматографии (Tams et al., 1995). Основным преимуществом этого способа является природное происхождение фермента, однако, недостатками являются продолжительность процесса культивирования и низкая продуктивность – 0.1 мг/г корней (Lavery et al., 2010), сравнительно низкая чистота полученного препарата, разный уровень гликозилирования и неоднородность изоферментного состава (Brattain et al., 1976). Кроме того, процедура очистки сопровождается частичной утратой способности к связыванию, а используемые при этом смолы являются дорогостоящими (Miranda et al., 1998).

Альтернативным источником растительных пероксидаз могут быть микроорганизмы, экспрессирующие соответствующие гены. Так, в 1990 году в клетках *Escherichia coli* впервые была получена неактивная негликозилированная форма пероксидазы хрена C1A, которая в присутствии ионов кальция подвергалась рефолдингу с приобретением ферментативной

активности (Smith et al., 1990). Метод отличался низкой эффективностью – всего 3% успешно активированных пероксидаз от общего количества, но последующие модификации позволили увеличить количество активных пероксидаз до 72% (Bade et al., 2012). Наряду с бактериями, дрожжи (*Pichia pastoris*) представляют высокоэффективную и недорогостоящую систему для производства пероксидаз в промышленных масштабах, но склонны к гипергликозилированию белков, что негативно влияет на эффективность выделения и очистки ферментов (Morawski et al., 2000; Spadiut et al., 2012).

Кроме микроорганизмов, в качестве «фабрик» по производству пероксидаз могут выступать культуры клеток млекопитающих. Так, кДНК пероксидазы хрена экспрессировали в клетках карциномы человека T24 и пероксидазная активность клеток увеличивалась в 60 раз (Greco et al., 2000). Безусловным преимуществом метода является производование ферментов с паттерном гликозилирования схожего с таковым у пероксидаз человека, однако продукция ферментов при этом составляла всего 18 ± 1 пг/мкг тотального белка. Стоит отметить, что низкая продуктивность – один из главных ограничивающих факторов использования рекомбинантных систем, среди которых наиболее эффективной является культура дрожжей *P. pastoris* – с ее помощью возможно получение около 50 мг пероксидазы C1A в расчете на литр среды за 60 ч ферментации (Zalai et al., 2012).

Пероксидаза хрена является одним из наиболее широко используемых ферментов в диагностических и биоаналитических целях, однако в отдельных случаях их использование может быть ограничено ввиду недостаточной стабильности или отсутствия активности в определенных диапазонах рН. Это обусловило поиск пероксидаз из других источников (Agostini et al., 2002; Sakharov et al., 2003) и создание рекомбинантных молекул ферmenta с измененными свойствами. Методом генетической инженерии была сконструирована рекомбинантная молекула пероксидазы хрена, в которой два сайта гликозилирования – Asn13 и Asn268 – были заменены на аминокислотные остатки аспаргиновой кислоты (Asp) (Asad et al., 2011). Данные мутации

повлияли на уровень продукции пероксидазы, а также привели к изменению каталитических констант, увеличению степени сродства к H₂O₂ и устойчивости к высоким температурам (Asad et al., 2011). Также получены мутантные формы пероксидазы табака – введение мутации Glu141Phe позволило увеличить выход реактивации с 7 до 30%, а фермент отличался повышенной чувствительностью и был активен при pH 1.8 (Castillo et al., 2006). Кроме рассмотренных примеров мутагенеза, известны химические модификации простетических групп и белковых групп моно- и бифункциональными реагентами, влияющие на активность и субстратную специфичность фермента (Zakharova et al., 2011). На основе мутантных пероксидаз хрена также создают комплексы ферментов с антителами и белковыми антигенами с целью использования в иммуноферментном анализе (Lindbladh et al., 1993). Такие рекомбинантные конъюгаты обладают рядом преимуществ по сравнению с химически полученными, так как они гомогенны по составу, имеют 1:1 стехиометрию, воспроизводимы и полностью сохраняют как ферментативную, так и иммунологическую активность (Egorov et al., 2013). Актуальной темой также является создание безреагентных биосенсоров третьего поколения на основе рекомбинантных пероксидаз (Захарова и др., 2011).

1.7.2. Использование пероксидаз в иммуноферментном анализе

В отличие от других высокоспецифичных пероксидаз, представители III класса способны катализировать окисление широкого спектра хромогенных субстратов от малых молекул до белковых макромолекул (Hiraga et al., 2001). Это свойство, а также высокая чувствительность, позволяют использовать их в различных системах обнаружения и мониторинга медицинского назначения, открывая путь к широкому спектру аналитических методов.

Ковалентные конъюгаты белков, антител и других молекул с пероксидазой хрена обладают долговременной стабильностью и предлагают широкий спектр усилительных возможностей, представляя собой полезный и

универсальный инструмент для сверхчувствительного обнаружения в иммуно-, гисто- и цитохимических приложениях. Пероксидазы служат в качестве ферментных меток для детекции и количественного определения антигенов и антител в самых различных видах диагностики, включая иммуноферментный твердофазный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг и иммуноцито(гисто)химические реакции по установлению локализации антигенов. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) с меченными пероксидазой антителами измеряют уровень фактора некроза опухоли-α (Berkova et al., 1996), вирус гепатита Е (Zhuang et al., 2001), а также токсины различного происхождения (Barna-Vetro et al., 1996; Kawamura et al., 1989; Kawatsu et al., 2002). Аналогичным образом пероксидазы используют при идентификации белков с помощью вестерн-блоттинга (Kumada et al., 2002), в био- и хемилюминисцентном иммуноферментном анализе для определения метаболитов, находящихся в пробе в минорных концентрациях (Kuroda et al., 2001; Yavo et al., 2001; Roda et al., 2002). Использование фермента в качестве метки не уступает по чувствительности радиоактивной, но является более безопасной, экологичной и дешевой альтернативой последней (Azevedo et al., 2003). Кроме того, пероксидазные конъюгаты более стабильны и обладают более длительным сроком жизни.

Широко используют пероксидазы для биохимического анализа крови. Например, ферментный метод на основе индивидуальной иммобилизации ферментов холестеролоксидазы, холестеринэстеразы и пероксидазы для определения уровня холестерина в крови позволил вдвое снизить порог детекции, был более стабильным и доступным по сравнению с ранее апробированным колориметрическим методом (Malik, Pundir, 2002). Пероксидазу хрена используют для обнаружения 8-оксо-2'-дезоксигуанозина – окисленного основания ДНК, биомаркера многих заболеваний, включая рак предстательной железы (Chiou et al., 2003), болезнь Паркинсона (Sato et al., 2005), диабет и некоторые аутоиммунные заболевания (Lisitsyna et al., 1999; Avouac et al., 2010). Данные о пероксидазной активности также учитывают при

селекции растений – чем выше активность, тем устойчивее к инфекции растение (Шугалей и др., 2010).

1.7.3. Использование пероксидаз в биосенсорах

В последние годы активно развивается направление использования пероксидаз в процедурах электрохимического обнаружения, в частности, при разработке электронных биосенсоров. Эти аналитические приборы находят все более широкое применение в сфере медицинских услуг, пищевой промышленности и мониторинге окружающей среды. Особенно распространены электрохимические биосенсоры, осуществляющие детекцию электрохимического сигнала, генерируемого при контакте фермента и аналита. В связи с характером реакции, катализируемой пероксидазой, электроды с иммобилизованным ферментом используются для определения перекиси и органических гидропероксидов (Jia et al., 2002). Кроме того, возможно tandemное использование пероксидазы и оксидазы в биферментном биосенсоре, что позволяет расширить круг доступных для мониторинга веществ, включая глюкозу, спирты, холестерин, лактат, холин, мочевую кислоту, пируват, некоторые аминокислоты и многие другие (Ruzgas et al., 1995). Использование пероксидаз в отдельных случаях позволяет снизить порог детекции до наномолярных концентраций (Munteanu et al., 1998). На основе рекомбинантных пероксидаз разрабатываются высокочувствительные биосенсоры для определения различных соединений в сложных многокомпонентных смесях, в том числе, при анализе загрязнений окружающей среды (Преснова и др., 2008). Биосенсоры на основе пероксидаз открывают новые возможности для биоэлектрокатализа и электрохимии, а также могут быть использованы для создания систем детекции в режиме реального времени (Schügerl et al., 1996) и изучения кинетики прямого транспорта электронов (Lindgren et al., 2000).

1.7.4. Применение пероксидаз в биотрансформациях

Отдельной отраслью химического производства является ферментативное получение ценных органических и полимерных соединений с необычными свойствами с использованием пероксидаз. Разработан ферментативный метод получения полиэлектролитического комплекса полианилина и сульфонированного полистерена, обладающего выраженными проводниковыми свойствами и используемого при создании оптических дисплеев, светоиспускающих диодов высокого качества и покрытий с антакоррозийными качествами (Raitman et al., 2002; Sakharov et al., 2003). Пероксидазы растений нашли свое применение и в фармацевтике, например, пероксидаза из катарантуса эффективно катализирует полимеризацию катарантина и виндолина с образованием 3',4'-ангидровинбластина – предшественника винбластина и винкристина, которые являются неотъемлемой частью химиотерапии рака (Sottomayor et al., 1998). На основе коллагена, полимеризуемого с пероксидазой хрена, получают биосовместимые полутвердые гели, которые могут быть использованы в качестве герметика при поранениях или связующего агента в приложениях пищевой промышленности (Prochaska et al., 2003). Пероксидазы не менее эффективно способны полимеризовать лигнин, акриламид, производные винила и фенолы (Regalado et al., 2004). Ферментативная полимеризация последних может осуществляться без высокотоксичного формальдегида – обязательного компонента для химической полимеризации (Hutterman et al., 2001), что является несомненным преимуществом пероксидаз.

1.7.5. Другие области применения пероксидаз

Пероксидазы эффективно используют для биоотбеливания в целлюлозно-бумажной промышленности (Michel et al., 1991; Moreira et al., 2003), обесцвечивания и разложения синтетических красителей в текстильной

промышленности (Shin, 2004; Champagne, Ramsay, 2005; Gomes et al. 2009), а также изготовления натуральных ароматизаторов (Zorn et al., 2003; Barbosa et al., 2008). Кроме того, возможно использование пероксидаз в качестве маркеров химического загрязнения природных сред (Стаценко и др., 2008), а также для глубокой очистки сточных вод от ароматических соединений (Tatsumi et al., 1996). В результате ферментативной реакции свободнорадикальной полимеризации пероксидаза хрена обезвреживает фенолы и их производные, являющиеся распространенными загрязняющими агентами (Tatsumi et al., 1996). В химической промышленности пероксидазы находят применение для экологически чистого разложения азо-, гетероциклических и полимерных красителей, ксенобиотиков и пестицидов (Abraham et al. 2002; Ohtsubo et al. 2004; Wen et al. 2009), полициклических ароматических углеводородов и других органических соединений (Köller et al. 2000; Robles-Hernández et al. 2008).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культивирование клеточных культур и растений

В качестве объекта исследований использовали растения, а также нетрансформированные и трансгенные клеточные культуры *R. cordifolia*, *Rh. rosea* и *S. vulgaris*, полученные ранее сотрудниками лаборатории биоинженерии БПИ ДВО РАН.

Растения *R. cordifolia* выращивали в горшках при естественном освещении и температуре 24°C.

Нетрансформированная (контрольная) каллусная культура марены (R) была получена из листьев проростков растения (Bulgakov et al., 2002). Растущая культура представляет собой ткань рыхлой консистенции, светло-желтого цвета, стабильна при длительном культивировании.

Трансгенная культура RA4 получена в результате трансформации диким штаммом A4 *A. rhizogenes*. Клеточная культура желто-оранжевого цвета, гомогенная, без видимых уплотнений.

Трансформированные клеточные культуры с высоким уровнем экспрессии генов *rolB* (RBH) и *rolC* (RCH) получены в результате трансформации штаммом GV3101/pMP90RK *A. tumefaciens*, несущим конструкции pPCV002-35S-*rolB* и pPCV002-35S-*rolC* соответственно (Bulgakov et al., 2002). Первоначально *rolB*-трансгенная клеточная культура характеризовалась высокой степенью гетерогенности и в результате клеточной селекции были получены однородные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии трансгена – RBL, RBM и RBH соответственно (Shkryl et al., 2008). Клеточная культура RBL рыхлая, светло-желтого цвета, RBM – ткань более плотная, светло-оранжевого цвета. Клеточные культуры RBH и RCH имеют темно-красную окраску, ткань характеризуется достаточной твердостью и наличием темных некротических участков.

Культуры марены, трансформированные постоянно активной Ca^{2+} -независимой (R-Ca) и неактивной (R-Na) формами гена Ca^{2+} -зависимой протеинкиназы арабидопсиса *AtCPK1*, получены в результате трансформации штаммом EHA105/pTiBo542 *A. tumefaciens*, несущим конструкции pART27/*AtCPK1-Ca* и pART27/*AtCPK1-Na* соответственно (Xing et al., 2001). Культура R-Na внешне не отличается от контроля, тогда как R-Ca более плотная, оранжевого цвета.

Нетрансформированные культуры *Rh. rosea* и *S. vulgaris* (Rh и S соответственно) получены из соцветия взрослых растений (Bulgakov et al., 2010). Каллусы родиолы культивировали при слабом освещении 150 $\text{мкE} \times \text{м}^{-1} \times \text{с}^{-1}$ с фотопериодом 16 ч в течение 30 дней с последующей пересадкой. Трансгенные культуры родиолы и смолевки (RhB и SB соответственно) получены в результате трансформации штаммом GV3101/pMP90RK *A. tumefaciens*, несущим конструкцию pPCV002-35S-*rolB* (Bulgakov et al., 2010).

Клеточные культуры выращивали в стеклянных пробирках высотой 20 см, с диаметром 2 см, содержащих 15 мл питательной среды. Ткань культивировали при температуре 25°C, относительной влажности воздуха 70%, в темноте, с интервалом субкультивирования 30 суток.

Работу с культурами клеток проводили в стерильных условиях ламинар-бокса. Посуду, инструменты, бумагу стерилизовали в сухожаровом шкафу при температуре 160°C. Для получения, культивирования и всех экспериментов использовали питательные среды (Табл. 1), содержащие макросоли «W» по прописи Уайта (White, 1963) и макро- и микросоли «MS» по прописи Мурасиге и Скуга (Murashige, Skoog, 1962).

Таблица 1
Состав твердой питательной среды «W» и «MS»

Компонент	Мг/л H_2O
NH_4NO_3	400 (W) / 1650 (MS)
HNO_3	1900

CaCl ₂ ×6H ₂ O	665
MgSO ₄	370
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄	16.9
CoCl ₂ ×6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.025
ZnSO ₄ ×7H ₂ O	8.6
NaMoO ₄ ×2H ₂ O	0.25
KI	0.83
FeSO ₄ ×7H ₂ O	27.8
Na ₂ ЭДТА×2H ₂ O	37.3
Пептон	100
Витамин В ₁	0.2
Витамин В ₆	0.5
Витамин РР	0.5
Сахароза	25 000
Вода, дистиллированная	До 1 литра

В качестве регуляторов роста в среду для культивирования каллусов *R. cordifolia* добавляли 0.5 мг/л 6-бензиламинопурина (БАП) и 2.0 мг/л α-нафтилуксусной кислоты (АНУ), для *Rh. rosea* – 5.0 мг/л БАП и 2.0 мг/л АНУ, а для *S. vulgaris* – 0.5 мг/л БАП и 1.0 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Для культивирования каллусных культур в среду также вносили 25 г/л сахарозы и 7 г/л агара. pH среды доводили до 5.6–5.8 при помощи 5% раствора KOH. Стерилизацию сосудов со средой производили в автоклаве при температуре 120°C и давлении 0.8–1.0 атм. в течение 20 минут.

2.2. Идентификация генов пероксидаз III класса

Выделение тотальной растительной РНК. Для выделения тотальной РНК из культур марены сердцелистной использовали методику, оптимизированную для работы с растениями с высоким содержанием вторичных метаболитов (Shkryl et al., 2008). Каждый образец РНК

обрабатывали 1 У ДНКазы I (Силекс, Россия) в соответствии с протоколом и инструкциями фирмы-производителя. Фермент удаляли из реакционной смеси с помощью сорбента BlueSorb (Силекс, Россия), РНК осаждали в 2-х объемах 96% этилового спирта, затем центрифугировали при +4°C на максимальных оборотах. Полученные осадки промывали в 70% этаноле и растворяли в 10—20 мкл бидистиллированной воды.

РНК анализировали в автоматической системе электрофореза Experion (Bio-Rad Laboratories, США) с использованием набора RNA StdSens LabChip® (Bio-Rad Laboratories) согласно рекомендации производителя. Программное обеспечение System operation and data analysis tools версии 3.0 позволило определить концентрацию мРНК в препарате тотальной РНК, вычитая из концентрации последней концентрацию рРНК. Образцы с соотношением мРНК/рРНК в пределах 1.5—2.0 и индикатором качества выше 9.0 использовали для проведения полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

Синтез и амплификация кДНК. Обратную транскрипцию (ОТ) проводили при помощи набора для синтеза первой цепи кДНК с олиго(dT)₁₅-праймером (Силекс, Москва) в объеме 50 мкл, содержащем 2.5 мкг мРНК (рассчитано из концентрации тотальной РНК при помощи Experion) и необходимые компоненты набора, согласно протоколу фирмы-производителя.

Для определения концов кДНК реакцию ОТ проводили при помощи набора «Mint» для синтеза двухцепочечной кДНК, обогащенной полноразмерными последовательностями (Евроген, Россия). Синтез первой цепи кДНК проводили в объеме 10 мкл, содержащем 2.5 мкг мРНК (рассчитано из концентрации тотальной РНК при помощи Experion) и необходимые компоненты набора, согласно протоколу фирмы-производителя. Полученную кДНК амплифицировали с использованием праймера и полимеразы «Encyclo», входящих в состав набора «Mint» в амплификаторе iCycler (Bio-Rad Laboratories), программируемом на следующие условия реакции: предварительная денатурация 95°C – 1 мин; 25 циклов, 95°C – 15 сек, 66°C – 20

сек, 72°C – 3 мин; и финальная элонгация 66°C – 20 сек; 72°C – 3 мин. Результат ПЦР анализировали в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Амплифицированную кДНК использовали в качестве положительного контроля при изучении экспрессии исследуемых генов.

Клонирование участков генов пероксидаз III класса R. cordifolia. Для амплификации последовательностей, соответствующих генам, кодирующих изоформы пероксидаз III класса в клетках *R. cordifolia*, использовали вырожденные праймеры, разработанные на основе известных аминокислотных последовательностей пероксидаз других растений из базы данных GenBank. На основе консервативных участков RLHFHDC и LAGAHTVG получена пара праймеров Prx-DegD 5'-MGN YTN YRY TTY CAY GAY TG-3' и Prx-DegR 5'-CCN ACN GTR TGN SKN CCN ARN A-3' соответственно. Данные консервативные участки выбраны на основе выравнивания аминокислотных последовательностей известных растительных пероксидаз из *Ipomoea batatas* (swpa1 CAB06477; swpa2 AAO13969; swpa3 AAF00094; swpa4 ABG73135; swpa5 AAP42504; swpa6 AAP42505; swpa7 ABR23053.1; swpb1 AAP42506.1; swpb2 AAP42507; swpb3 AAP42508.1), *Gossypium hirsutum* (POD1 AAL93152; POD2 AAL73112; POD3 AAL93151; POD4 AAD43561; POD5 AAL93153; POD6 AAL93154; POD10 AAL92037) и *Striga asiatica* (POXA AAB97853; POXB AAB97854).

ПЦР проводили с использованием вырожденных праймеров и кДНК образцов *R. cordifolia*. Фрагменты известной длины (441 п.н.) выделяли из агарозных гелей с использованием Glass Milk Kit (Силекс) и клонировали их в плазмиду pTZ57R/T, используя набор InsT/Aclone PCR Product Cloning Kit (Fermentas, Литва). Затем клоны были амплифицированы с использованием универсальных праймеров M13 и секвенированы по описанному ранее методу (Shkryl et al., 2008) на платформе ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

Определение полноразмерных последовательностей генов пероксидаз III класса R. cordifolia. Для определения полноразмерных последовательностей

генов пероксидаз III класса *R. cordifolia* проведена быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК (RACE) с использованием модифицированной технологии step-out ПЦР (Matz et al., 1999). На матрице РНК, полученной из каллуса RBH, синтезировали кДНК. Реакцию амплификации кДНК с применением SMART cDNA Amplification Kit проводили в условиях: 10 сек – 95°C, 20 сек – 63°C и 90 сек – 72°C, 25 циклов, в соответствии с рекомендациями производителя (Clontech, США). В модифицированном протоколе RACE в первом цикле амплификации вместо ген-специфичных использовали вырожденные праймеры *Prx-DegD* и *Prx-DegR*, которые подходили для одновременной амплификации всех экспрессируемых изоформ генов *RcPrx*. Ген-специфичные праймеры для ПЦР-РВ использовали во втором цикле RACE для получения индивидуальных ампликонов каждой изоформы *RcPrx*. Фрагменты, полученные в результате RACE, были секвенированы.

Анализ экспрессии генов пероксидаз III класса *R. cordifolia*. Методом ПЦР-РВ провели анализ экспрессии генов *RcPrx* с использованием красителя 2.5x SYBR Green, содержащим ROX в качестве референсного красителя (Синтол, Россия), на приборе Bio-Rad CFX96 Real-Time System (Bio-Rad Laboratories). Объем реакционной смеси составил 10 мкл, содержащей 300 нМ каждого праймера, 0.5 мкл разведенного образца кДНК и 4 мкл 2.5x SYBR Green. ПЦР осуществляли в следующих условиях: 5 мин – 95°C, затем 10 сек – 95°C и 30 сек – 60°C, 35 циклов. Для анализа каждого образца использовали две биологические повторности и три – технические, а также негативный контроль для исключения искажения данных в результате контаминации. Отсутствие неспецифических продуктов реакции и димеров подтверждали в ходе анализа соответствующих кривых плавления образцов в конце реакции амплификации и электрофореза в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

В ПЦР использовали ген-специфичные пары праймеров (Табл. 2). В качестве внутреннего стандарта использовали экспрессию гена актина марены сердцелистной *RcActin* (GenBank Acc. No. DQ531565), родиолы розовой *RhActin* (GenBank Acc. No. JX431891) и смолевки обыкновенной *SvActin* (GenBank Acc.

No. JX431890). В исследуемых образцах кДНК амплифицировали участок инtronной последовательности размером 91 п.н. с использованием праймеров 5'-GAT TGA GCA CGG TAT TGT TAG-3' и 5'-ACA CCA TCA CCA GAA TCC AAC-3'. Отрицательный результат амплификации свидетельствовал об отсутствии ДНК-матриц в исследуемых образцах. Данные анализировали с использованием программного обеспечения CFX Manager Software (Версия 1.5) (Bio-Rad Laboratories).

Таблица 2

Ген-специфичные праймеры для анализа экспрессии пероксидаз *R. cordifolia*

<i>RcPrx01</i>	D: 5'-CGT GAA TGG CTG CGA TGC-3' R: 5'-CGT TGA GTT TCT ATT CGG-3'
<i>RcPrx02</i>	D: 5'-TTG TTG CTA TTG CCG CCA C-3' R: 5'-TCT TCC GTC TTT CCT TCC C-3'
<i>RcPrx03</i>	D: 5'-TGG ACG GAA GCA GGA AGA-3' R: 5'-TTC CTT CTC CAA TGC TGA T-3'
<i>RcPrx04</i>	D: 5'-CAA TGT GAT AGA TGA AGC G-3' R: 5'-AGC AGC AAG AGC CAC GAT-3'
<i>RcPrx05</i>	D: 5'-GTA AAT GGC TGT GAT GCG GG-3' R: 5'-CGA ACC CTC TTG CTG AAT-3'
<i>RcPrx06</i>	D: 5'-GCT GCT AAC CAA ACC ATT CC-3' R: 5'-GTT GTT GGT TTC GTT GTA-3'
<i>RcPrx07</i>	D: 5'-GCG GCA GCA GGC GTT TAG G-3' R: 5'-TGG TGT TGC TCG TCG GTG C-3'
<i>rolB</i>	D: 5'-GTG CTG GCG ACA ACG ATT CA-3' R: 5'-GAA CTT GCG AAA ATG GCG ATG-3'

D – прямой праймер, R – обратный.

2.3. Анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз

Для определения изоэлектрических точек (pI), молекулярных масс, сигнальных пептидов и вероятной локализации в клетке использовали программы ExPASy (www.expasy.org/tools/), PSORT (www.psort.org), SignalP (www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) и TargetP (www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/) (Nakai, Horton, 1999; Emanuelsson et al., 2007).

2.4. Филогенетический анализ пероксидаз

Для филогенетического анализа были использованы 57 аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса из 30 видов растений, депонированных в базу данных GenBank, и 7 последовательностей пероксидаз, полученных в результате данной работы. Выравнивание аминокислотных последовательностей пероксидаз проводили в программе MUSCLE (Edgar 2004), используя стандартные настройки. Для исключения регионов с неоднозначным выравниванием воспользовались программой GBlocks версии 0.91b (Castresana, 2000).

Филогенетические деревья построены с помощью методов максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML), максимальной экономии (maximum parsimony, MP) и метода «ближайших соседей» (neighbor-joining, NJ). Определение оптимальной модели замены аминокислотных остатков проводили с помощью программы ProtTest версии 2.4 (Abascal et al., 2005). Лучшая матрица замен – WAG+I+G+F.

ML-анализ полученной матрицы проводили в программе Phymal версии 3.0 (Guindon, Gascuel, 2003). Для оценки достоверности построенных деревьев проводили бутстреп-анализ (число повторов – 500). Построение деревьев MP- и NJ-методами проводили в программе Phylip package версии 3.69 (Felsenstein, 1989). Для оценки достоверности построенных деревьев так же проводили бутстреп-анализ (число повторов – 1000). Графические изображения филогенетических деревьев обрабатывали в программе TreeView версии 1.6.6 (Page, 1996).

2.5. Определение активности и изоферментов пероксидаз

Экстракция тотального белка. Экстракти получены методом гомогенизации свежей ткани в ледяном трис-ацетатном буфере (рН 5.0), содержащем 2% поливинилпирролидона, в соотношении буфер:ткань 2:1 (v/w).

Для экстракции использовали клеточные культуры, находящиеся в линейной фазе роста (22 дня). Гомогенат центрифугировали на 20 000 об/мин в течение 10 минут при +4°C. Белки осаждали добавлением 4-х объемов ледяного ацетона, инкубировали 20 минут при –20°C, после чего центрифугировали на 12 000 об/мин в течение 10 минут. Осадки промывали в 96% этаноле и растворяли в 50 мкл 2% амфолитов Bio-Lite (Bio-Rad Laboratories).

Концентрацию белков определяли с использованием набора *RC DC Protein Assay Kit* (Bio-Rad Laboratories) по методике производителя, используя бычий сывороточный альбумин в качестве стандарта.

Измерение активности пероксидаз и изоферментный анализ. Активность пероксидаз экстрактов из растений и клеточных культур *R. cordifolia*, *Rh. roseus* и *S. vulgaris* определяли на спектрофотометре Benchmark Plus microplate spectrophotometer (Bio-Rad Laboratories) с использованием 4-метокси-α-нафтола (4-МН) в качестве субстрата по методике Феррера (Ferrer et al., 1990). Состав реакционной смеси: 1 мМ 4-метокси-α-нафтол и 0.33 мМ H₂O₂ в 100 мМ трис-ацетатном буфере (рН 5.0). Измерение активности проводили на длине волны 593 нм при +25°C. Активность фермента выражали в нанокатаалах, для определения количества окрашенного продукта использовали коэффициент поглощения $\epsilon_{593} = 2.1 \times 10^4$ нкат×M⁻¹×см⁻¹.

Методом нативного изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) разделяли фракцию пероксидаз на изоферменты. ИЭФ проводили в полиакриламидном геле с градиентом pH от 3.0 до 10.0 в камере 111 Mini IEF Cell (Bio-Rad Laboratories). В качестве стандарта использовали белки с известными рI (Bio-Rad Laboratories). Окраску гелей проводили в 96% этаноле и 100 мМ трис-ацетатном буфере (рН 5.0) в соотношении 1:2 (v/v) с использованием 1 мМ 4-МН и 0.33 мМ H₂O₂. Гели фотографировали на приборе Versa Doc 4000 (Bio-Rad Laboratories).

2.6. Определение уровня внутриклеточных активных форм кислорода

Определение уровня внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) проводили с помощью конфокальной микроскопии. Единичные клетки и агрегаты по 10—20 клеток ресуспенсировали в жидкой среде W_{B/A}, содержащей 50 мкМ 2,7-дихлорфлуоресцеин-3,6-диацетата (H₂DCF-DA, Molecular Probes) и инкубировали в течение 10 минут. Внутриклеточное окисление H₂DCF-DA приводит к образованию 2,7-дихлорфлуоресцеина (DCF), который детектируется прибором. Измерение флуоресценции в клетках проводили в течение 40-секундной съемки с интервалом 0.5 мс на конфокальном микроскопе LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия), оснащенном аргоновым лазером мощностью 30 мВт. Видеофайлы полученных изображений были записаны и проанализированы в программе LSM 510 Release 3.5 software. В каждом эксперименте анализировали 30—40 клеток, данные представлены в виде средних значений 2-х экспериментов.

2.7. Статистический анализ

Результаты всех экспериментов обработаны при помощи программы Statistica версии 10.0. Все данные представлены как среднее значение±стандартная ошибка. Для статистической оценки данных был проведен многофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-хок тестом Фишера (PLSD). Для изучения взаимосвязи между переменными величинами использовали корреляционный анализ Пирсона. Уровень значимости в 0.05 был выбран как минимальное значение статистической разницы во всех экспериментах.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Идентификация и анализ генов пероксидаз III класса *R. cordifolia*

На первом этапе исследований нам предстояло идентифицировать и охарактеризовать пероксидазы III класса марены сердцелистной – основного объекта исследований.

Для получения соответствующих генов, кодирующих пероксидазы III класса, проведены ПЦР с использованием вырожденных праймеров и образцов кДНК, полученных из листа и стебля растения *R. cordifolia*, а также клеточных культур R, RBH, RCH и RA4. Продукты ПЦР предполагаемых размеров были обнаружены в листе, стебле и кДНК образца RBH. Секвенирование полученных ампликонов позволило идентифицировать участки семи изоформ пероксидаз *RcPrx*. Далее, для получения полноразмерных последовательностей генов воспользовались модифицированным протоколом RACE (Matz et al., 1999). Полноразмерные последовательности генов пероксидаз *RcPrx01*, *RcPrx02*, *RcPrx03*, *RcPrx04*, *RcPrx05*, *RcPrx06* и *RcPrx07* *R. cordifolia*, включая 5'- и 3'-нетранслируемые области, были депонированы в базу данных GenBank под номерами доступа GQ380495, GQ380496, HM807270, HM807271, HM807272, HM807273 и HM807274 соответственно. Длина последовательностей варьировала от 1104 до 1412 п.н.

3.2. Анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia*

Используя программы PSORT и SignalP, проанализированы аминокислотные последовательности зрелых белков, состоящие из 294, 300, 309, 303, 293, 297 и 326 а.о. соответственно (Рис. 1; Табл. 3). В результате анализа аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia* установлено наличие у них нескольких высокогомологичных

участков, включая активный сайт (Box 1, Рис. 1), центральный консервативный домен (Box 2, Рис. 1) и проксимальный гем-связывающий домен (Box 3, Рис. 1) (Welinder, 1985). Все цистеины и два гистидина, необходимые для катализа реакций, сохраняются и в зрелых белках (Hiraga et al., 2001). У всех семи изоформ пероксидаз идентифицированы предполагаемые N-концевые сигнальные пептиды ферментов RcPrx01—RcPrx07 (Рис. 1). Среди других идентифицированных пероксидаз, RcPrx07 отличается наличием C-терминального пептида (Рис. 1), функция которого связана, вероятно, с локализацией фермента в вакуолях (Carter et al., 2004; Welinder et al., 2002). Также у изоформы RcPrx07 были обнаружены два $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающих мотива (Рис. 1).

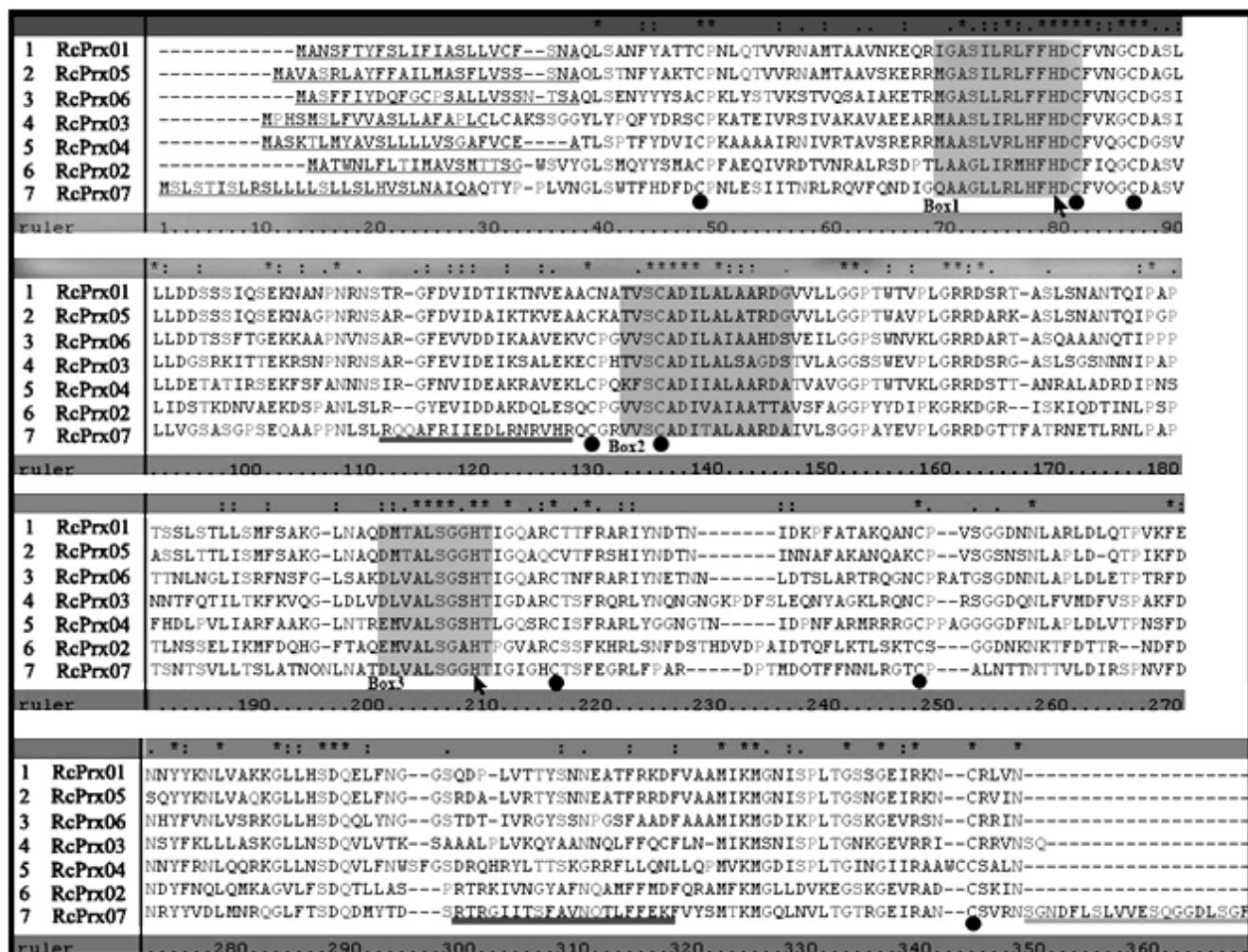


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia*. Звездочки, точки и двоеточия над последовательностями –

одинаковые аминокислотные остатки и замены с низкой и высокой идентичностью соответственно; тонкое подчеркивание – N-терминальный сигнальный пептид; Box 1 – активный сайт; Box 2 – центральный консервативный домен; Box 3 – проксимальный гем-связывающий домен; черные кружки – аминокислотные остатки цистеина, формирующие дисульфидные мостики; стрелки – аминокислотные остатки гистидина; двойное подчеркивание – C-терминальный пептид.

В соответствии со значениями изоэлектрических точек предполагаемых зрелых белков, семь генов *RcPrx* могут быть разделены на три группы: *RcPrx02* кодирует анионную пероксидазу (*pI* < 6), *RcPrx07* – нейтральную (*pI* 6-8), а остальные гены кодируют щелочные пероксидазы (*pI* > 8), среди которых *RcPrx03*, *RcPrx04* и *RcPrx05* – сильнощелочные (*pI* > 9) (Табл. 3).

Таблица 3
Характеристики аминокислотных последовательностей пероксидаз III класса *R. cordifolia*

Характеристика	RcPrx						
	01	02	03	04	05	06	07
Предполагаемая длина зрелого белка, а.о. ^a	294	300	309	303	293	297	326
Длина сигнального пептида, а.о. ^a	23	19	22	24	25	24	28
Предполагаемый молекулярный вес зрелого белка, кДа ^b	31.6	33.1	33.8	33.4	31.4	31.9	35.7
Предполагаемая <i>pI</i> зрелого белка ^b	8.78	5.88	9.35	9.95	9.33	8.76	6.33
Вероятная клеточная локализация ^c	C	C	C	C	C	C	C, B

^aРезультаты анализа, полученные с помощью программ SignalP и PSORT;

^bРезультаты анализа, полученные с помощью ExPasy; ^cРезультаты анализа, полученные с помощью TargetP; С – секретируемые формы, В – вакуолярные.

Сравнение аминокислотных последовательностей пероксидаз *R. cordifolia* показало, что изоформы имеют между собой низкую степень гомологии: менее 58%, за исключением изоформ *RcPrx01* и *RcPrx05* с 82% гомологией (Табл. 4).

С помощью алгоритма BLAST обнаружена высокая степень гомологии аминокислотных остатков изоформ пероксидаз *R. cordifolia* и известных пероксидаз других растений (Табл. 5).

Таблица 4

Парное сравнение аминокислотных последовательностей изоформ пероксидаз III класса *R. cordifolia* (% идентичности)

	RcPrx01	RcPrx02	RcPrx03	RcPrx04	RcPrx05	RcPrx06	RcPrx07
RcPrx01	100	37	51	50	82	58	42
RcPrx02	37	100	39	37	35	42	41
RcPrx03	51	39	100	46	48	48	40
RcPrx04	50	37	46	100	47	51	39
RcPrx05	82	35	48	47	100	57	38
RcPrx06	58	42	48	51	57	100	38
RcPrx07	42	41	40	39	38	38	100

Таблица 5

Сравнение аминокислотных последовательностей семи пероксидаз *R. cordifolia* и известных пероксидаз других растений

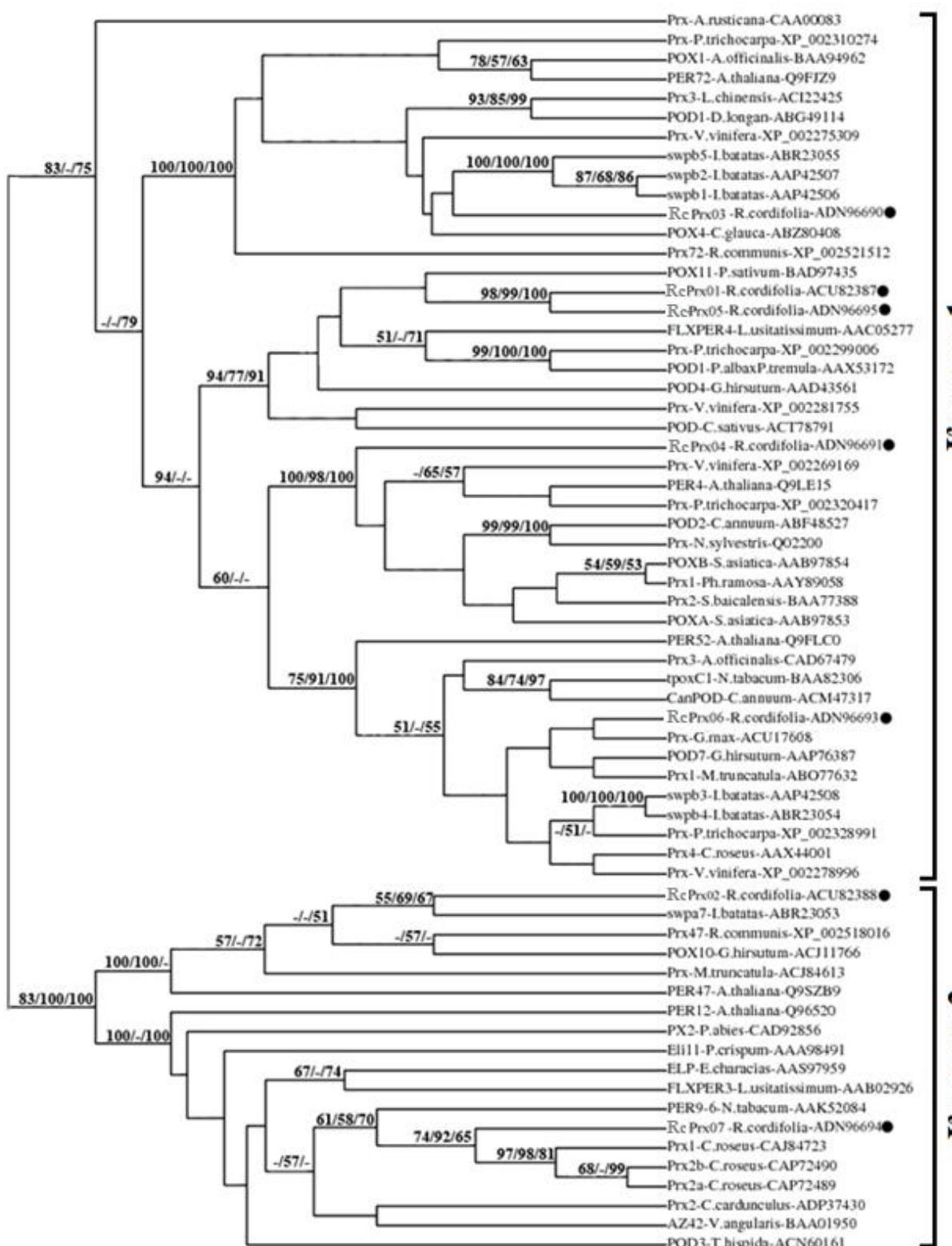
	Ближайший гомолог среди растительных пероксидаз, номер доступа в GenBank (в скобках), % идентичности
RcPrx01	<i>P. alba</i> x <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i> POD1 (AAX53172), 74%; <i>G. hirsutum</i> POD4 (AAD43561), 73%; <i>P. trichocarpa</i> Prx (XP_002320417), 74%; <i>L. usitatissimum</i> FLXPER4 (AAC05277), 72%; <i>V. vinifera</i> Prx (XP_002281755), 71%
RcPrx02	<i>I. batatas</i> swpa7 (ABR23053), 71%; <i>R. communis</i> Prx47 (XP_002518016), 74%; <i>A. thaliana</i> PER47 (Q9Szb9), 72%; <i>V. vinifera</i> Prx (XP_002267794), 71%; <i>M. truncatula</i> Prx (ACJ84613), 70%
RcPrx03	<i>R. communis</i> Prx72 (XP_002521512), 78%; <i>L. chinensis</i> Prx3 (ACI22425), 79%; <i>P. trichocarpa</i> Prx (XP_002310274), 79%; <i>D. longan</i> POD1 (ABG49114), 78%; <i>V. vinifera</i> Prx (XP_002275309), 77%
RcPrx04	<i>V. vinifera</i> Prx (XP_002269169), 62%; <i>P. ramosa</i> Prx1 (AAV89058), 63%; <i>S. baicalensis</i> Prx2 (BAA77388), 62%; <i>N. sylvestris</i> Prx (Q02200), 60%; <i>C. annuum</i> POD2 (ABF48527), 60%
RcPrx05	<i>P. alba</i> x <i>P. tremula</i> var. <i>glandulosa</i> POD1 (AAX53172), 73%; <i>G. hirsutum</i> POD4 (AAD43561), 71%; <i>V. vinifera</i> Prx (XP_002281755), 71%; <i>L. usitatissimum</i> FLXPER4 (AAC05277), 70%; <i>A. thaliana</i> PER52 (Q9FLC0), 66%
RcPrx06	<i>G. max</i> Prx (ACU17608), 80%; <i>C. roseus</i> CrPrx4 (AAX44001), 79%; <i>N. tabacum</i> tpoxC1 (BAA82306), 78%; <i>C. annuum</i> CanPOD (ACM47317), 78%; <i>G. hirsutum</i> POD7 (AAP76387), 78%

RcPrx07	<i>C. roseus</i> пероксидазы 2а и 2б (CAP72489 and CAP72490), 80 и 81%, соответственно; <i>C. roseus</i> CrPrx1 (CAJ84723), 74%; <i>N. tabacum</i> PER9-6 (AAK52084), 73%; <i>L. usitatissimum</i> FLXPER3 (AAB02926), 71%; <i>C. cardunculus</i> Prx2 (ADP37430), 71%
---------	--

3.3. Филогенетический анализ пероксидаз III класса

С помощью методов максимального правдоподобия (ML), максимальной экономии (MP) и метода «ближайших соседей» (NJ) исследованы филогенетические отношения между выведенными аминокислотными последовательностями пероксидаз III класса *R. cordifolia* и других растений. Топологии филогенетических деревьев, построенных разными методами, принципиально не отличаются, одно из них представлено на Рис. 2. Все узлы ветвления филогенетического дерева находятся в соответствии с ранее опубликованными данными по филогении пероксидаз (Costa et al., 2008; Park et al., 2003).

Выравнивание аминокислотных последовательностей для построения филогенетических деревьев показало, что аминокислотные остатки, необходимые для катализа, являются строго консервативными и сохраняются во всех последовательностях пероксидаз (номер позиции указан в соответствии с последовательностью пероксидазы хрена): Arg38 и His42 участвуют в гетеролитическом расщеплении H₂O₂ (Bhattacharyya et al., 1993); His170 и Asp247 вовлечены в поддержание координационных связей внутри гема (Gajhede et al., 1997); His42, Asn70 и Glu64 – незаменимы для каталитической активности фермента – формируют «ловушку» для водорода (Tanaka et al., 1997); и восемь остатков цистеина формируют дисульфидные мостики (Hiraga et al., 2001).



объединенные в первый кластер, имеют аминокислотные остатки Arg и Ser в позициях 31 и 35 соответственно, тогда как в последовательностях пероксидаз RcPrx02 и RcPrx07, объединенных во второй кластер, находятся аминокислотные остатки Thr31 и Gly35, Gly31 и Gly35 соответственно (Рис. 2). Совместно с Glu176 и Ser73, эти аминокислотные остатки непосредственно вовлечены в процесс связывания водорода между пероксидазами и пропионатом гема (Bandyopadhyay et al., 1999). Важно отметить, что Glu176 и Ser73 являются консервативными аминокислотными остатками во всех изученных пероксидазах. Внутри второго кластера выделяется группа пероксидаз, включая RcPrx07, характеризующихся наличием $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ -связывающего домена.

Таким образом, на первом этапе работы были идентифицированы полноразмерные последовательности семи генов, кодирующих растительные пероксидазы III класса *R. cordifolia*. Получены данные о предположаемых локализации и физико-химических свойствах соответствующих белков. Установлено наличие высокой степени гомологии с известными пероксидазами других растений. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз марены и других растений показал достоверное разделение на два кластера в зависимости от определенных аминокислотных замен в позициях 31 и 35, а также кластеризацию пероксидаз, имеющих сайт связывания с кальцием/кальмодулином.

3.4. Эффект трансформации генами *rolB*, *rolC* и диким штаммом A4

A. rhizogenes* на пероксидазы III класса *R. cordifolia

Второй этап работы включал анализ пероксидаз III класса в культурах *R. cordifolia*, трансформированных генами *rolB*, *rolC* и диким штаммом A4 *A. rhizogenes*, с целью определения влияния генов *rol* на активность и содержание ферментов.

3.4.1. Экспрессия генов пероксидаз в тканях листа, стебля и в клеточных культурах *R. cordifolia*

На первой стадии экспериментов мы исследовали накопление транскриптов пероксидаз в тканях растения и нормальной клеточной культуре *R. cordifolia* с целью создания базисной линии для сопоставления с результатами последующих экспериментов на клеточных культурах.

Экспрессия генов *RcPrx* была установлена методом количественного ПЦР-анализа с использованием кДНК матриц образцов, выделенных из листьев, стеблей и клеточных культур *R. cordifolia* (Рис. 3; Табл. 6).

Высокий уровень экспрессии большинства генов *RcPrx* обнаружен как в листьях, так и в стеблях, исключение составили гены *RcPrx04*, чьи транскрипты были обнаружены лишь в незначительных количествах, и *RcPrx02*, уровень экспрессии которого оказался в 2.6—11.6 раз ниже, чем у остальных генов *RcPrx* (Рис. 3; Табл. 6). Важно отметить, что экспрессия генов *RcPrx* в стеблях выше, чем в листьях. Вероятно, это связано с большей степенью лигнификации сосудистых тканей стебля растения (Grisebach, 1981). Например, количество транскриптов изоформы *RcPrx03* в стебле в 4.5 раза выше, чем в листе (Табл. 6). Аналогичный паттерн тканеспецифичной экспрессии обнаружен у гомолога изоформы *RcPrx03* – гена *TP02* (82% идентичности) анионной пероксидазы табака (*Nicotiana tabacum*), которая участвует в процессах лигнификации, осуществляя полимеризацию коричных спиртов (Lagrimini et al., 1987). Наш анализ также показал, что транскрипты *RcPrx01*, *RcPrx06* и *RcPrx07* преобладают как в листьях (76% от общего уровня экспрессии генов пероксидаз *R. cordifolia*), так и в стеблях (80% от общего уровня экспрессии генов пероксидаз *R. cordifolia*).

Полученные данные соответствуют ранее проведенным экспериментам и свидетельствуют о том, что особенности тканеспецифичной экспрессии генов *RcPrx* соответствуют паттернам экспрессии гомологичных генов других видов растений. Например, изоформа *RcPrx04*, отличавшаяся низким уровнем

экспрессии, гомологична генам *POXA* и *POXB* *Striga asiatica* (56% и 58% соответственно), и количество их мРНК в тканях взрослых растений также было недостаточным для индикации (Kim et al., 1998). Уровень экспрессии генов *swpb3* и *swpb4* в *Ipomoea batatas*, гомологичных *RcPrx06* на 73% и 77%, соответственно, был значительно выше в стеблях, чем в листьях (Park et al., 2003; Kim et al., 2008).

Уровень экспрессии всех рассматриваемых генов *RcPrx* в нетрансформированной клеточной культуре марены сердцелистной был очень мал. Ранее уже была продемонстрирована видоспецифичность активности пероксидаз: так, например, высокая активность выявлена как в каллусных, так и супензионных культурах редьки (*Raphanus sativus*) (Moreno et al., 1989), тогда как в клеточных культурах моркови (*Daucus carota*) почти отсутствовала (Xu et al., 1998).

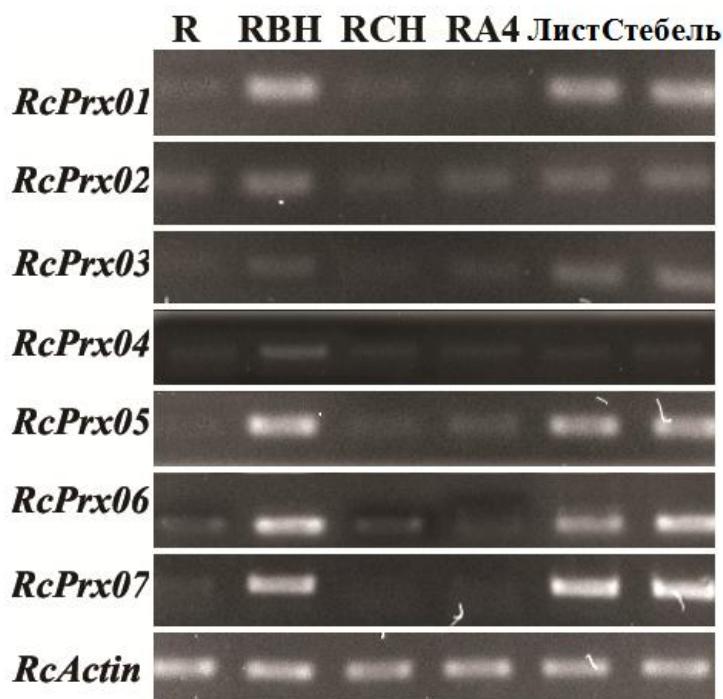


Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации генов пероксидаз и актина в клеточных культурах, листьях и стебле *R. cordifolia*. R – не трансформированная клеточная культура; RBH и RCH – *rolB*- и *rolC*-трансформированные клеточные культуры с высоким уровнем экспрессии трансгена; RA4 – клеточная культура, трансформированная диким штаммом A4 *A. rhizogenes*.

Таблица 6

Экспрессия генов *RcPrx* в листе, стебле и клеточных культурах *R. cordifolia*

Количество мРНК семи генов <i>RcPrx</i> , определенных с помощью ПЦР-РВ, в относительных единицах										
Ген	R	RBH	RBH/R	RCH	RCH/R	RA4	RA4/R	Стебель	Лист	Лист/Стебель
<i>RcPrx01</i>	0.009±0.001 ^d	0.472±0.021 ^b	↑ 52	0.009±0.001 ^d	равное	0.011±0.002 ^d	равное	0.549±0.009 ^a	0.304±0.009 ^c	↓ 1.8
<i>RcPrx02</i>	0.002±0.001 ^c	0.219±0.002 ^a	↑ 109	0.002±0.001 ^c	равное	0.003±0.001 ^c	равное	0.084±0.001 ^b	0.075±0.002 ^b	равное
<i>RcPrx03</i>	0.001±0.001 ^d	0.023±0.004 ^c	↑ 23	0.001±0.001 ^d	равное	0.001±0.001 ^d	равное	0.243±0.005 ^a	0.054±0.001 ^b	↓ 4.5
<i>RcPrx04</i>	0.002±0.001 ^b	0.114±0.004 ^a	↑ 57	0.006±0.001 ^b	равное	0.003±0.001 ^b	равное	0.003±0.002 ^b	0.001±0.004 ^b	равное
<i>RcPrx05</i>	0.003±0.001 ^d	0.255±0.002 ^a	↑ 85	0.004±0.001 ^d	равное	0.002±0.001 ^d	равное	0.224±0.006 ^b	0.193±0.005 ^c	↓ 1.2
<i>RcPrx06</i>	0.009±0.001 ^d	0.213±0.005 ^c	↑ 24	0.019±0.002 ^d	равное	0.006±0.001 ^d	равное	0.694±0.009 ^a	0.275±0.002 ^b	↓ 2.5
<i>RcPrx07</i>	0.001±0.001 ^d	0.314±0.006 ^c	↑ 314	0.001±0.001 ^d	равное	0.001±0.001 ^d	равное	0.973±0.027 ^a	0.454±0.008 ^b	↓ 2.1

R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*; RCH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolC*; RA4 – трансгенная клеточная культура, трансформированная диким штаммом A4 *A. rhizogenes*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^{a, b, c, d}) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0,05$) средних значений в рядах. Вертикальные стрелки ↑ и ↓ обозначают увеличение или уменьшение уровня экспрессии, соответственно.

На примере клеточных культур женьшеня (*Panax ginseng*) и апельсина (*Citrus sinensis*) было показано, что активность пероксидаз в недифференцированных каллусах значительно ниже, чем в органогенных и эмбрионогенных клеточных культурах (Bonfill et al., 2003; Kochba et al., 1977). Низкий уровень экспрессии генов и активности пероксидаз (Табл. 7) в клеточной культуре *R. cordifolia* обусловлены, вероятно, тем, что ее клетки не проявляют признаков дифференцировки и представлены типичной каллусной тканью.

Используя образцы кДНК, полученные из культур RBH, RCH и RA4, мы провели анализ паттерна экспрессии генов пероксидаз в трансгенных клеточных культурах марены. Совместная экспрессия генов *rolB* и *rolC* в трансформированных штаммом pRiA4 клетках не привела к существенным изменениям уровня экспрессии генов пероксидаз (Рис. 3). Экспрессия гена *rolC* также не оказала видимого эффекта на содержание транскриптов генов *RcPrx* по сравнению с нетрансформированной культурой, тогда как экспрессия гена *rolB* оказала значительный стимулирующий эффект на экспрессию всех генов пероксидаз *R. cordifolia* (Рис. 3; Табл. 6). Так, в *rolB*-трансгенной клеточной культуре RBH количество транскриптов *RcPrx07* увеличилось от 23 до 314 раз по сравнению с культурой R. Из всех генов, *RcPrx01* обладал самым высоким уровнем экспрессии, тогда как *RcPrx03* – самым низким.

Таким образом, мы показали, что трансформация геном *rolB* приводит к увеличению экспрессии отдельных изоформ пероксидаз в десятки и сотни раз.

3.4.2. Активность и изоферментный анализ пероксидаз III класса в листе, стебле и в клеточных культурах *R. cordifolia*

На второй стадии экспериментов мы исследовали активность и изоферментный состав пероксидаз в листьях, стеблях и клеточных культурах *R. cordifolia*. Установлено, что общая активность пероксидаз в листьях и стеблях растения отличалась высокими показателями и значительно превышала активность пероксидаз в нетрансформированной клеточной культуре (Табл. 7).

Таблица 7

Общая активность пероксидаз и парное сравнение в листе, стебле и клеточных культурах *R. cordifolia*

	Общая активность пероксидаз, нкат/г (свежей биомассы)
R	0.12±0.03 ^b
RBH	6.3±1.10 ^a
RCH	0.30±0.03 ^b
RA4	0.14±0.06 ^b
Стебель	4.92±0.63 ^a
Лист	4.09±0.75 ^a

R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*; RCH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolC*; RA4 – трансгенная клеточная культура, трансформированная диким типом A4 *A. rhizogenes*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^a, ^b) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0.05$) средних значений в рядах.

Наши данные показывают 53-кратное увеличение активности пероксидаз в *rolB*-экспрессирующей клеточной культуре (RBH) по сравнению с культурой R (Табл. 7). В отличие от RBH, в клеточных культурах RCH и RA4 не выявлено существенных изменений в уровне активности пероксидаз по сравнению с контрольной культурой R (Табл. 7). Анализ Пирсона выявил положительную корреляцию ($r = 0.985$, $p = 0.001$) между экспрессией генов пероксидаз и активностью ферментов в клеточных культурах, листе и стебле *R. cordifolia*.

Методом нативного изоэлектрического фокусирования (ИЭФ) белков в градиенте pH 3.0—10.0 фракция пероксидаз была разделена на изоферменты в соответствии со значениями изоэлектрических точек белков (Рис. 4).

В образцах, полученных из листа и стебля растения, обнаружены все пероксидазы в соответствии с определенными изоэлектрическими точками белков (Табл. 3). В клеточных культурах R и RA4 удалось обнаружить только одну щелочную изоформу пероксидазы со слабо выраженной активностью, а в культуре RCH – две дополнительные изоформы щелочной природы. Экспрессия гена *rolB* вызвала значительные изменения в изоферментом составе пероксидаз и

привела не только к значительному увеличению активности, но и выявлению дополнительных щелочных и нейтральных изоформ.

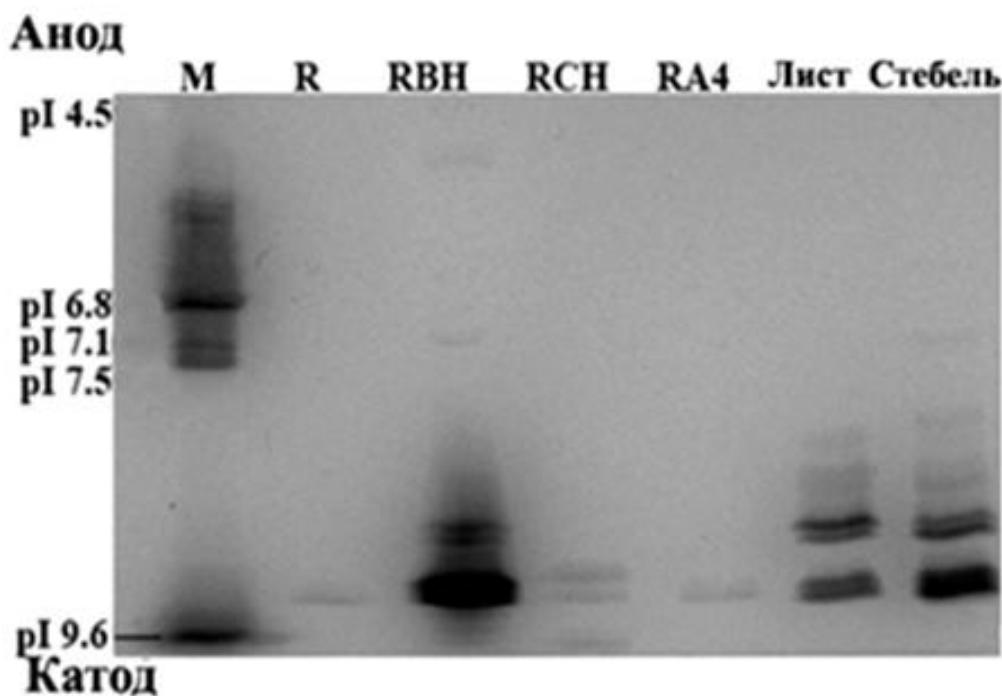


Рис. 4. Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз *R. cordifolia* в ПААГ. М – белковый маркер с известными рН для изоэлектрического фокусирования, Р – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*; RCH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolC*; RA4 – трансгенная клеточная культура, трансформированная диким типом A4 *A. rhizogenes*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что сверхэкспрессия гена *rolB* приводит к увеличению транскрипционной активации пероксидаз III класса в десятки раз, до значений, сопоставимых с таковыми в органах растения. Более того, экспрессия изоформ *RcPrx02*, *RcPrx04* и *RcPrx05* в культуре RBH была выше, чем в листе или стебле растения (Табл. 6). Изоферментные спектры пероксидаз этих образцов (RBH, листа и стебля) также были очень схожи (Рис. 4). В свою очередь, сверхэкспрессия гена *rolC* не оказала значительного эффекта на пероксидазы, более того, при совместной экспрессии трансгенов в культуре RA4 также отсутствовали признаки активации ферментов. Важно учитывать разный уровень экспрессии гена *rolB*: по сравнению с RA4, в

которой ген экспрессируется под контролем собственного промотора, количество транскриптов мРНК *rolB* в культуре RBH в 2.8 раз больше (Shkryl et al., 2008). Поэтому возможно, экспрессия *rolB* в диком штамме недостаточна для индукции пероксидаз, однако более вероятно, что *rolC* или другие гены Т-ДНК компенсируют активирующий эффект *rolB*, нивелируя его действие в отношении пероксидаз. Примечательно, что аналогичные данные уже были зарегистрированы ранее – несмотря на близкородственность генов *rolB* и *rolC*, они по-разному влияют на жизнеспособность клеточных культур (Schmülling et al., 1988), баланс кальция (Bulgakov et al., 2003), чувствительность к ауксинам (Maurel et al., 1991), рост (Capone et al., 1989; van Altvorst et al., 1992) и биосинтез вторичных метаболитов (Shkryl et al., 2008), что свидетельствует в пользу последнего предположения.

Ранее показано, что сверхэкспрессия гена *rolB* приводит к модуляции уровня внутриклеточных АФК, активации генов НАДФН-оксидазы, а также некоторых ферментов антиоксидантной системы (Bulgakov et al., 2013). В связи с тем, что пероксидазы также являются важным звеном антиоксидантной системы, на следующем этапе исследований нам предстояло определить, является ли их активация *rolB*-специфичной функцией или неспецифичным компенсаторным механизмом на фоне изменения редокс-статуса в трансформированных клетках. Для этого нам необходимо было воссоздать условия повышенного содержания внутриклеточных АФК и с этой целью мы использовали клеточные культуры марены сердцелистной, трансформированные мутантными формами гена *AtCPK1* – кальций-зависимой протеинкиназы арабидопсиса, которая является известным активатором НАДФН-оксидазы.

3.5. Влияние повышенного уровня АФК на активность пероксидаз III класса *R. cordifolia*

3.5.1. Анализ содержания АФК в клеточных культурах *R. cordifolia*, трансформированных мутантными формами *AtCPK1*

Методом конфокальной микроскопии установлено, что в нормальной и трансформированной неактивной формой гена *AtCPK1* (*AtCPK1-Na*) клеточных культурах марены сердцелистной уровень АФК находился в пределах нормы, тогда как трансформация постоянно активной формой *AtCPK1* (*AtCPK1-Ca*) вызывала значительное увеличение количества АФК в живых клетках (Рис. 5). Также нами обнаружено увеличение размеров клеток в культуре R-Ca по сравнению с культурами R и R-Na. Размер клеток определяли как поперечную ширину; она составила 59.3 ± 2.2 мкм, 51.2 ± 2.3 мкм и 81.3 ± 3.2 мкм для клеточных культур R, R-Na и R-Ca соответственно. Интересно отметить, что между размером клеток и уровнем содержания АФК наблюдается положительная корреляция, близкая к линейной ($r = 0.987$, $p = 0.05$). Однако сопутствующим эффектом стало торможение роста и деления трансгенных клеток по сравнению с клетками нетрансформированной культуры марены сердцелистной.

3.5.2. Анализ пероксидаз III класса в клеточных культурах *R. cordifolia*, трансформированных мутантными формами *AtCPK1*

В результате разделения изоферментов пероксидаз в контрольной и трансформированных мутантными формами *AtCPK1* культурах марены сердцелистной были идентифицированы одна щелочная изоформа в культуре R и одна дополнительная – в *AtCPK1-Ca*-трансгенной культуре; изоферментный состав в *AtCPK1-Na*-трансгенной культуре не отличался от контрольной культуры (Рис. 6 А).

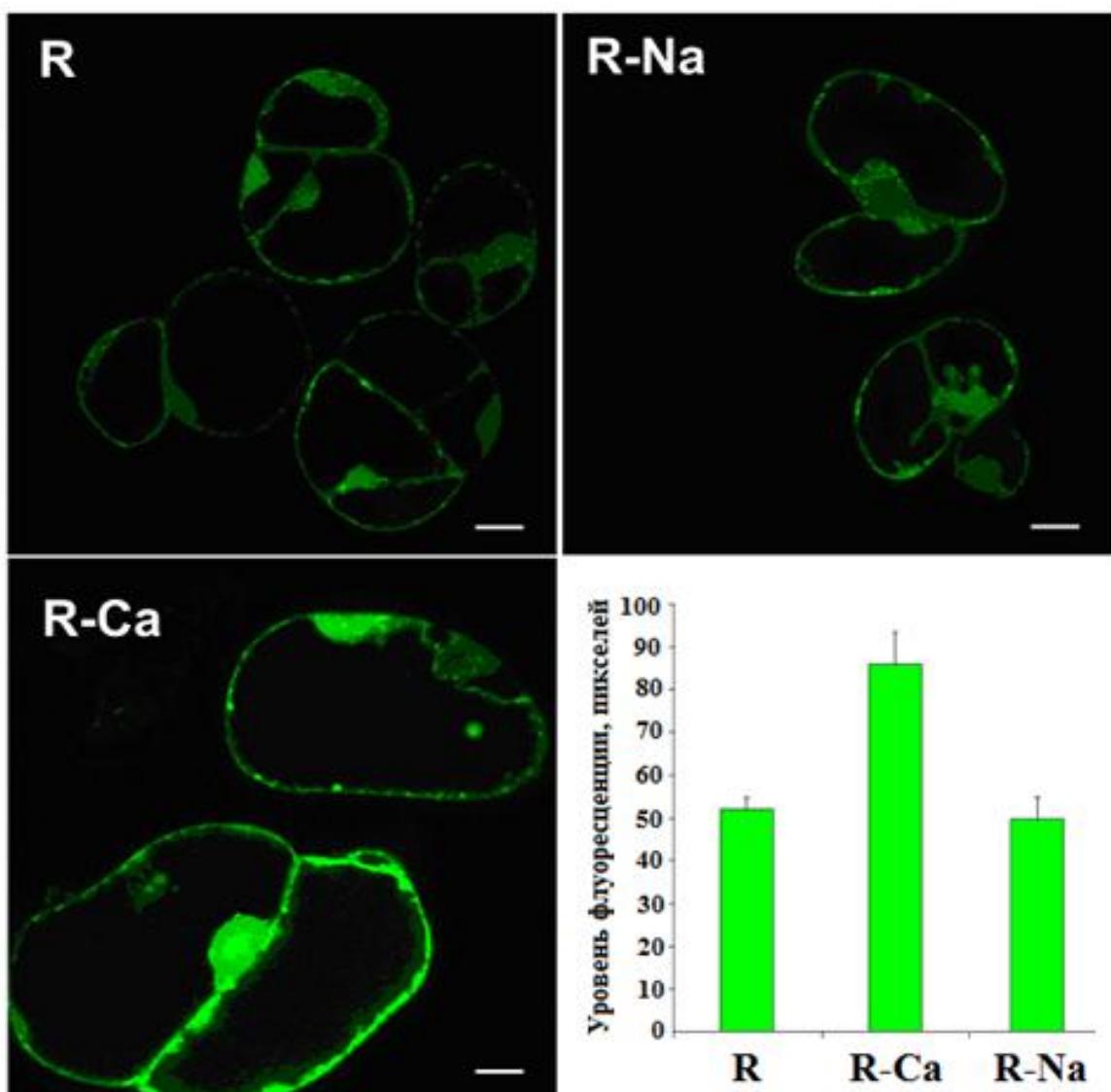


Рис. 5. Содержание активных форм кислорода в культурах марены сердцелистной. R – нормальная клеточная культура, R-Ca – *AtCPK1-Ca*-трансгенная и R-Na – *AtCPK1-Na* трансгенная культуры.

С этими данными согласуются результаты измерения общей пероксидазной активности. Так, в трансформированной неактивной формой гена *AtCPK1* культуре марены не выявлено значительных изменений активности по сравнению с контрольной (0.11 нкат/г и 0.13 нкат/г соответственно), тогда как сверхэкспрессия *AtCPK1-Ca* вызвала незначительную активацию пероксидаз, составившую 0.17 нкат/г свежей биомассы (Рис. 6 Б).

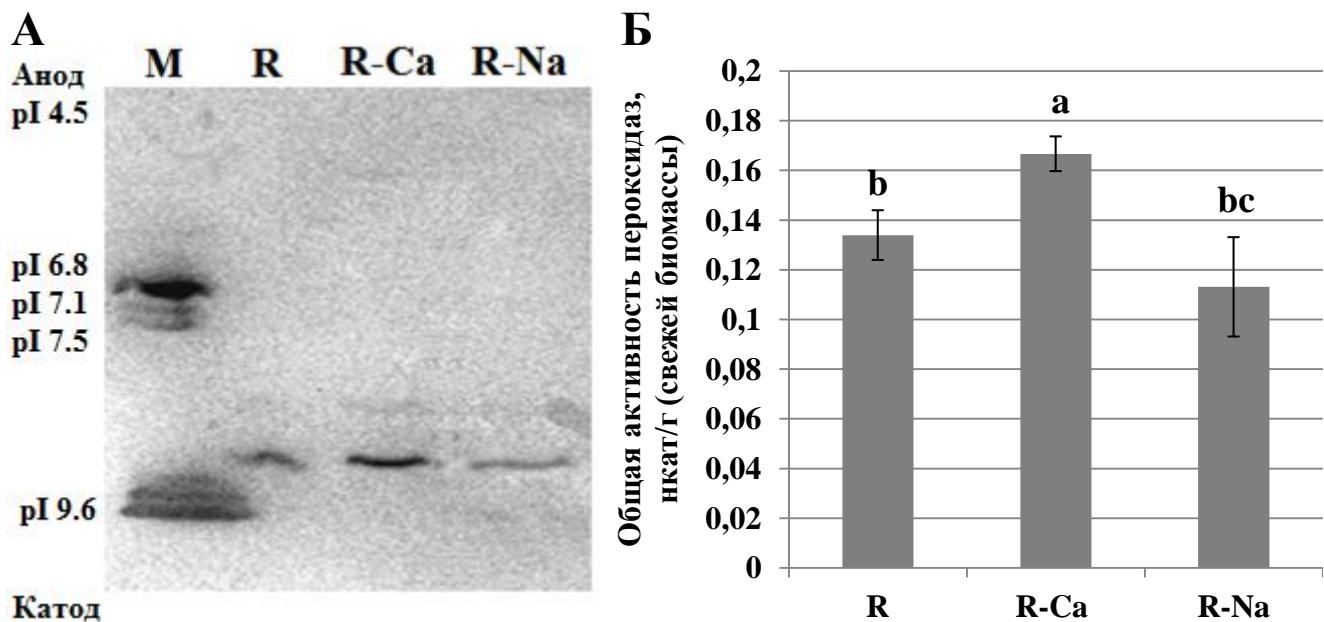


Рис. 6. Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в ПААГ (А) и общая пероксидазная активность (Б) в клеточных культурах *R. cordifolia*. М – белковый маркер с известными значениями изоэлектрических точек, R – нетрансформированная клеточная культура, R-Ca – *AtCPK1*-Ca-трансгенная и R-Na – *AtCPK1*-Na трансгенная клеточные культуры.

Таким образом, нами показано, что в условиях повышенного содержания АФК на фоне трансформации постоянно активной формой *AtCPK1* не происходит значительной активации растительных пероксидаз III класса в трансформированных культурах марены сердцелистной. На основании полученных результатов можно сделать заключение о том, что эффект активации является специфичной функцией гена *rolB*. В этой связи, на следующем этапе работы нам представлялось интересным выяснить взаимосвязь между уровнем экспрессии трансгена и эффектом активации пероксидаз III класса в культурах марены сердцелистной.

3.6. Влияние уровня экспрессии *rolB* на активацию пероксидаз III класса

3.6.1. Анализ экспрессии генов *RcPrx* в *rolB*-трансформированных клеточных культурах *R. cordifolia*

С помощью ПЦР-РВ мы определили экспрессию гена *rolB* и семи генов *RcPrx* в контрольной и *rolB*-трансформированных культурах с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* (RBL, RBM и RBH соответственно) (Рис. 7). Экспрессия гена *rolB* составила 0.06 ± 0.01 , 0.27 ± 0.02 и 0.7 ± 0.06 отн. ед. соответственно. Увеличение количества транскриптов *RcPrx* в культурах RBL, RBM и RBH составило от 3 до 31, от 10 до 59 и от 17 до 125 раз по сравнению с не трансформированной культурой R соответственно. Мы показали, что паттерн экспрессии сохранялся неизменным во всех трех *rolB*-трансгенных культурах.

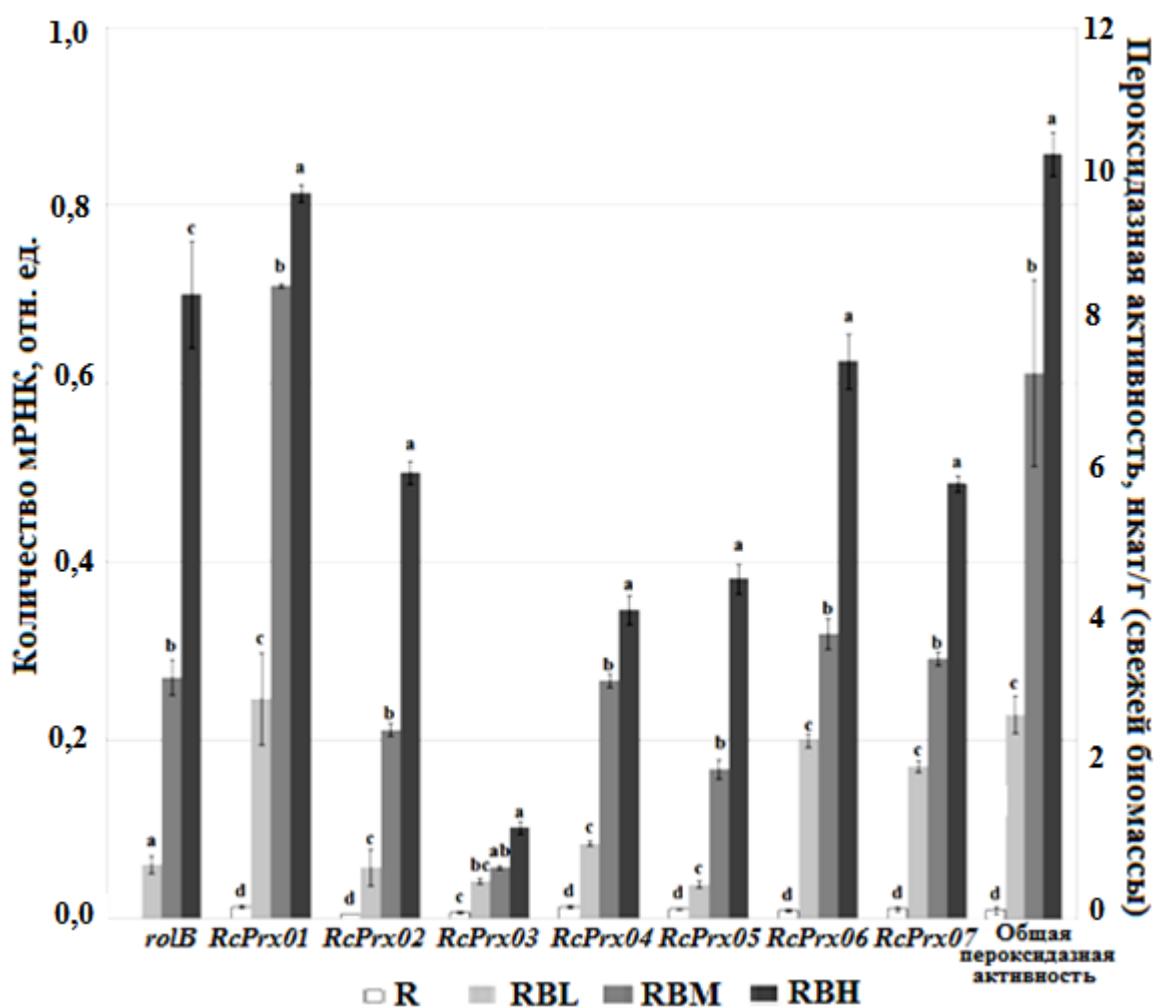


Рис. 7. Экспрессия генов *rolB*, *RcPrx01—RcPrx07* и общая пероксидазная активность в клеточных культурах *R. cordifolia*. R – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* соответственно. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^{a, b, c, d}) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0.05$) средних значений в рядах.

Самые высокие показатели уровня экспрессии были отмечены для изоформ *RcPrx01*, *RcPrx02*, *RcPrx06* и *RcPrx07*, тогда как изоформа *RcPrx03* отличалась самым слабым уровнем экспрессии во всех трех *rolB*-трансгенных культурах. Анализ Пирсона выявил высокую положительную корреляцию между уровнем экспрессии генов *rolB* и пероксидаз *RcPrx01—RcPrx07*: $r = 0.961$, $p = 0.039$.

3.6.2. Анализ активности и изоферментного состава пероксидаз III класса в *rolB*-трансформированных культурах *R. cordifolia*

Анализ общей пероксидазной активности согласуется с полученными данными об экспрессии индивидуальных изоформ ферментов в *rolB*-трансформированных культурах *R. cordifolia* (Рис. 7).

Так, по сравнению с не трансформированной культурой R, общая пероксидазная активность в трансгенных культурах RBL, RBM и RBH увеличилась в 23, 61 и 86 раз соответственно. В результате внутреннего сравнения выявлено 2.7-кратное увеличение активности в культуре RBM относительно RBL и 1.4-кратное повышение активности в культуре RBH относительно RBM. Анализ Пирсона показал наличие положительной корреляции между уровнем экспрессии гена *rolB* и общей пероксидазной активностью ($r = 0.985$, $p = 0.001$), а также между экспрессией индивидуальных изоформ пероксидаз и общей пероксидазной активностью ($r = 0.977$, $p = 0.023$) в *rolB*-трансгенных культурах марены сердцелистной.

Аналогичная тенденция была отмечена по результатам изоферментного разделения пероксидаз в ПААГ: установлено наличие только одной и трех слабо выраженных изоформ щелочной природы в культурах R и RBL соответственно, тогда как в трансгенных культурах RBM и RBH удалось идентифицировать не только появление дополнительных изоформ, но и значительное увеличение активности уже обнаруженных (Рис. 8). При этом тенденция увеличения активности в ряду R—RBL—RBM—RBH сохраняется.

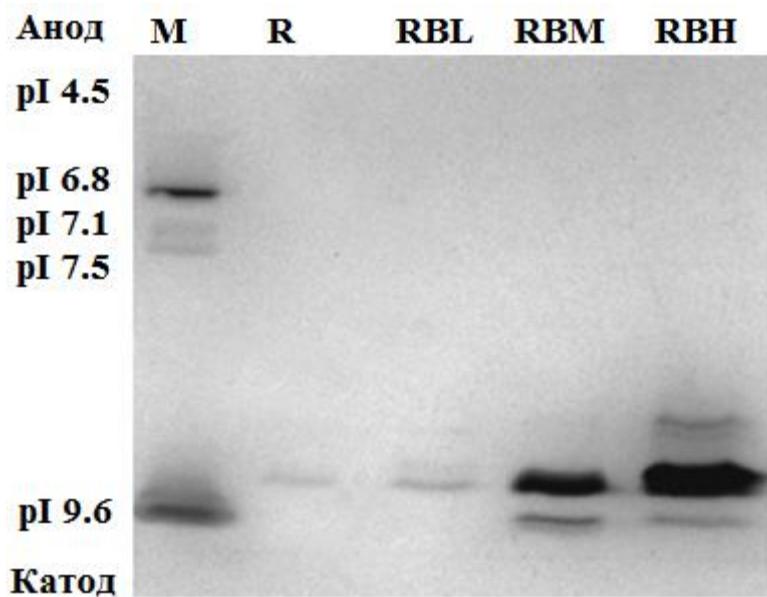


Рис. 8. Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* с разным уровнем экспрессии гена *rolB*. М – маркер для изоэлектрического фокусирования, Р – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* соответственно.

Таким образом, на данном этапе работы установлено, что активация растительных пероксидаз III класса в условиях сверхэкспрессии гена *rolB* носит дозо-зависимый характер. Показано наличие положительной корреляции между уровнем активации пероксидаз и экспрессии трансгена в клеточных культурах марены сердцелистной. Кроме того, в ряду RBL—RBM—RBH происходит снижение степени активации, что свидетельствует о достижении значений, близких к биосинтетическому максимуму в исследуемой клеточной культуре.

3.7. Активирующий эффект *rolB* на пероксидазы III класса в клеточных культурах *R. cordifolia* в разных фазах роста

3.7.1. Динамика экспрессии генов пероксидаз III класса *R. cordifolia*

Для определения динамики содержания мРНК генов пероксидаз III класса в течение пассажа были выбраны контрольная (R) и *rolB*-трансформированная

культура марены сердцелистной с высоким уровнем экспрессии трансгена (RBH). Результаты ПЦР-РВ показали, что экспрессия генов пероксидаз III класса в культурах R и RBH существенно отличалась в течение пассажа (Рис. 9). В нетрансформированных клетках пик экспрессии большинства генов *RcPrx* наблюдался на 20-ый день, что совпадало с пиком активности пероксидаз (Табл. 8). В *rolB*-трансгенной культуре пик экспрессии генов пероксидаз наблюдали на 15-ый день, исключение составили *RcPrx03* и *RcPrx04*, у которых максимум экспрессии наблюдали на 20-ый день культивирования (Рис. 9). Важно отметить, что у всех изоформ *RcPrx*, за исключением *RcPrx03*, произошел сдвиг максимальных показателей уровня экспрессии в более раннюю фазу, тогда как общий паттерн экспрессии при этом практически не изменился (Рис. 9). В культуре R уровень экспрессии всех изоформ *RcPrx* был на порядок ниже, чем в RBH, на всех стадиях пассажа, при этом наибольшие значения были отмечены для изоформ *RcPrx01* и *RcPrx02* (Рис. 9). В культуре RBH наибольшее количество транскриптов мРНК обнаружено для изоформ *RcPrx01* и *RcPrx06*.

Исследование динамики экспрессии генов пероксидаз III класса позволило идентифицировать различия в паттернах экспрессии индивидуальных изоформ и определить их возможное участие в процессах жизнедеятельности. Изоформы *RcPrx01*, *RcPrx05* и *RcPrx07* имеют схожий паттерн экспрессии с наличием двух пиков – в фазе линейного роста и в стационарной фазе. Сравнение нуклеотидных последовательностей выявило высокую степень гомологии между изоформами *RcPrx01*, *RcPrx05* и генами пероксидаз *SSP1*, *SSP2* и *SSP5* *Senecio squalidus L.* (от 76% до 82% идентичности), которые в больших количествах накапливаются в рыльце в период формирования цветковых органов (McInnis et al., 2005). Кроме того, нами установлено, что процент идентичности аминокислотных последовательностей белков *RcPrx01* и *RcPrx05* достаточно велик – 82% (Табл. 4), что также может косвенно свидетельствовать о наличии у них общих функций. Изоформа *RcPrx07* на 80% гомологична изоформе пероксидазы арабидопсиса *AtPrx37*, сверхэкспрессия которой приводит к ингибиции роста растения (Pedreira et al., 2011). Кроме того, оба изофермента имеют вакуоллярную

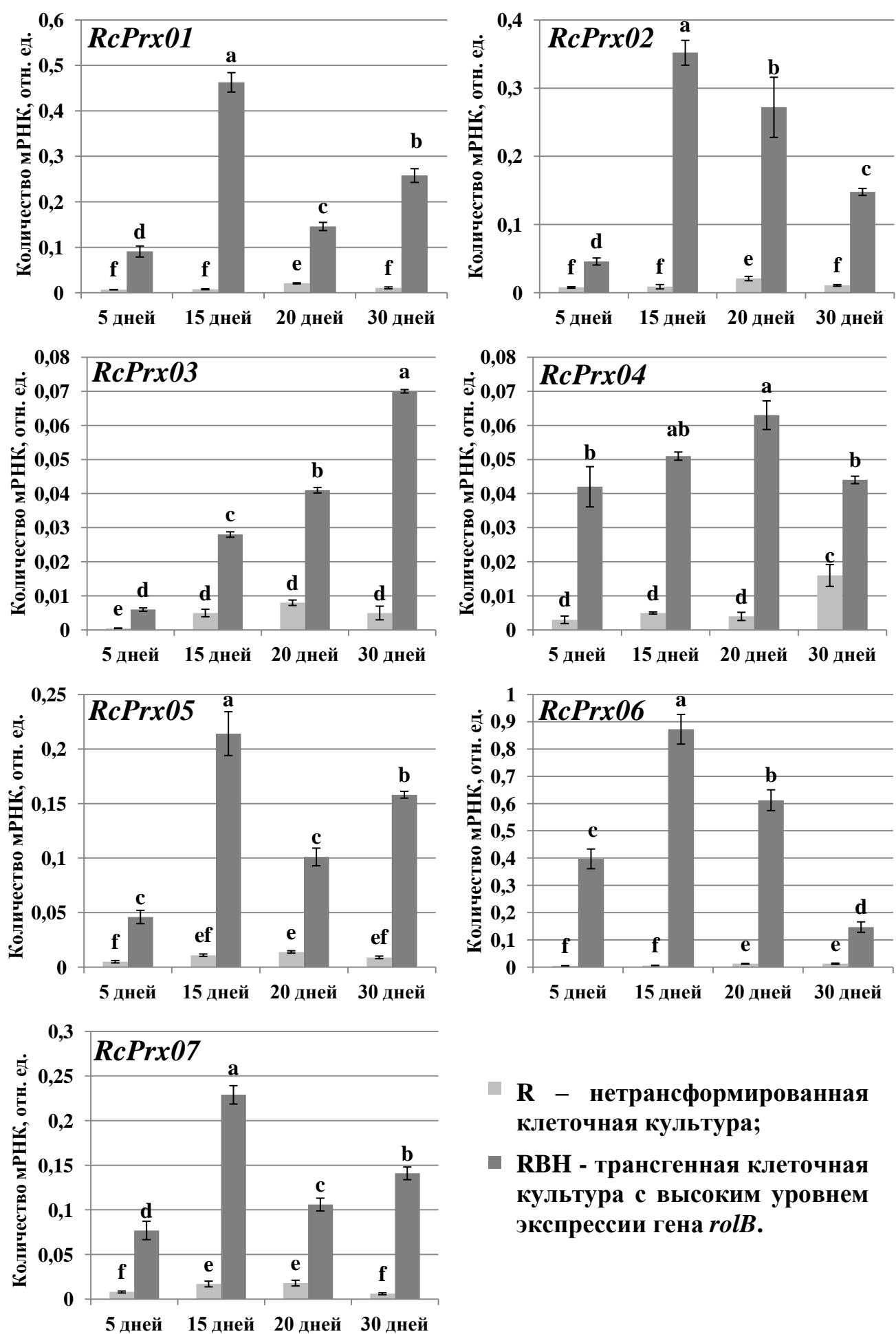


Рис. 9. Экспрессия семи генов *RcPrx01—RcPrx07* в нетрансформированной и *rolB*-трансгенной культурах *R. cordifolia* в разных фазах роста: лаг-фаза (5 дней), фаза линейного (15 дней) и замедленного (20 дней) роста, а также стационарная фаза (30 дней). R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах обозначают статистически значимую разницу ($p < 0,05$) средних значений.

локализацию. Также *RcPrx07* на 83% гомологична изоформе *AtPrx33* арабидопсиса, которая инициирует растяжение клеток и осуществляет регуляцию процессов роста посредством окисления ауксинов (Passardi et al., 2006). В совокупности, полученные данные позволяют предположить, что изоформы *RcPrx01*, *RcPrx05* и *RcPrx07* участвуют в процессах роста и дифференцировки. Увеличение их экспрессии в конце пассажа может быть связано с массовой гибелью клеток и подготовкой более мелких меристемных клеток к делению. Количество транскриптов *RcPrx03* и *RcPrx04* было очень мало на всех стадиях пассажа (Рис. 9), тогда как в условиях стресса их экспрессия значительно увеличивалась (Рис. 11). При этом, как было указано ранее, изоформа *RcPrx03* гомологична гену *TP02* пероксидазы табака, которая участвует в процессах лигнификации, что также является частью защитной стратегии растительной клетки.

3.7.2. Динамика изоферментного состава и активности пероксидаз III класса

Проведен изоферментный анализ пероксидаз и анализ общей пероксидазной активности в контрольной и *rolB*-трансгенных культурах марены (Таблица 8; Рис. 10). В культуре R была идентифицирована одна изоформа щелочной природы на всех стадиях и появление дополнительной – в конце пассажа, три – в клеточной культуре RBL, тогда как в культурах с наивысшим уровнем экспрессии *rolB* (RBM и RBH) обнаружили значительную активацию и появление дополнительных изоформ во всех фазах роста (Рис. 10). Полученные результаты

согласуются с данными об экспрессии и общей активности пероксидаз (Рис. 9, Табл. 8).

Изоферментные спектры пероксидаз демонстрируют наличие активирующего эффекта гена *rolB* на ферменты на всех стадиях роста (Рис. 10). Денситометрический анализ позволил установить, что пероксидазная активность на 5-ый день пассажа во всех культурах достаточно высока, что связано, вероятно, с сохранением высокой пероксидазной активности в инокулируемых клетках. Качественные различия изоферментных паттернов в трансгенных культурах RBM и RBH минимальны, однако, в последней присутствуют дополнительные изоформы щелочной природы, которые также появляются в культуре RBM в конце пассажа (Рис. 10, 30 дней).

Мы показали увеличение пероксидазной активности во всех трех *rolB*-трансгенных культурах по сравнению с контрольной культурой (Табл. 8). Данный эффект сохраняется на всех стадиях роста. Наивысшие значения пероксидазной активности в *rolB*-трансгенных культурах достигаются на 15-ый день – в фазе линейного роста, когда активны процессы клеточного деления и синтеза структурных элементов клетки. Вероятно, в этот период пероксидазы выполняют не столько защитную, сколько регуляторную функцию, изменяя плотность клеточной стенки и принимая участие в процессах деления и растяжения. Одним из возможных объяснений высокой активности пероксидаз III класса может служить известный факт об их роли в катаболизме ауксинов, которые влияют на способность клеток к делению (Romano et al., 1991). В частности, окисляя молекулы ИУК, пероксидазы уменьшают внутриклеточный уровень ауксинов (Hinman, Lang, 1965). Однако данный сценарий маловероятен в связи с тем, что этот процесс привел бы к изменению баланса ауксинов/цитокининов; это, в свою очередь, вызвало бы изменения в фенотипе культуры с образованием дополнительных корней или побегов, а также значительное увеличение ростовых параметров, что не характерно для *rolB*-трансгенных культур (Таблица 8; Bulgakov et al., 2012).

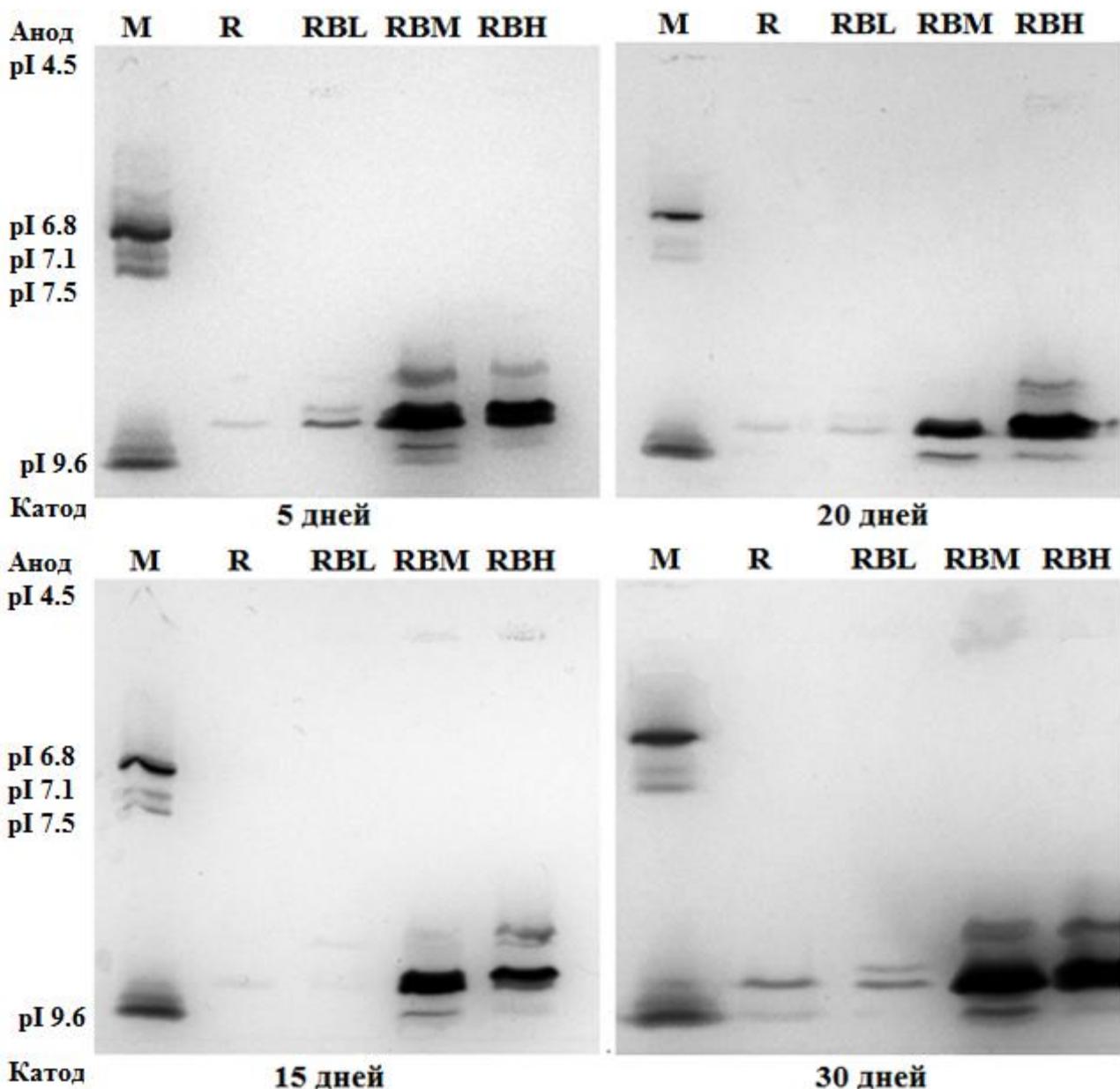


Рис. 10. Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в клеточных культурах *R. cordifolia* с разным уровнем экспрессии гена *rolB* в разных фазах роста: лаг-фаза (5 дней), фаза линейного (15 дней) и замедленного (20 дней) роста, а также стационарная фаза (30 дней). М – маркер для изоэлектрического фокусирования, Р – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB* соответственно.

Одна из главных функций пероксидаз – регуляция уровня перекиси – сигнальной молекулы, которая осуществляет контроль процессов растяжения (Passardi et al., 2004). В частности, ранее на примере кабачка (*Cucurbita pepo*) было показано, что накопление мРНК анионной пероксидазы *APRX* максимально

в зоне элонгации гипокотеля, где необходимо поддерживать низкий уровень перекиси (Dunand et al., 2003). Пероксидазы III класса также могут осуществлять окисление аскорбата с последующим образованием дегидроаскорбата (Yamazaki, Piette, 1961; Kvaratskhelia et al., 1997), тогда как соотношение двух этих соединений в апопласте является одним из ключевых показателей для успешного растяжения клеточной стенки (Kato, Esaka, 1999). К концу пассажа, когда тормозится активное деление клеток и происходит увеличение объема и содержания вакуолей, наблюдается активация процессов биосинтеза, в том числе, пероксидаз III класса, о чем свидетельствуют данные нативного изоэлектрического фокусирования и продукции пероксидаз (Рис. 10; Табл. 8). Таким образом, исследование динамики накопления и активности пероксидаз показало, что эти ферменты также участвуют в фундаментальных процессах роста и развития растительных клеток в условиях *in vitro*.

3.7.3. Динамика накопления биомассы и продукции пероксидаз III класса

На следующем этапе работы проведена оценка ростовых и биосинтетических характеристик нормальной и *rolB*-трансгенных клеточных культур *R. cordifolia* с разным уровнем экспрессии трансгена в течение одного периода культивирования (30 дней). Мы измеряли изменение содержания и активности пероксидаз в разных фазах роста, включая лаг-фазу (5 дней), экспоненциальную фазу (15 дней), фазу замедленного роста (20 дней) и стационарную фазу (30 дней). Продукция пероксидаз была рассчитана на основании ростовых характеристик и уровня общей пероксидазной активности клеточных культур (Табл. 8).

В соответствии с нашими расчетами, общая продукция пероксидаз в *rolB*-трансформированных каллусах *R. cordifolia* была выше, чем в нормальной культуре (880—2020 нкат/л по сравнению с 62 нкат/л соответственно). Самый высокий уровень продукции был обнаружен в каллусах со средним уровнем экспрессии, пик которого находился в фазе замедленного роста (Табл. 8).

Таблица 8
Динамика активности, накопления пероксидаз и биомассы в нормальной и *rolB*-трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia*

Клеточная культура	Возраст, дней	Свежая биомасса, г/л	Общая пероксидазная активность, нкат/г свежей биомассы	Общая продукция пероксидаз, нкат/л
R	5	58±4 ⁱ	0.06±0.01 ^k	4±1 ^k
	15	175±8 ^e	0.10±0.02 ^k	18±3 ^j
	20	297±12 ^{bc}	0.21±0.03 ^j	62±5 ⁱ
	30	346±18 ^a	0.12±0.05 ^{jk}	42±13 ⁱ
RBL	5	46±2 ^{jk}	1.2±0.10 ⁱ	55±3 ⁱ
	15	122±8 ^{gh}	5.5±0.70 ^f	671±43 ^g
	20	246±17 ^{cd}	3.5±0.60 ^g	880±83 ^f
	30	308±20 ^{ab}	2.8±0.20 ^h	850±4 ^f
RBM	5	40±2 ^k	3.5±0.20 ^g	140±17 ^h
	15	90±11 ^h	14.1±0.80 ^b	1260±79 ^d
	20	171±16 ^{ef}	11.8±0.70 ^c	2020±75 ^a
	30	231±14 ^d	7.4±0.40 ^e	1700±21 ^b
RBH	5	30±1 ^l	5.1±0.10 ^f	150±1 ^h
	15	57±5 ^{ij}	19.3±0.90 ^a	1100±30 ^e
	20	103±13 ^{gh}	15.1±0.60 ^b	1560±105 ^c
	30	128±16 ^{fg}	10.3±0.30 ^d	1320±113 ^d

R – нетрансформированная клеточная культура; RBL, RBM, RBH – трансгенные клеточные культуры с низким, средним и высоким уровнем экспрессии гена *rolB*, соответственно. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^{a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l}) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0,05$) средних значений.

Накопление биомассы максимально в период с 15 до 20 дней, когда клеточные культуры находятся в фазе логарифмического роста и активно делятся, тогда как с переходом в стационарную фазу темпы роста снижаются во всех культурах (Табл. 8). Примечательно, что с увеличением уровня экспрессии гена *rolB* количество биомассы уменьшается, однако темпы прироста одинаковы во всех фазах роста как в контроле, так и во всех *rolB*-трансгенных культурах. Ранее в нашей лаборатории было показано, что *rolB*-трансгенные клетки отличаются от контрольных более крупными размерами и большей продолжительностью жизни, в связи с чем была высказана гипотеза о том, что *rolB* увеличивает

продолжительность клеточного цикла (Bulgakov et al., 2012). Полученные данные согласуются с этим предположением.

Аналогичная тенденция наблюдается в продукции пероксидаз (Табл. 8). В период экспоненциальной фазы продукция увеличивается на 225%, 610%, 455% и 365% по сравнению с лаг-фазой в ряду R, RBL, RBM, RBH, тогда как с переходом в стационарную фазу эти показатели снижаются до 34%, 48%, 42% и 43% соответственно по сравнению с фазой замедленного роста. Полученные данные согласуются с модельной кривой роста каллусных культур в условиях *in vitro* (Бутенко и др., 1999).

Таким образом, анализ экспрессии, общей пероксидазной активности и данные изоферментного фокусирования свидетельствуют о наличии положительной корреляции между уровнем экспрессии гена *rolB* и эффекта активации в отношении патоген-связанных генов, кодирующих растительные пероксидазы III класса семейства PR-9. Исследование изоферментного состава пероксидаз в *rolB*-трансформированных клетках показало, что активность ферментов сохраняется на всех стадиях роста и зависит от стадии развития растительных клеток.

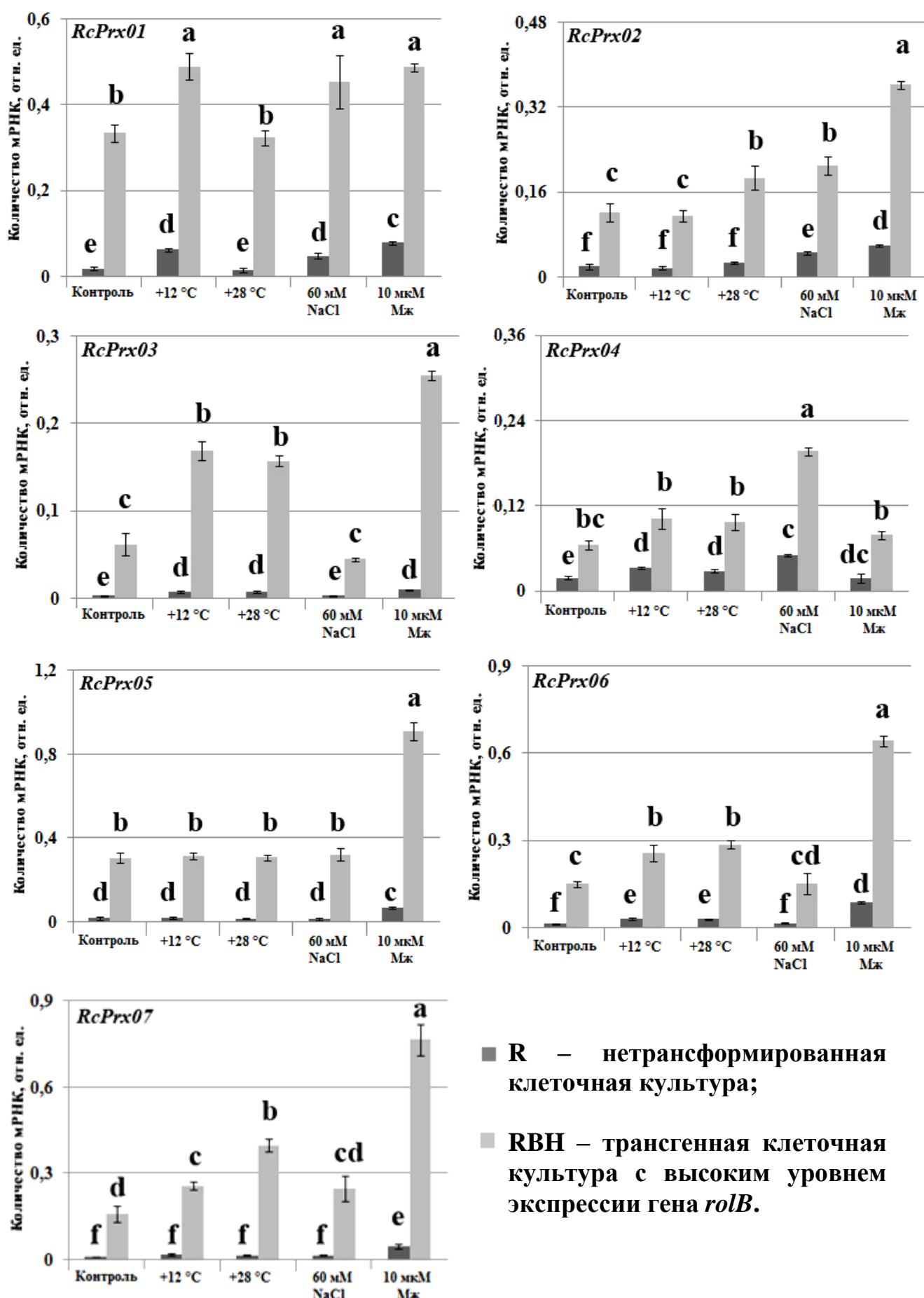
Очевидно, что постоянная сверхпродукция пероксидаз является стрессом для клеток, а сам биосинтез представляет энергозатратный процесс с использованием многих внутренних ресурсов клетки. Тем не менее, несмотря на то, что в течение долгого времени клеточные культуры находятся в условиях постоянной перегрузки пероксидазами, это не оказало негативного влияния на их жизнеспособность (Bulgakov et al., 2013). Ранее также были получены данные о том, что окислительно-восстановительный статус *rolB*-трансгенных клеток поддерживается в диапазоне нормальных значений, а уровень внутриклеточных АФК был ниже, чем в контроле (Bulgakov et al., 2012). Кроме того, экспрессия *rolB* предупреждала гибель клеток в результате некроза и апоптоза, а также увеличивала устойчивость клеток к неблагоприятным воздействиям (Bulgakov et al., 2013).

3.8. Активация пероксидаз под влиянием других стрессовых факторов

3.8.1. Влияние абиотических воздействий и метилжасмоната на экспрессию генов пероксидаз III класса *R. cordifolia*

Защитная стратегия растительных клеток в неблагоприятных условиях включает активацию различных механизмов, в том числе, повышение содержания и активности пероксидаз III класса (Mika et al., 2004). Например, температурные стрессы, NaCl и метилжасмонат являются известными стресс-факторами, вызывающими активацию пероксидаз (Park et al., 2003, Repka et al., 2004, Kumari et al., 2006, Mika et al., 2010, Gao et al., 2010; Wang et al., 2013). В связи с этим, на данном этапе работы перед нами стояло две задачи. Во-первых, определить роль пероксидаз III класса марены в защитных реакциях в условиях абиотического стресса и обработки метилжасмонатом. Во-вторых, поскольку постоянная экспрессия чужеродных генов также является стрессом для растительной клетки, нам было интересно провести сравнительный анализ действия *rolB* и других стресс-факторов, оказывающих влияние на пероксидазы III класса. В данной серии экспериментов мы использовали культуры R и RBH, которые инкубировали в условиях низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температур, а также в присутствии 60 мМ NaCl и 10 мкМ метилжасмоната (Мж) в течение одного полного периода пассажа (30 дней).

Результаты ПЦР-РВ показали, что различные типы стрессов активировали специфичные изоформы генов *RcPrx* как в контрольной, так и *rolB*-трансгенной культурах *R. cordifolia* (Рис. 11). Так, в обеих культурах холодовой стресс активировал экспрессию *RcPrx01*, *RcPrx03* и *RcPrx06*, тепловой – изоформ *RcPrx03* и *RcPrx06*. Добавление 60 мМ NaCl привело к активации *RcPrx01*, *RcPrx02* и *RcPrx04* как в контрольной, так и *rolB*-трансгенной культурах. Самый сильный стимулирующий эффект на пероксидазы оказал метилжасмонат, активируя при этом экспрессию большинства изоформ *RcPrx* как в контрольной, так и *rolB*-трансгенной культурах *R. cordifolia* – максимальный уровень активации



- R – нетрансформированная клеточная культура;
- RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*.

Рис. 11. Экспрессия генов *RcPrx01—RcPrx07* в культурах *R. cordifolia* в нормальных и стрессовых условиях: под действием низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температур, с добавлением 60 мМ NaCl или 10 мкМ метилжасмоната (Мж). R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^{a, b, c, d, e, f}) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0.05$) средних значений в рядах.

был отмечен для изоформ *RcPrx06* и *RcPrx07*. Изоформа *RcPrx05* оказалась нечувствительна ко всем воздействиям, за исключением обработки метилжасмонатом с увеличением экспрессии в 3 раза в обеих культурах, что указывает на то, что кодируемый данным геном изофермент не участвует в защитных реакциях в данных условиях. Примечательно, что данная изоформа на 82% гомологична гену *SSP* пероксидазы III класса *Senecio squalidus*, экспрессия которой обнаружена в рыльце цветка и увеличивается по мере развития пыльцевой трубки (McInnis et al., 2005). В обеих культурах, R и RBH, изоформа *RcPrx03* активировалась при всех типах воздействия (от 1.6 до 4.2 раз), кроме обработки NaCl, тогда как *RcPrx04* активировалась только в ответ на действие соли. Изоформа *RcPrx03* на 82% гомологична гену анионной пероксидазы табака *TP02* (*N. tabacum*), которая участвует в лигнификации (Lagrimini et al., 1987). Ранее было показано, что ген *TmPrx1* пероксидазы пшеницы (*Triticum monosaccum*), гомологичный *RcPrx04* (74% идентичности), также значительно активировался в присутствии NaCl и метилжасмоната, но был не чувствителен к изменению температуры (Liu et al., 2005).

Важно отметить, что ни одно из исследованных стрессовых воздействий не оказалось отрицательного эффекта на экспрессию семи изоформ генов *RcPrx* как в нормальной, так и в *rolB*-трансгенной культурах *R. cordifolia*.

3.8.2. Активность и изоферментный состав пероксидаз III класса в условиях абиотического стресса

Культивирование в течение 30 дней в условиях стресса оказало различное влияние на пероксидазную активность в культурах R и RBH (Таблица 9). Так, действие низкой и высокой температур не оказалось выраженного эффекта на пероксидазы III класса в обеих культурах, тогда как присутствие NaCl и метилжасмоната вызывало существенное увеличение активности в культуре R (в 16 и 21 раз соответственно). В культуре RBH абиотический стресс стимулировал пероксидазную активность в значительно меньшей степени (от 1.1 до 1.7 раз по сравнению с нормальными условиями), что свидетельствует о лучшей адаптации *rolB*-трансгенных культур марены к неблагоприятным условиям и согласуется с ранее полученными данными об их повышенной устойчивости (Bulgakov et al., 2012). Эти данные подкреплены результатами ИЭФ (Рис. 12). Наибольший уровень активности в культуре RBH отмечен в области высоких значений pH, где сконцентрированы пероксидазы щелочной природы, в частности, RcPrx01, RcPrx03 и RcPrx06 с рI 8.78, 9.35 и 8.76 соответственно (Табл. 3), гены которых также отличались высоким уровнем экспрессии как в нормальных, так и неблагоприятных условиях (Рис. 11). При этом, в культуре R появляется дополнительная изоформа в области значений, соответствующих изоэлектрической точке изофермента RcPrx01 (рI 8.78) (Рис. 12; Табл. 3), что также согласуется с данными об экспрессии (Рис. 11).

На продукцию пероксидаз в культуре RBH исследованные типы стрессов не оказали значительного влияния, тогда как в культуре R добавление NaCl и метилжасмоната привело увеличению показателей в 3.6 и 8.4 раз соответственно (Табл. 9). Эти данные согласуются с результатами ИЭФ (Рис. 12).

Накопление биомассы, продукция и активность пероксидаз III класса в клеточных культурах *R. cordifolia* после 30 дней культивирования в нормальных и стрессовых условиях: при низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температуре, добавлении 60 мМ NaCl и 10 мкМ метилжасмоната

	Клеточная культура	Свежая биомасса, г/л	Общая пероксидазная активность, нкат/г свежей биомассы	Продукция пероксидаз, нкат/л
Нормальные условия (+24°C)	R	317±12 ^a	0.15±0.02 ^g	48±5 ^f
	RBH	141±6 ^b	9.80±0.50 ^c	1382±12 ^b
Холодовой стресс (+12°C)	R	61±4 ^e	0.38±0.03 ^f	23±1 ^g
	RBH	89±3 ^d	10.90±0.60 ^{bc}	970±20 ^c
Тепловой стресс (+28°C)	R	96±7 ^d	0.25±0.03 ^{fg}	24±1 ^g
	RBH	124±4 ^c	12.30±0.80 ^b	1525±47 ^a
Солевой стресс (60мМ NaCl)	R	69±5 ^e	2.50±0.20 ^e	173±2 ^e
	RBH	101±6 ^d	15.66±0.60 ^a	1582±32 ^a
Метилжасмонат, 10 мкМ	R	128±9 ^b	3.15±0.20 ^d	403±7 ^d
	RBH	61±7 ^e	16.80±0.70 ^a	1025±65 ^c

R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*. Данные представлены в виде средних значений ± стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^{a, b, c, d, e, f, g}) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0.05$) средних значений в рядах.

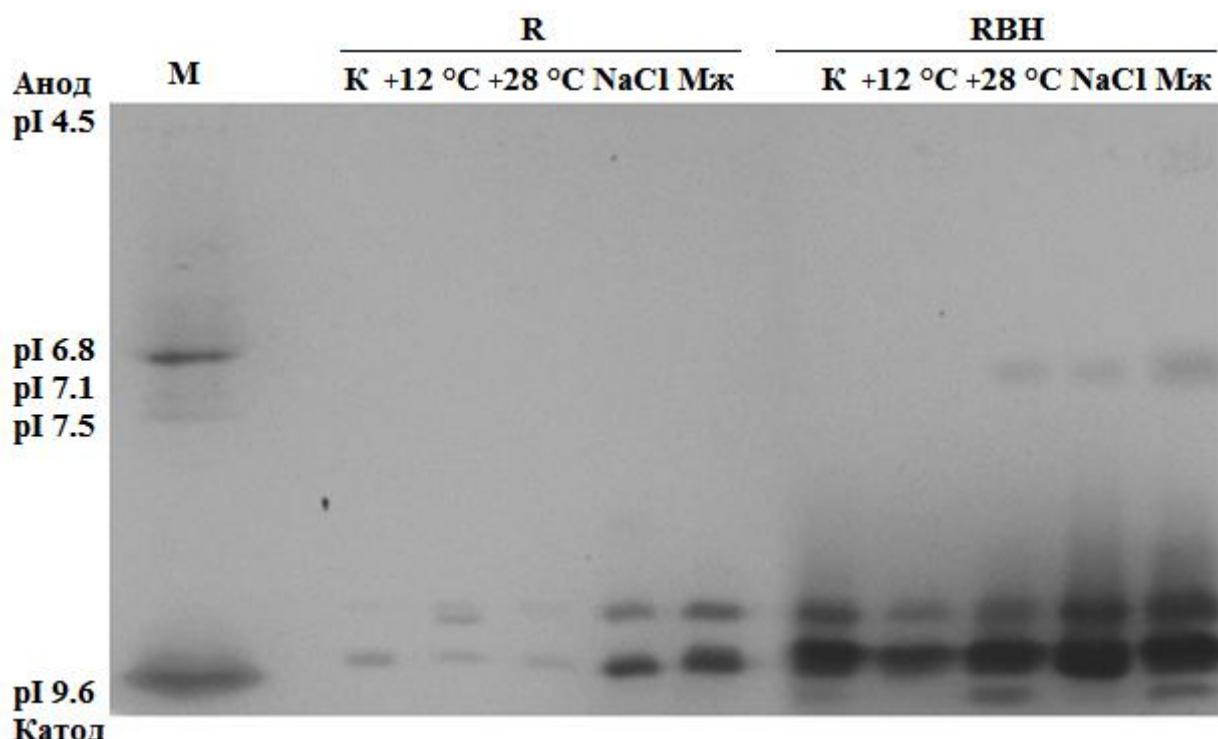


Рис. 12. Нативное изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *R. cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена в нормальных (К) и стрессовых условиях: под действием низкой (+12°C) и высокой (+28°C) температур, 60 мМ NaCl и 10 мкМ метилжасмоната (Мж). М – маркер для изоэлектрического фокусирования; R – нетрансформированная клеточная культура; RBH – трансгенная клеточная культура с высоким уровнем экспрессии гена *rolB*.

Таким образом, в данной серии экспериментов нам удалось идентифицировать изоформы пероксидаз III класса, специфично индуцируемые в ответ на действие определенных абиотических стрессовых факторов, а также показать, что, несмотря на чувствительность пероксидаз к неблагоприятным условиям, степень их активации в условиях стесса была значительно ниже, чем в случае трансформации геном *rolB* (Рис. 11; Табл. 6). Полученные нами данные не только свидетельствуют о большей устойчивости *rolB*-трансгенных клеток, но и являются доказательством в пользу того, что данный подход является эффективным способом активации растительных пероксидаз III класса. В связи с этим, на следующем этапе работы нам предстояло выяснить, сохраняется ли эффект активации пероксидаз III класса геном *rolB* в клеточных культурах других видов растений.

3.9. Эффект трансформации геном *rolB* на пероксидазы III класса *Rhodiola roseus* и *Silene vulgaris*

В данной серии экспериментов мы использовали нормальные и *rolB*-трансгенные клеточные культуры *Rh. roseus* и *S. vulgaris*. Данные культуры имели разный уровень активности пероксидаз и, значит, могли отличаться по степени их активации. Так, в нетрансформированной культуре *S. vulgaris* уровень пероксидазной активности был очень низок – 0.32 нкат/г (Рис. 13Б), тогда как в культуре *Rh. roseus* базовый уровень пероксидазной активности был значительно выше – 8.4 нкат/г, что связано, по всей вероятности, с различными условиями освещения при культивировании.

Методом ПЦР-РВ мы установили, что уровень экспрессии гена *rolB* в трансгенных культурах родиолы (RhB) и смолевки (SB) был сопоставим с экспрессией трансгена в культуре RBM *R. cordifolia* (Рис. 13 А). Результаты измерения общей пероксидазной активности (Рис. 13 Б), показали 2.1- и 75.2-кратное увеличение ферментативной активности в трансгенных культурах RhB и SB соответственно, что свидетельствует о наличии активирующего эффекта трансгена на пероксидазы культур *Rh. roseus* и *S. vulgaris*. Вероятно, что больший эффект *rolB* оказывает на клетки с низким базовым уровнем активности пероксидаз, тогда как в клетках с более высоким уровнем пероксидаз эффект активации менее выраженный. Данное предположение согласуется с результатом изоферментного разделения пероксидаз *Rh. roseus* и *S. vulgaris* (Рис. 14).

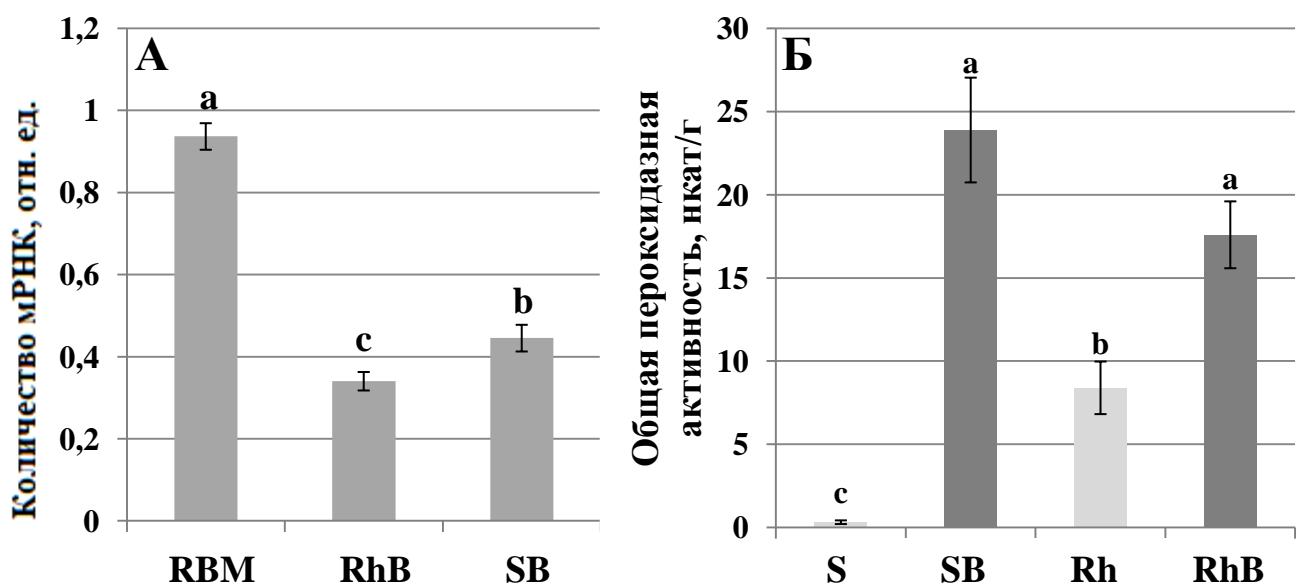


Рис. 13. Экспрессия гена *rolB* (А) и общая пероксидазная активность (Б) в клеточных культурах *R. cordifolia*, *Rh. roseus* и *S. vulgaris*. RBM – трансгенная клеточная культура *R. cordifolia* со средним уровнем экспрессии гена *rolB*, Rh и S – нетрансформированные клеточные культуры; RhB и SB – *rolB*-трансгенные клеточные культуры *Rh. roseus* и *S. vulgaris* соответственно. Данные представлены в виде средних значений \pm стандартная ошибка. Различия в надстрочных индексах (^a, ^b, ^c) обозначают статистически значимую разницу ($p < 0.05$) средних значений в рядах.

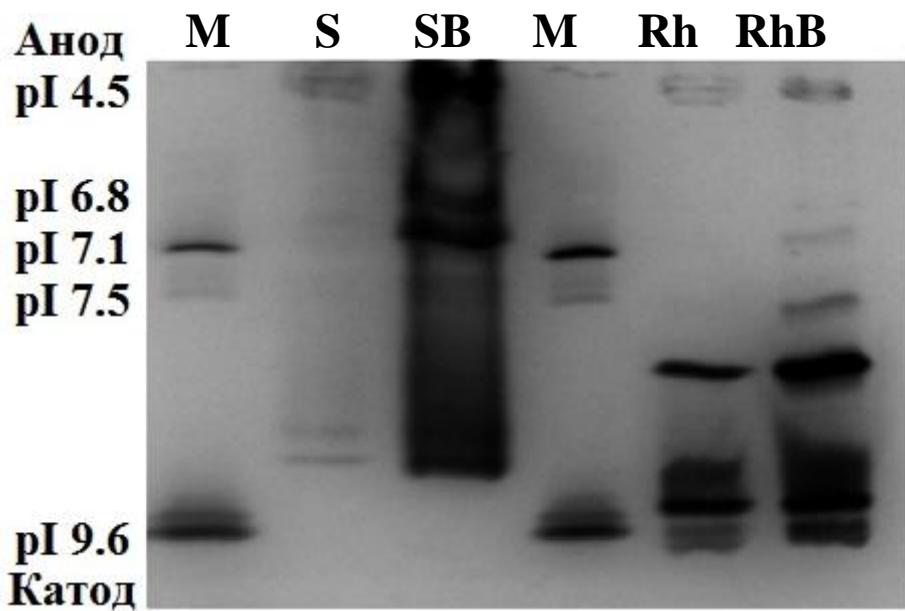


Рис. 14. Изоэлектрическое фокусирование пероксидаз в *rolB*-трансгенных клеточных культурах *Rh. roseus* и *S. vulgaris* на 30-ый день культивирования. М – маркер для изоэлектрического фокусирования, Rh и S – нетрансформированные клеточные культуры; RhB и SB – *rolB*-трансгенные клеточные культуры *Rh. roseus* и *S. vulgaris* соответственно.

Таким образом, используя клеточные культуры растений *R. cordifolia*, *Rh. rosea* и *S. vulgaris* мы показали, что сверхэкспрессия агробактериального гена *rolB* в трансформированных клеточных культурах приводит к активации растительных пероксидаз III класса, что дает возможность использовать данный подход в рамках биотехнологического производства. С точки зрения коммерческой ценности и широкого применения пероксидаз в различных отраслях производства, такая модельная система может служить эффективным и экологически безопасным источником данных ферментов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования в области биотехнологии и генетической инженерии растений направлены главным образом на достижение практически значимого результата – получение растений или клеточных культур с высокими биосинтетическими показателями, а также растений, устойчивых к различным стрессовым воздействиям. При этом немаловажен фундаментальный аспект подхода – выявление молекулярных механизмов действия исследуемых эффекторов.

Трансформация клеточных культур ценных лекарственных растений генами *rol* из *A. rhizogenes* оказывает значительный стимулирующий эффект на биосинтез фармакологически-значимых вторичных метаболитов. Результаты комплексного исследования молекулярных механизмов данного эффекта указывают на глобальную перестройку защитных систем растительных клеток, в частности, значительные модуляции отдельных звеньев антиоксидантной системы (Bulgakov et al., 2013).

В настоящей работе были идентифицированы полноразмерные последовательности семи генов, кодирующих растительные пероксидазы III класса *R. cordifolia*. Филогенетический анализ аминокислотных последовательностей пероксидаз марены и других растений показал достоверное разделение на два кластера в зависимости от определенной аминокислотной замены, а также кластеризацию пероксидаз, имеющих сайт связывания с кальцием/кальмодулином.

Исследование тканеспецифичных особенностей экспрессии генов пероксидаз показало, что в листьях и стеблях высоко содержание транскриптов *RcPrx01*, *RcPrx06* и *RcPrx07*, тогда как *RcPrx02* и *RcPrx04* обнаружены в незначительных количествах. Важно отметить, что содержание транскриптов генов *RcPrx* с высокими показателями уровня экспрессии в стеблях выше, чем в листьях, что, по всей видимости, связано с большей степенью лигнифицированности стебля. Полученные данные согласуются с известными

работами, проведенными ранее, и свидетельствуют о том, что особенности тканеспецифичного распределения генов *RcPrx01—RcPrx07* соответствуют паттернам экспрессии гомологичных генов других видов растений. Показано, что с утратой дифференцировки экспрессия всех идентифицированных семи генов *RcPrx* в каллусной культуре становится значительно ниже по сравнению с таковой в исследованных органах растения.

Нами показано, что трансформация геном *rolB* приводит к активации транскрипции генов пероксидаз III класса, сопровождающейся увеличением экспрессии всех исследуемых изоформ в десятки и сотни раз. Также установлено, что эффект активации носит дозо-зависимый характер. Показана положительная корреляция между экспрессией генов *RcPrx01—RcPrx07* и уровнем экспрессии гена *rolB* в культурах RBL, RBM и RBH с низким, средним и высоким уровнем трансгена соответственно. Эффект активации подтвержден результатами измерения общей пероксидазной активности и ИЭФ: активность ферментов пероксидаз в *rolB*-экспрессирующих клетках значительно возросла и также зависела от уровня экспрессии трансгена. Исследование экспрессии генов *RcPrx01—RcPrx07* и анализ изоферментного состава пероксидаз в *rolB*-трансформированных клетках показали, что активация ферментов сохраняется во всех фазах роста и согласуется с модельной кривой роста каллусных культур. Важно отметить, что этот эффект характерен только для *rolB*-трансгенных культур, тогда как сверхэкспрессия гена *rolC*, а также совместная экспрессия *rolB* и *rolC* под контролем нативных промоторов в составе дикого штамма A4, не оказала значительного влияния на содержание и активность пероксидаз в трансформированных культурах марены. Таким образом, наши данные демонстрируют существенные различия в механизмах регуляторного действия генов *rolB* и *rolC* в отношении пероксидаз III класса. Вероятно также, что при их совместной экспрессии, *rolC* или другой ген, содержащийся в Т-ДНК дикого штамма агробактерий, предотвращает повышенную экспрессию генов *RcPrx*, обуславливаемую геном *rolB*.

Проведено исследование молекулярных механизмов *rolB*-индуцируемой активации пероксидаз III класса. На основании литературных данных и результатов, полученных в нашей лаборатории ранее, было выдвинуто предположение, что активация пероксидаз носит неспецифический характер и является частью компенсаторного механизма на фоне изменения редокс-статуса, вызванного активацией НАДФН-оксидаз в *rolB*-трансгенных культурах (Bulgakov et al., 2013). Однако данное предположение не подтвердилось в наших экспериментах. Трансформация клеточной культуры марены мутантной, постоянно активной формой гена *AtCPK1* – известным активатором НАДФН-оксидаз, не привела к прогнозируемой активации пероксидаз на фоне увеличенного содержания АФК. На основании полученных данных мы сделали вывод о том, что активация пероксидаз III класса в результате трансформации геном *rolB* является, по-видимому, специфичным ответом растительной клетки на сигнал, генерируемый белком RolB.

Действие абиотическими стрессовыми факторами позволило установить, что трансгенные культуры *R. cordifolia* были более устойчивы к стрессам различного происхождения, тогда как паттерн экспрессии во многом совпадал с таковым в нормальной клеточной культуре. Обнаружена изоформа, практически не чувствительная к действию неблагоприятных факторов – *RcPrx05*, при этом ее экспрессия в дифференцированных органах растения была достаточно высока. Вероятно, эта изоформа участвует в процессах роста и развития. Кроме того, были идентифицированы изоформы, специфично реагирующие на изменение температуры – *RcPrx03* и *RcPrx06*, а также на присутствие NaCl в среде – *RcPrx04*. Самый значительный эффект на пероксидазы оказало культивирование на среде с добавлением метилжасмоната, что вызвало индукцию всех изоформ пероксидаз. Данные об экспрессии согласуются с результатами изоферментного фокусирования. Важно отметить, что ни один из экспериментально исследованных стрессов не привел к значительной активации пероксидаз III класса, сопоставимой с эффектом трансформации геном *rolB*.

В рамках биоинженерии растений возможны два подхода по созданию суперпродуцентов пероксидаз в условиях *in vitro*. Первый из них предполагает индукцию генов пероксидаз воздействиями извне (например, с помощью добавления элиситоров). Однако наши результаты демонстрируют, что подобный прием не приводит к значительному и, что не менее важно, долговременному результату. По сравнению с классическими методами, индукция пероксидаз геном *rolB* гораздо сильнее (на примере марены сердцелистной показано, что продукция ферментов увеличивается до 32.1 раз в сравнении с 8.4 раз при добавлении метилжасмоната) и сохраняется в течение длительного времени. В этой связи особенно важно, что *rolB*-индуцируемый эффект активации сохраняется в клеточных культурах других видов растений, что было подтверждено на примере родиолы розовой и смолевки обыкновенной. Второй подход может включать гетерологичную экспрессию генов пероксидаз. Однако данный метод имеет некоторые ограничения, главным из которых является мультигенность семейства пероксидаз, поэтому сверхэкспрессия отдельных изоформ не является перспективной для увеличения общей продуктивности ферментов пероксидаз. С другой стороны, данный подход может быть использован для получения трансгенных растений, устойчивых к стрессовым факторам, в связи с чем идентификация индивидуальных изоформ, чувствительных к определенным типам воздействий, может найти практическое применение в генной инженерии растений. С точки зрения биотехнологии, модельная система, основанная на трансформации геном *rolB*, обладает рядом преимуществ: она позволяет эффективно стимулировать биосинтез пероксидаз III класса, стабильна и является экологически безопасной альтернативой для производства функционально активных ферментов в разных видах растений.

ВЫВОДЫ

1. Идентифицированы семь полноразмерных последовательностей генов пероксидаз III класса *R. cordifolia* – *RcPrx01*, *RcPrx02*, *RcPrx03*, *RcPrx04*, *RcPrx05*, *RcPrx06* и *RcPrx07*.
2. Филогенетический анализ показал разделение пероксидаз на два кластера: *RcPrx01*, *RcPrx03*, *RcPrx04*, *RcPrx05* и *RcPrx06* объединены в один кластер и содержат аминокислотные остатки Arg31 и Ser35. Пероксидазы *RcPrx02* и *RcPrx07* объединены во второй кластер и содержат другие аминокислотные остатки в соответствующих позициях. Пероксидаза *RcPrx07* объединена в подкластер пероксидаз с сайтом связывания Ca^{2+} /кальмодулина.
3. Сверхэкспрессия *rolB* приводит к активации экспрессии генов *RcPrx01*–*RcPrx07* (в 23—314 раз), увеличению общей пероксидазной активности (до 193 раз) и продукции ферментов (до 32 раз).
4. Выявлено, что *rolB*-индуцируемая активация растительных пероксидаз III класса *R. cordifolia* положительно коррелирует с уровнем экспрессии трансгена и сохраняется во всех фазах роста в течение пассажа.
5. Сверхэкспрессия гена *rolC*, а также совместная экспрессия *rolB* и *rolC* под контролем собственных промоторов в составе дикого штамма A4 *A. rhizogenes*, не оказала значительного влияния на пероксидазы III класса *R. cordifolia*.
6. Активация растительных пероксидаз III класса геном *rolB* является специфичным эффектом трансгена, и не обусловлена повышением уровня внутриклеточных активных форм кислорода на фоне трансформации.
7. Ген *rolB* активирует продукцию растительных пероксидаз III класса марены сердцелистной значительно эффективнее по сравнению с известными элиситорами и факторами абиотического стресса.
8. В клеточных культурах *S. vulgaris* и *Rh. rosea* ген *rolB* также вызывает индукцию пероксидаз, и данный эффект зависит от исходного уровня активности ферментов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

2,4-Д – 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота,
4-МН – 4-метокси- α -нафтол,
а.о. – аминокислотный остаток,
АОС – антиоксидантная система,
АФК – активные формы кислорода,
БАП – 6-бензиламинопурин,
ГПО – глутатионпероксидаза,
ИЭФ – изоэлектрическое фокусирование,
ИУК – индолил-уксусная кислота,
ИФА – иммуноферментный анализ,
Мж – метилжасмонат,
АНУ – α -нафтил-уксусная кислота,
ОРС – открытые рамки считывания,
ОТ – обратная транскрипция,
п.н. – пара нуклеотидов,
ПААГ – полиакриламидный гель,
ПОЛ – перекисное окисление липидов,
ПЦР – полимеразная цепная реакция,
Т-ДНК – транспортная ДНК,
ANOVA – многофакторный дисперсионный анализ,
ELISA – иммуноферментный твердофазный анализ,
HRP – пероксидаза хрина,
ML – метод максимального правдоподобия,
MP – метод максимальной экономии,
NJ – метод «ближайших соседей»,
PLSD – пост-хок тест Фишера,
PR-белки – патоген-обусловленные белки,
R – нетрансформированная (контрольная) культура *Rubia cordifolia*,

R-Ca – трансгенная культура *Rubia cordifolia*, трансформированная Ca^{2+} -независимой постоянно активной формой гена *AtCPK1*,

R-Na – трансгенная культура *Rubia cordifolia*, трансформированная неактивной формой гена *AtCPK1*,

RA4 – трансгенная культура *Rubia cordifolia*, трансформированная диким штаммом *A. rhizogenes* A4,

RACE – быстрая амплификация концевых фрагментов кДНК,

RBL – *rolB*-трансгенная культура *Rubia cordifolia* с низким уровнем экспрессии трансгена,

RBM – *rolB*-трансгенная культура *Rubia cordifolia* со средним уровнем экспрессии трансгена,

RBH – *rolB*-трансгенная культура *Rubia cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена,

RCH – *rolC*-трансгенная культура *Rubia cordifolia* с высоким уровнем экспрессии трансгена,

Rh – нетрансформированная (контрольная) культура *Rhodiola rosea*,

RhB – *rolB*-трансгенная культура *Rhodiola rosea*,

S – нетрансформированная (контрольная) культура *Silene vulgaris*,

SB – *rolB*-трансгенная культура *Silene vulgaris*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева В.А. Фермент пероксидаза: участие в защитном механизме растений // М.: Наука, 1988. – 128 с.
2. Бутенко Р.Г. Биология клеток высших растений *in vitro* и биотехнологии на их основе: учебное пособие. М.: ФБК-Пресс. 1999. 159 с.
3. Газарян И.Г. Хушпульян Д.М., Тишков В.И. Особенности структуры и механизма действия пероксидаз растений // Успехи биологической химии. 2006. Т. 46. С. 303–322.
4. Дрейпер Д., Скот С., Армитидж Ф., Дьюри Г., Джэкоб Л., Уолден Р., Кумар А., Джейферсон Р., Хэмил Д. Генная инженерия растений // М.: Мир, 1991.
5. Захарова Г. С., Упоров И. В., Тишков В. И. Пероксидаза из корней хрена: модулирование свойств химической модификацией белковой глобулы и гемма // Успехи биологической химии. 2011. Т. 51. – С. 37–64.
6. Минибаева Ф.В., Гордон Л.Х. Продукция супероксида и активность внеклеточной пероксидазы в растительных тканях при стрессе // Физиология растений. 2003. Т. 50, № 3. – С. 459–464.
7. Лахтин В.М. Молекулярная организация лектинов // Молекулярная биология. 1994. Т. 28. – С. 245–273.
8. Пожванов Г. А., Суслов Д. В., Медведев С. С. Реорганизация актинового цитоскелета при гравистимуляции корней растений арабидопсиса // Труды Томского государственного университета. 2010. Т. 275. – С. 305–308.
9. Полесская О.Г. Растительная клетка и активные формы кислорода. М.: Книжный дом Университет. 2007. - 137 с.
10. Преснова Г. В., Рубцова М. Ю., Егоров А. М. Электрохимические биосенсоры на основе пероксидазы хрена // Российский химический журнал. 2008. Т. LII, № 2. – С. 60-65.
11. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов // СПб.: Гиорд, 2004. – 240 с.

12. Стациенко А.П., Тужилова Л.И., Вьюговский А.А. Растительные пероксидазы – маркеры химического загрязнения природных сред // Вестник Оренбургского государственного университета. 2008. Т. 92, №10. – С. 188–191.
13. Угарова Н.Н., Рожкова Г.Д., Березин И.В. Химическая модификация e-NH₂-групп лизина в пероксидазе из хрена. Влияние ее на каталитические свойства и пространственную структуру фермента // Биохимия. 1978. Т. 43. № 7. – С. 1242–1250.
14. Удинцев С.Н., Бурмистрова Т.И., Заболотская А.В., Жилякова Т.П. Механизмы индукции резистентности растений к фитопатогенам гуминовыми веществами // Вестник Томского государственного университета. Биология. 2011. Т. 16, № 4. – С. 100–107.
15. Шугалей Н. А., Власова А. Б., Федорова А. Т., Федулов А. Л. Поиск промышленных источников выделения растительных пероксидаз, области практического использования полученного фермента // Труды Белорусского государственного университета.. 2010. Т. 5, № 2: 53–62.
16. Шуканов В.П., Волынец А.П., Полянская С.Н. Гормональная активность стероидных гликозидов растений // Минск: Белорусская наука. 2012. – 244 С.
17. Abarca D., Martin M., Sabater B. Differential leaf stress responses in young and senescent plants // Physiologia plantarum. 2001. V. 113, No. 3. – P. 409–415.
18. Abascal F., Zardoya R., Posada D. ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution // Bioinformatics. 2005. V. 21, No. 9. – P. 2104–2105.
19. Abercrombie J., Halfhill M., Ranjan .P, Rao M.R., Saxton A.M., Yuan J.S., Stewart C.N.J. Transcriptional responses of *Arabidopsis thaliana* plants to As (V) stress // BMC Plant Biology. 2008. V.8. – P. 87.
20. Abraham W.R., Nogales B., Golyshin P.N., Pieper D.H., Timmis K.N. Polychlorinated-biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments // Current Opinion in Microbiology. 2002. V. 5, No. 3. – P. 246–253.
21. Agostini E., Hernández-Ruiz J., Arnao M.B., Milrad S.R., Tigier H.A., Acosta M. A peroxidase isoenzyme secreted by turnip (*Brassica napus*) hairy-root cultures:

- inactivation by hydrogen peroxide and application in diagnostic kits // Biotechnology and applied biochemistry. 2002. V. 35. – P. 1–7.
22. Almagro L., Ros L V.G., Belchi-Navarro S. Class III peroxidases in plant defence reactions // Journal of Experimental Botany. 2009. Vol. 60, No 2. – P. 377–390.
23. Altamura M.M., D'Angeli S., Capitani F. The protein of *rolB* gene enhances shoot formation in tobacco leaf explants and thin cell layers from plants in different physiological stages // Journal of Experimental Botany. 1998. V. 49, No. 324. – P. 1139–1146.
24. Altamura M.M. *Agrobacterium rhizogenes* *rolB* and *rolD* genes: regulation and involvement in plant development // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004. V. 7. – P. 89–101.
25. Alvarez M.E., Pennell R.I., Meijer P.J., Ishikawa A., Dixon R.A., Lamb C. Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity // Cell. 1998. V. 92, No. 6. – P. 773–784.
26. Andrews J., Malone M., Thompson D.S., Ho L.C., Burton K.S. Peroxidase isozyme patterns in the skin of maturing tomato fruit // Plant, Cell and Environment. 2000. V. 23, No. 4. – P. 415–422.
27. Arrieta-Baez D., Stark R.E. Modeling suberization with peroxidase-catalyzed polymerization of hydroxycinnamic acids: cross-coupling and dimerization reactions // Phytochemistry. 2006. V. 67, No. 7. – P. 743–753.
28. Asad S., Khajeh K., Ghaemi N. Investigating the structural and functional effects of mutating Asn glycosylation sites of horseradish peroxidase to Asp // Applied Biochemistry and Biotechnology. 2011. V. 164, No. 4. – P. 454–463.
29. Ascenzi P., Brunori M., Coletta M., Desideri A. pH effects on the haem iron coordination state in the nitric oxide and deoxy derivatives of ferrous horseradish peroxidase and cytochrome c peroxidase // The Biochemical journal. 1989. V. 258, No. 2. – P. 473–478.
30. Avouac J., Borderie D., Ekindjian O.G., Kahan A., Allanore Y. High DNA oxidative damage in systemic sclerosis // The Journal of rheumatology. 2010. V. 37, No. 12. – P. 2540–2547.

31. Ayadi R., Tremouillaux-Guiller J. Root formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba* // Tree Physiology. 2003. V. 23. – P. 713–718.
32. Azevedo A.M., Martins V.C., Prazeres D.M., Vojinović V., Cabral J.M., Fonseca L.P. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology // Biotechnology Annual Review. 2003. V. 9. – P. 199–247.
33. Bade P.D., Kotu S.P., Rathore A.S. Optimization of a refolding step for a therapeutic fusion protein in the quality by design (QbD) paradigm // Journal of Separation Science. 2012. V. 35, No. 22. – P. 3160–3169.
34. Bandyopadhyay U., Adak S., Banerjee R.K. Role of active site residues in peroxidase catalysis: studies on horseradish peroxidase // Proceedings of the National Academy of Sciences, India. 1999. V. B65, No. 5. – P. 315–330.
35. Barbosa E.S., Perrone D., Vendramini A.L.A., Leite S.G.F. Vanillin production by *Phanerochaete chrysosporium* grown on green coconut agro-industrial husk in solid state fermentation // BioResources. 2008. V. 3, No. 4. – P. 1042–1050.
36. Barna-Vetró I., Solti L., Téren J., Gyongyosi A., Szabo E., Wolfling A. Sensitive ELISA test for determination of ochratoxin A // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1996. V. 44, No. 12. – P. 4071–4974.
37. Beffa R., Martin H.V., Pilet P.-E. *In vitro* oxidation of indole acetic acid by soluble auxin-oxidases and peroxidases from maize roots // Plant Physiology. 1990. V. 94, No. 2. – P. 485–491.
38. Bell J.N., Ryder T.B., Wingate V.P.M., Bailey J.A., Lamb C.J. Differential accumulation of plant defense gene transcripts in a compatible and incompatible plant-pathogen interaction // Molecular and Cellular Biology. 1986. V. 6, No. 5. – P. 1615–1623.
39. Berkova N., Karawajew L., Korobko V., Behrsing O., Micheel B., Shamorant O., Stukatcheva E., Shingarova L. Development of an enzyme immunoassay for the measurement of human tumor necrosis factor-alpha (hTNF-alpha) using bispecific antibodies to hTNF-alpha and horseradish peroxidase // Biotechnology and applied biochemistry. 1996. V. 23, No. 2. – P. 163–171.

40. Bernards M.A., Lewis N.G. The macromolecular aromatic domain in suberized tissue: a changing paradigm // *Phytochemistry*. 1998. V. 47, No. 6. – P. 915–933.
41. Bernards M.A., Fleming W.D., Llewellyn D.B., Priefer R., Yang X., Sabatino A., Plourde G.L. Biochemical characterization of the suberization-associated anionic peroxidase of potato // *Plant Physiology*. 1999. V. 121, No. 1. – P. 135–46.
42. Bernards M.A., Summerhurst D.K., Razem F.A. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: the suberin connection // *Phytochemistry Reviews*. 2004. V.3, No. 1-2. – P. 113–126.
43. Bestwick C.S., Brown I.R., Mansfield J.W. Localized changes in peroxidase activity accompany hydrogen peroxide generation during the development of a nonhost hypersensitive reaction in lettuce // *Plant Physiology*. 1998. V. 118, No. 3. – P. 1067–1078.
44. Bhattacharyya D.K., Bandyopadhyay U., Chatterjee R., Banerjee R.K. Iodide modulation of the EDTA-induced iodine reductase activity of horseradish peroxidase by interaction at or near the EDTA-binding site // *The Biochemical journal*. 1993. V. 289, No. 2. – P. 575–580.
45. Bindschedler L.V., Dewdney J., Blee K.A. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance // *The Plant Journal*. 2006. V. 47, No. 6. – P. 851–863.
46. Blee K.A., Jupe S.C., Richard G. Molecular identification and expression of the peroxidase responsible for the oxidative burst in French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and related members // *Plant Molecular Biology*. 2001. V. 47, No. 5. – P. 607–620.
47. Bonfill M., Cusido R.M., Palazon J., Canut E., Pinol M.T., Morales C. Relationship between peroxidase activity and organogenesis in *Panax ginseng* calluses // *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 2003. V. 73, No. 1. –P. 37–41.
48. Bonhomme V., Laurain Mattar D., Fliniaux M.A. Effects of the *rolC* gene on hairy root: induction development and tropane alkaloid production by *Atropa belladonna* // *Journal of Natural Products*. 2000. V. 63, No. 9. – P. 1249–1252.

49. Borchert R. Time course and spatial distribution of phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activity in wounded potato tuber tissue // Plant Physiology. 1978. V. 62, No. 5. – P. 789–793.
50. Bradley D.J., Kjellbom P., Lamb C.J. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall structural protein: a novel, rapid plant defence response // Cell. 1992. V. 70, No. 1. – P. 21-30.
51. Brattain M.G., Marks M.E., Pretlow T.G. Purification of horseradish-peroxidase by affinity chromatography on sepharose-bound concanavalin-A // Analytical Biochemistry. 1976. V. 72, No. 1–2. – P. 346–352.
52. Buffard D., Breda C., van Huystee R.B., Asemota O., Pierre M., Ha D.B., Esnault R. Molecular cloning of complementary DNAs encoding two cationic peroxidases from cultivated peanut cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1990. V. 87, No. 22. – P. 8874–8878.
53. Bulgakov V.P., Khodakovskaya M.V., Labetskaya N.V., Chernoded G.K., Zhuravlev Y.N. The impact of plant *rolC* oncogene on ginsenoside production by ginseng hairy root cultures // Phytochemistry. 1998. V. 49, No. 7. 1929-1934.
54. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Khodakovskay M.V., Glazunov V.P., Zvereva E.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Effects of salicylic acid, methyl jasmonate, etephone and cantharidin on anthraquinone production by *Rubia cordifolia* callus cultures transformed with *rolB* and *rolC* genes // Journal of Biotechnology. 2002. V. 97, No. 3. – P. 213-221.
55. Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Shkryl Y.N., Glazunov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Effects of Ca^{2+} , channel blockers and protein kinase/phosphatase inhibitors on growth and anthraquinone production in *Rubia cordifolia* callus cultures transformed by the *rolB* and *rolC* genes // Planta. 2003. V. 217, No. 3. – P. 349–355.
56. Bulgakov V.P., Veselova M.V., Tchernoded G.K., Kiselev K.V., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Inhibitory effect of the *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* gene on rabdosiin and rosmarinic acid production in *Eritrichium sericeum* and *Lithospermum erythrorhizon* transformed cell cultures // Planta. 2005. V. 221, No. 4. – P. 471–478.

57. Bulgakov V.P. Functions of *rol* genes in plant secondary metabolism // Biotechnology Advances. 2008a. V. 26, No. 4. – P. 318–324.
58. Bulgakov V.P., Aminin D.L., Shkryl Y.N., Gorpchenko T.Y., Veremeichik G.N., Dmitrenok P.S., Zhuravlev Y.N. Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the *rolC* oncogene // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2008b. V. 21, No. 12. – P. 1561–1570.
59. Bulgakov V.P., Gorpchenko T.Y., Veremeichik G.N., Shkryl Y.N., Tchernoded G.K., Bulgakov D.V., Aminin D.L., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense // Plant Physiology. 2012. V. 158, No. 3. – P. 1371–1381.
60. Bulgakov V.P., Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Gorpchenko T.Y., Vereshchagina Y.V. Recent advances in the understanding of *Agrobacterium rhizogenes*-derived genes and their effects on stress resistance and plant metabolism // Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology. 2013. V. 134. – P. 1–22.
61. Capone I., Spano` L., Cardarelli M., Bellincampi D., Petit A., Costantino P. Induction and growth properties of carrot roots with different complements of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA // Plant Molecular Biology. 1989. V. 13, No. 43–52.
62. Cardarelli M., Mariotti D., Pomponi M., Spanò L., Capone I., Costantino P. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype // Molecular Genetics and Genomics. 1987. V. 209, No. 3. – P. 475–480.
63. Carneiro M., Vilaine F. Differential expression of the *rolA* plant oncogene and its effect on tobacco development // The Plant Journal. 1993. V. 3, No. 6. – P. 785–792.
64. Carter C., Pan S., Zouhar J., Avila E., Girke T., Raikhel N. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins // Plant Cell. 2004. V. 16, No. 12. – P. 3285–3303.
65. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // Molecular Biology and Evolution. 2000. V. 17, N. 4. – P. 540–552.
66. Castillo J., Ferapontova E.E., Hushpulian D., Tishkov V., Chubar T., Gazaryan I., Gorton L. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of H₂O₂ reduction of

- recombinant tobacco peroxidase on graphite. Effect of peroxidase single-point mutation on Ca²⁺-modulated catalytic activity // *Electrochemistry Communications*. 2006. V. 7, No. 12. – P. 1291–1297.
67. Cesarino I., Araújo P., Paes Leme A.F., Creste S., Mazzafera P. Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2013. V. 62. – P. 1–10.
68. Champagne P.P. Ramsay J.A. Contribution of manganese peroxidase and laccase to dye decoloration by *Trametes versicolor* // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005. V. 69, No. 3. – P. 276–285.
69. Chandra S. Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism // *Biotechnology letters*. 2012. V. 34, No. 3. – P. 407–415.
70. Chassot C., Nawrath C., Metraux J.P. Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen // *The Plant Journal*. 2007. V. 49, No. 6. – P. 972–980.
71. Chen Z., Silva H., Klessig D.F. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid // *Science*. 1993. V. 262, No. 5141. – P. 1883–1885.
72. Chen S.X., Schopfer, P. Hydroxyl-radical production in physiological reactions. A novel function of peroxidase // *European Journal of Biochemistry*. 1999. V. 260, No. 3. – P. 726–735.
73. Chen E.L., Chen Y.A., Chen L.M., Liu Z.H. Effect of copper on peroxidase activity and lignin content in *Raphanus sativus* // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2002. V. 40, No. 5. – P. 439–444.
74. Cheong Y.H., Chang H.S., Gupta R., Wang X., Zhu T., Luan S. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in *Arabidopsis* // *Plant Physiology*. 2002. V. 129, No. 2. – P. 661–677.
75. Chilton M.D., Tepfer D.A., Petit A., Casse-Delbart F., Tempe J. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genome of host plant root cells // *Nature*. 1982. V. 295, No. 5848. – P. 432–434.

76. Chiou C.C., Chang P.Y., Chan E.C., Wu T.L., Tsao K.C., Wu J.T. Urinary 8-dydroxyguanosine and its analogs as DNA marker of oxidative stress: development of an ELISA and measurement in both bladder and prostate cancers // *Clinica Chimica Acta*. 2003. V. 334, No. 1–2. – P. 87–94.
77. Córdoba-Pedregosa M.C., González-Reyes J.A., Cañadillas M.S., Navas P., Córdoba F. Role of apoplastic and cell-wall peroxidases on the stimulation of root elongation by ascorbate // *Plant Physiology*. 1996. V. 112, No. 3. – P. 1119–1125.
78. Cosio C., Vuillemin L., De Meyer M., Kevers C., Penel C., Dunand C. An anionic class III peroxidase from zucchini may regulate hypocotyl elongation thanks to its auxin oxidase activity // *Planta*. 2009. V. 229, No. 4. – P. 823–836.
79. Costa M.M.R., Hilliou F., Duarte P., Pereira L.G., Almeida I., Leech M., Memelink J., Ros Barcelo' A., Sottomayor M. Molecular cloning and characterization of a vacuolar class III peroxidase involved in the metabolism of anticancer alkaloids in *Catharanthus roseus* // *Plant Physiology*. 2008. V. 146, No. 2. – P. 403–417.
80. Costantino P., Capone I., Cardarelli M., De Paolis A., Mauro M. L., Trovato M. Bacterial plant oncogenes: the *rol* genes' saga // *Genetica*. 1994. V. 94, No. 2-3. – P. 203–211.
81. Dandecar A.M., De Buck S., Depicker A. Agrobacterium: From biology to biotechnology/ edited Tzfira T., Citovsky V. NY.: Springer. 2008., 720 p.
82. Daudi A., Cheng Z., O'Brien J.A., Mammarella N., Khan S., Ausubel F.M., Bolwell G.P. The apoplastic oxidative burst peroxidase in *Arabidopsis* is a major component of pattern-triggered immunity // *Plant Cell*. 2012. V. 24, No. 1. – P. 275–287.
83. De Paolis A., Sabatini S., De Pascalis L., Costantino P., Capone I. A *rolB* regulatory factor belongs to a new class of single zinc finger plant proteins // *The Plant Journal*. 1996. V. 10, No. 2. – P. 215–223.
84. Dehio C., Grossmann K., Schell J., Schmülling T. Phenotype and hormonal status of transgenic tobacco plants overexpressing the *rolA* gene of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA // *Plant Molecular Biology*. 1993. V. 23, No. 6. – P. 1199–1210.

85. Demain A.L., Fang A. The natural functions of secondary metabolites // Advances in Biochemical Engineering, Biotechnology. 2000. V. 69. – P. 1–39.
86. Dougherty M.K., Morrison D.K. Unlocking the code of 14–3–3 // Journal of Cell Science. 2004. V. 117, Pt. 10. – P. 1875–1884.
87. Dunand C., De Meyer M., Crèvecoeur M., Penel C. Expression of a peroxidase gene in zucchini in relation with hypocotyl growth // Plant Physiology and Biochemistry. 2003. V. 41, No. 9. – P. 805–811.
88. Egorov A.M., Grigorenko V.G., Andreeva I.P., Rubtsova M.Yu. Recombinant horseradish peroxidase for analytical applications // Biotechnologia Acta. 2013. V. 6, No. 4. – P. 86–92.
89. el-Turk J., Asemota O., Leymarie J., Sallaud C., Mesnage S., Breda C., Buffard D., Kondorosi A., Esnault R. Nucleotide sequences of four pathogen-induced alfalfa peroxidase-encoding cDNAs // Gene. 1996. V. 170. No. 2. – P. 213–216.
90. Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools // Nature Protocols. 2007. V. 2, No. 4. – P. 953–971.
91. Espelie K.E., Franceschi V.R., Kolattukudy P.E. Immunocytochemical localization and time course of appearance of an anionic peroxidase associated with suberization in wound-healing potato tuber tissue // Plant Physiology. 1986. V. 81, No. 2. – P. 487–492.
92. Estruch J.J., Chriqui D., Grossmann K. 1991. The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates // The EMBO Journal. V. 10, No. 10. – P. 2889–2895.
93. Fakhrai H.K. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated gene transfer using PRI 1855 and a binary vector // Methods in Molecular Biology. 1990. V. 6. 289–299.
94. Farag M.A., Huhman D.V., Dixon R.A., Sumner L.W. Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitorspecific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures // Plant Physiology. 2008. V. 146, No. 2. – P. 387–402.

95. Fawal N., Li Q., Savelli B., Brette M., Passaia G., Fabre M., Mathé C., Dunand C. PeroxiBase: a database for large-scale evolutionary analysis of peroxidases // Nucleic Acids Research. 2013. V. 41. – P. D441–D444.
96. Felsenstein J. PHYLIP—Phylogeny Inference Package (Version 3.2). Cladistics. 1989. V. 5. – P. 164–166.
97. Ferrer M.A., Pedreno M.A., Munoz R., Ros Barcelo A. Soluble peroxidase gradients in lupin hypocotyls and the control of the level of polarly transported indole-3yl-acetic acid // Journal of Plant Growth Regulation. 1991. V. 10. – P. 139–146.
98. Feussner I., Wastonack C. The lipoxygenase pathway // Annual Review of Plant Biology. 2002. V. 53. – P. 275–297.
99. Filippini F., Rossi V., Marin O., Trovato M., Costantino P., Downey P.M., Lo Schiavo F., Terzi M. A plant oncogene as a phosphatase // Nature. 1996. V. 379, No. 6565. – P. 499–500.
100. Francoz E., Ranocha P., Nguyen-Kim H., Jamet E., Burlat V., Dunand C. Roles of cell wall peroxidases in plant development // Phytochemistry. 2014. V. 112. – P. 15–21.
101. Fry S.C. Oxidative coupling of tyrosine and ferulic acid residues: Intra- and extra-protoplasmic occurrence, predominance of trimers and larger products, and possible role in inter-polymeric cross-linking // Phytochemistry Reviews. 2004. V. 3. – P. 97–111.
102. Gajhede M., Schuller D.J. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15Å resolution// Nature Structural Biology. 1997. V. 4. – P. 1032–1038.
103. Gao C., Wang Y., Liu G., Wang C., Jiang J., Yang C. Cloning of ten peroxidase (*POD*) genes from *Tamarix hispida* and characterization of their responses to abiotic stress // Plant Molecular Biology Reporter. 2010. V. 28, No. 1. – P. 77–89.
104. Gaspar T.C., Thorpe T., Greppin H. Peroxidases, 1970-1980: a survey of their biochemical and physiological roles in higher plants // Université de Genève, Centre de Botanique. 1982. – P. 889–1112.
105. Gomes E., Aguiar A.P., Carvalho C.C., Bonfa M.R.B., Da Silva R., Boscolo M. Ligninases production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues

and their application in the decolorization of synthetic dyes // Brazilian Journal of Microbiology. 2009. V. 40, No. 1. – P. 31–39.

106. Gorpchenko T.Y., Kiselev K.V., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Bragina E.A., Khodakovskaya M.V., Koren O.G., Batygina T.B., Zhuravlev Y.N. The *Agrobacterium rhizogenes* *rolC*-geneinduced somatic embryogenesis and shoot organogenesis in *Panax ginseng* transformed calluses // Planta. 2006. V. 223, No. 3. – P. 457–467.
107. Gorpchenko T.Y., Aminin D.L., Vereshchagina Y.V., Shkry Y.N., Veremeichik G.N., Tchernoded G.K., Bulgakov V.P. Can plant oncogenes inhibit programmed cell death? The *rolB* oncogene reduces apoptosis-like symptoms in transformed plant cells // Plant Signaling and Behavior. 2012. V.7, No. 9. – P. 1058–1061.
108. Greco O., Folkes L.K., Wardman P., Tozer G.M., Dachs G.U. Development of a novel enzyme/prodrug combination for gene therapy of cancer: horseradish peroxidase/indole-3- acetic acid // Cancer Gene Therapy. 2000. V. 7, No. 11. – P. 1414–1420.
109. Grisebach H. Lignins // The Biochemistry of Plants. 1981. V. 7. – P. 457–478.
110. Guillon S., Tremouillaux-Guiller J., Pati P.K., Rideau M., Gantet P. Harnessing the potential of hairy roots: dawn of a new era // Trends in Biotechnology. 2006. V. 24. No. 9. – P. 403–409.
111. Guindon S., Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood // Systematic Biology. 2003. V. 52, No. 5. – P. 696–704.
112. Guivarc'h A., Spena A., Noin M., Besnard C., Chriqui D. The pleiotropic effects induced by the *rolC* gene in transgenic plants are caused by expression restricted to protophloem and companion cells // Transgenic Research. 1996. V. 5, No. 1. – P. 3–11.
113. Gutiérrez J., López Nuñez-Flores M.J., Gómez Ros L.V., Novo-Uzal E., Esteban Carrasco A., Díaz J., Sotomayor M., Cuello J., Ros Barceló A. Hormonal regulation of the basic peroxidase isoenzyme from *Zinnia elegans* // Planta. 2009. V. 230, No. 4. – P. 767–778.

114. Hailu G., Weersink A., Cahlík F. Examining the Prospects for Commercialization of Soybean Peroxidase // *AgBioForum*. 2010. V. 14, No. 3. – P. 263–273.
115. Hammond-Kosack K.E., Jones J.D.G. Resistance gene-dependent plant defense responses // *Plant Cell*. 1996. V. 8, No. 10. – P. 1773–1791.
116. Heitefuss R. Defense reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew on cereals as an example // *Naturwissenschaften*. 2001. V. 88, No. 7. – P. 273–283.
117. Henriksen A., Welinder K.G., Gajhede M. Structure of barley grain peroxidase refined at 1.9-angstrom resolution. A plant peroxidase reversibly inactivated at neutral pH // *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. V. 273, No. 4. – P. 2241–2248.
118. Herrero J., Esteban Carrasco A., Zapata J.M. *Arabidopsis thaliana* peroxidases involved in lignin biosynthesis: *in silico* promoter analysis and hormonal regulation // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2014. V. 80. – P. 192–202.
119. Hilaire E., Young S.A., Willard L.H., McGee J.D., Sweat T., Chittoor J.M., Guikema J.A., Leach J.E. Vascular defense responses in rice: peroxidase accumulation in xylem parenchyma cells and xylem wall thickening // *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2001. V. 14, No. 12. – P. 1411–1419.
120. Hinnman R.L., Lang J. Peroxidases catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid // *Biochemistry*. 1965. V. 4. – P. 144–158.
121. Hiraga S., Sasaki K., Ito H., Ohashi Y., Matsui H. A large family of class III plant peroxidases // *Plant And Cell Physiology*. 2001. V. 42, No. 5. – P. 462–468.
122. Hutterman A., Mai C., Kharazipour A. Modification of lignin for the production of new compound materials // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001. V. 55, No. 4. – P. 387–394.
123. Jacobo-Velázquez D.A., González-Agüero M., Cisneros-Zevallos L. Cross-talk between signaling pathways: the link between plant secondary metabolite production and wounding stress response // *Scientific Reports*. 2015. doi: 10.1038/srep08608.
124. Jackson P.A.P., Galinha C.I.R., Pereira C.S., Fortunato A., Soares N.C., Amângio C.B.Q., Pinto Ricardo C.P. Rapid deposition of extensin during the elicitation of

- grapevine callus cultures specifically catalysed by a 40-kilodalton peroxidase // Plant Physiology. 2001. V. 127, No. 3. – P. 1065–1076.
125. Jia J., Wong B., Wu A., Cheng G., Li Z., Dong S. A method to construct a third-generation horseradish peroxidase biosensor: self-assembling gold nanoparticles to three-dimensional sol-gel network // Analytical Chemistry. 2002. V. 74, No. 9. – P. 2217–2223.
126. Joo J.H., Bae Y.S., Lee J.S. Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism // Plant Physiology. 2001. V. 126, No. 3. – P. 1055–1060.
127. Kang J.G., Pyo Y.J., Cho J.W., Cho M.H. Comparative proteome analysis of differentially expressed proteins induced by K⁺ deficiency in *Arabidopsis thaliana* // Proteomics. 2004. V. 4, No. 11. – P. 3549–3559.
128. Kato N., Esaka M. Changes in ascorbate oxidase gene expression and ascorbate levels in cell division and cell elongation in tobacco cells // Physiologia Plantarum. 1999. V. 105, No. 2. – P. 321–329.
129. Kawamura O., Sato S., Kajii H., Nagayama S., Ohtani K., Chiba J., Ueno Y. A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin-A based on monoclonal antibodies // Toxicon. 1989. V. 27, No. 8. – P. 887–897.
130. Kawano T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. // Plant Cell Reports. 2003. V. 21, No. 9. P. 829–837.
131. Kawatsu K., Hamano Y., Sugiyama A., Hashizume K., Noguchi T. Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins // Journal of Food Protection. 2002. V. 65, No. 8. – P. 1304–1308.
132. Keren-Keiserman A., Tanami Z., Shoseyov O., Ginzberg I. Peroxidase activity associated with suberization processes of the muskmelon (*Cucumis melo*) rind // Physiologia Plantarum. 2004. V. 121, No. 1. – P. 141–148.
133. Kerk N.M., Lewis K.J., Feldman J. Auxin metabolism in the root apical meristem // Plant Physiology. 2000. V. 122, No. 3. – P. 925–932.

134. Kim Y.H., Kim C.Y., Song W.K., Park D.S., Kwon S.Y., Lee H.S., Bang J.W., Kwak S.S. Overexpression of sweetpotato *swpa4* peroxidase results in increased hydrogen peroxide production and enhances stress tolerance in tobacco // *Planta*. 2008. V. 227, No. 4. – P. 867–881.
135. Kim D., Kocz R., Boone L., Keyes W.J., Lynn D.G. On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development // *Chemistry and Biology*. 1998. V. 5, No. 2. – P. 103–117.
136. Kimura S., Kaya H., Kawarazaki T., Hiraoka G., Sen-zaki E., Michikawa M., Kuchitsu K. Protein phosphorylation is a prerequisite for the Ca^{2+} -dependent activation of Arabidopsis NADPH oxidases and may function as a trigger for the positive feedback regulation of Ca^{2+} and reactive oxygen species // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2012. V. 1823, No. 2. – P. 398–405.
137. Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. The *rolB* gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells // *Journal of Biotechnology*. 2007. V. 128, No. 3. – P. 681–692.
138. Kiselev K.V., Gorpenchenko T.Y., Tchernoded G.K., Dubrovina A.S., Grishchenko O.V., Bulgakov V.P. Calcium-dependent mechanism of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* cell cultures expressing the *rolC* oncogene // *Journal of Molecular Biology*. 2008. V. 42, No. 2. – P. 243–252.
139. Kobayashi M., Ohura I., Kawakita K., Yokota N., Fujiwara M., Shimamoto K. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase // *Plant Cell*. 2007. V. 19, No. 3. – P. 1065–1080.
140. Kochba J., Lavee S., Spiegel-Roy P. Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and nonembryogenic “Shamouti” orange ovular callus lines // *Plant Cell Physiology*. 1977. V. 18, No. 1. – P. 463–467.
141. Kolattukudy P.E. Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin // *Science*. 1980. V. 208, No. 4447. – P. 990–1000.
142. Köller G., Möeder M., Czihal K. Peroxidative degradation of selected PCB: A mechanistic study // *Chemosphere*. 2000. V. 41, No. 12. – P. 1827–1834.

143. Kucinskaite A., Briedis V., Savickas A. Experimental analysis of therapeutic properties of *Rhodiola rosea* L. and its possible application in medicine // Medicina (Kaunas). 2004. V. 40, No. 7. – P. 614–619.
144. Kumada Y., Maehara M., Tomioka K., Katoh S. Liposome immunoblotting assay using a substrate-forming precipitate inside immunoliposomes // Biotechnology and Bioengineering. 2002. V. 80, No. 4. – P. 414–418.
145. Kumari G.J., Reddy A.M., Naik S.T., Kumar S.G., Prasanthi J., Sriranganayakulu G., Reddy P.C., Sudhakar C. Jasmonic acid induced changes in proteinpattern, antioxidative enzyme activities and peroxidase isoenzymes in peanutseedlings // Biologia Plantarum. 2006. V. 50, No. 2. – P. 219–226.
146. Kumari M, Taylor GJ, Deyholos MK. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana* // Molecular Genetics and Genomics. 2008. V. 279, No. 4. – P. 339–357
147. Kunshi M., Shimomura K., Takida M., Kitanaka S. Growth and ginsenoside production of adventitious and hairy root cultures in an interspecific hybrid ginseng (*Panax ginseng* × *P. quinquefolium*) // Nature Medicine. 1998. V. 52. – P. 1–4.
148. Kuroda N., Murasaki N., Wada M., Nakashima K. Application of an enhanced luminal chemiluminescence reaction using 4-[4,5-di(2-pyridyl)-1H-imidazol-2-yl]phenylboronic acid to photographic detection of horseradish peroxidase on a membrane // Luminescence. 2001. V. 16, No. 2. – P. 167–172.
149. Kvaratskhelia M., Winkel C., Thorneley R.N.F. Purification and characterization of a novel class III peroxidase isoenzyme from tea leaves // Plant Physiology. 1997. V. 114, No. 4. –P. 1237–1245.
150. Lagrimirii L.M., Burkhart W., Moyer M., Rothstein S. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-fonning peroxidase from tobacco: molecular analysis and tissue specific expression // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1987. V. 84, No. 21. – P. 7542–7546.
151. Lagrimini M.L., Vaughn J., Finer J., Klotz K., Rubaihayo P. Expression of a chimeric tobacco peroxidase gene in transgenic tomato plants // Plant Cell. 1992. V. 117, No. 6. – P. 1012–1016.

152. Lamb C.J., Lawton M.A., Dron M., Dixon R.A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defense against microbial attack // *Cell*. 1989. V. 56, No. 2. – P. 215–224.
153. Lan X., Quan H. Hairy root culture of *Przewalskia tangutica* for enhanced production of pharmaceutical tropane alkaloids // *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010. V. 4, No. 14. – P. 1477–1481.
154. Lavery C.B., Macinnis M.C., Macdonald M.J. Purification of peroxidase from horseradish (*Armoracia rusticana*) roots // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010. V. 58, No. 15. – P. 8471–8476.
155. Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response // *Cell*. 1994. V. 79, No. 4. – P. 583–593.
156. Li W., Li M.F., Yang D.L., Xu R., Zhang R. Production of podophyllotoxin by root culture of *Podophyllum hexandrum* Royle // *Electronic Journal of Biology*. 2009. V. 5, No. 2. – P. 34–39.
157. Li J.L.Y., Sulaiman M., Beckett R.P., Minibayeva F.V. Cell wall peroxidases in the liverwort *Dumontiera hirsuta* are responsible for extracellular superoxide production, and can display tyrosinase activity // *Physiologia Plantarum*. 2010. V. 138, No. 4. – P. 474–484.
158. Lin A., Wang Y., Tang J., Xue P., Li C., Liu L., Hu B., Yang F., Loake G.J., Chu C. Nitric oxide and protein S-nitrosylation are integral to hydrogen peroxide-induced leaf cell death in rice // *Plant Physiology*. 2012. V. 158, No. 1. – P. 451–464.
159. Lindbladh C., Mosbach K., Bulow L. Use of genetically prepared enzyme conjugates in enzyme immunoassay // *Trends in Biochemical Sciences*. 1993. V. 18, No. 8. – P. 279–283.
160. Lindgren A., Ruzgas T., Gorton L., Csoregi E., Bautista Ardila G., Sakharov I.Y., Gazaryan I.G. Biosensors based on novel peroxidases with improved properties in direct and mediated electron transfer // *Biosensors and Bioelectronics*. 2000. V. 8, No. 9-10. – P. 491–497.

161. Lisitsyna T.A., Durnev A.D. The effect of bemetil on the production of DNA antibodies in patients with systemic lupus erythematosus // Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija. 1999. V. 62, No. 5. P. 38–41.
162. Little D., Gouhier-Darimont C., Bruessow F., Reymond P. Oviposition by pierid butterflies triggers defense responses in *Arabidopsis* // Plant Physiology. 2007. V. 143, No. 2. – P. 784–800.
163. Liu G, Sheng X, Greenshields DL, Ogieglo A, Kaminskyj S, Selvaraj G, Wei Y. Profiling of wheat class III peroxidase genes derived from powdery mildew-attacked epidermis reveals distinct sequence-associated expression patterns // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2005. V. 18, No. 7. – P. 730–741.
164. Llorente F., Lopez-Cobollo R.M., Catala R., Martinez-Zapater J.M., Salinas J. A novel cold-inducible gene from *Arabidopsis*, *RCI3*, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance // The Plant Journal. 2002. V. 32, No. 1. – P. 13–24.
165. Lombardi L., Ceccarelli N., Picciarelli P. Nitric oxide and hydrogen peroxide involvement during programmed cell death of *Sechium edule* nucellus // Physiologia Plantarum. 2010. V. 140, No. 1. – P. 89–102.
166. Maleck K., Dietrich R.A. Defense on multiple fronts: how do plants cope with diverse enemies? // Trends in Plant Science. 1999. V. 4, No. 6. – P. 215–219.
167. Malik V., Pundir C. Determination of total cholesterol in serum by cholesterol esterase and cholesterol oxidase immobilized and co-immobilized on to arylamine glass // Biotechnology and Applied Biochemistry. 2002. V. 35, No. 3. – P. 191–197.
168. Martinez C., Baccou J.C., Bresson E., Baissac Y., Daniel J.F., Jalloul A., Montillet J.L., Geiger J.P., Assigbetsé K., Nicole M. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum* // Plant Physiology. 2000. V. 122, No. 3. – P. 757–766.
169. Matz M., Shagin D., Bogdanova O., Lukyanov S., Diatchenko L, Chenchik A. Amplification of cDNA ends based on template-switching effect and step-out PCR // Nucleic Acids Research. 1999. V. 27, No. 6. – P. 1558–1560.

170. Maurel S., Barbier-Bryqoo H., Spena A., Tempe G., Guern G. Single *rol* genes from the *Agrobacterium rhizogenes* T(L)-DNA alter some of the cellular responses to auxin in *Nicotiana tabacum* // Plant Physiology. 1991. V. 97, No. 1. – P. 212–216.
171. Mauro M.L., Trovato M., Paolis A.D., Gallelli A., Costantino P., Altamura M.M. The plant oncogene *rolD* stimulates flowering in transgenic tobacco plants // Developmental Biology. 1996. V. 180, No. 2. – P. 693–700.
172. McInnis S.M., Costa L.M., Gutiérrez-Marcos J.F., Henderson C.A., Hiscock S.J. Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class III peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae) // Plant molecular biology. 2005. V. 57, No. 5. – P. 659–677.
173. Mensen R., Hager A., Salzer P. Elicitor-induced changes of wall-bound and secreted peroxidase activities in suspensioncultured spruce (*Picea abies*) cells are attenuated by auxins // Physiologia Plantarum. 1998. V. 102, No. 4. – P. 539–546.
174. Mera N., Aoyagi H., DiCosmo F., Tanaka H. Production of cell wall accumulative enzymes using immobilized protoplasts of *Catharanthus roseus* in agarose gel // Biotechnol Letters. 2003. V. 25, No. 20. – P. 1687–1693.
175. Michel F.C.Jr., Dass B.S., Grulke E.A., Reddy A.C. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in decolorization of kraft bleach plant effluent // Applied and Environmental Microbiology. 1991. V. 57, nN. 8. – P. 2368–2375.
176. Mika A., Minibayeva F., Beckett R., Lüthje S. Possible functions of extracellular peroxidases in stress-induced generation and detoxification of active oxygenspecies // Phytochemistry Reviews. 2004. V. 3, No. 1–2. – P. 173–193.
177. Mika A., Boenisch M.J., Hopff D., Luthje S. Membrane-bound guaiacolperoxidases from maize (*Zea mays* L.) roots are regulated by methyl jasmonate, salicylic acid, and pathogen elicitors // Journal of Experimental Botany. 2010. V. 61, No. 3. – P. 831–841.
178. Miranda M.V., Fernandez-Lahore H.M., Dobrecky J., Cascone O. The extractive purification of peroxidase from plant raw materials in aqueous two-phase systems // Acta Biotechnologica. 1998. V. 18, No. 3. – P. 179–188.

179. Mishra BN, Ranjan R. Growth of hairy-root cultures in various bioreactors for the production of secondary metabolites // Biotechnology and applied biochemistry. 2008. V. 49, No. 1. – P. 1–10.
180. Mohr P.G., Cahill D.M. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* // Functional and Integrative Genomics. 2007. V. 7, No. 3. – P. 181–191.
181. Morawski B., Lin Z.L., Cirino P.C., Joo H., Bandara G., Arnold F.H. Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris* // Protein Eng. 2000. V. 13, No. 5. – P. 377–384.
182. Moreira M.T., Feijoo G., Canaval J., Lema J.M. Semipilot-scale bleaching of Kraft pulp with manganese peroxide // Wood Sci Technol. 2003. V. 37, No. 2. – P. 117–123.
183. Moreno O.A., Vazquez-Duhalt R., Ochoa J.L. Peroxidase activity in calluses and cell suspension cultures of radish *Raphanus sativus* var. Cherry Bell // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 1989. V. 18, No. 3. – P. 321–327.
184. Moriuchi H., Okamoto C., Nishihama R. Nuclear localization and interaction of RolB with plant 14-3-3 proteins correlates with induction of adventitious roots by the oncogene *rolB* // The Plant Journal. 2004. V. 38. – P. 260–275.
185. Morohashi Y. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion // Journal of Experimental Botany. 2002. V. 53, N. 374. – P. 1643–1650.
186. Moura J.C.M.S., Bonine C.A.V., Viana J.O.F., Dornelas M.C., P Mazzafera. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants // J Integr Plant Biol. 2010. V. 52, No. 4. – P. 360–376.
187. Munteanu, F.-D., Lindgren A., Emne'us J., Gorton L., Ruzgas T., Csöregi E., Ciucu A., van Huystee R.B., Gazaryan I.G., Lagrimini L.M. Bioelectrochemical monitoring of phenols and aromatic amines in flow injection using novel plant peroxidases // Analytical Chemistry. 1998. V. 70, No. 13. – P. 2596–2600.

188. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures // *Physiologia plantarum*. 1962. Vol. 15, No. 3. – P. 473–497.
189. Nagano, S., Tanaka, M., Watanabe, Y. and Morishima, I. Putative hydrogen bond network in the heme distal site of horseradish peroxidase // *Biochem Biophys Res Commun*. 1995. V. 207, No. 1. – P. 417–423.
190. Nakai K., Horton P. PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization // *Trends in Biochemical Sciences*. 1999. V. 24, No. 1. – P. 34–36.
191. Nemoto K., Hara M., Suzuki M., Seki H., Oka A., Muranaka T., Mano Y. Function of the *aux* and *rol* genes of the Ri plasmid in plant cell division *in vitro* // *Plant Signaling and Behavior*. 2009. V. 4, No. 12. – P. 1145–1147.
192. Nielsen K.L, Indiani C., Henriksen A., Feis A., Becucci M., Gajhede M., Smulevich G., Welinder K.G. Differential activity and structure of highly similar peroxidases. Spectroscopic, crystallographic and enzymatic analyses of lignifying *Arabidopsis thaliana* peroxidase A2 and horseradish peroxidase A2 // *Biochemica* 2001. V. 40, No. 37. – P. 11013–11021.
193. Ngo T.T. Peroxidase in chemical and biochemical analysis // *Analytical Letters*. 2010. V. 43, No. 10-11. – P. 1572–1587.
194. Nilsson O., Little C.H.A., Sandberg G., Olsson O. Expression of two heterologous promoters, *Agrobacterium rhizogenes* *rolC* and cauliflower mosaic virus 35S, in the stem of transgenic hybrid aspen plants during the annual cycle of growth and dormancy // *Plant Molecular Biology*. 1996. V. 31, No. 4. – P. 887–895.
195. Nilsson O., Olsson O. Getting to the root: The role of the *Agrobacterium rhizogenes* *rol* genes in the formation of hairy roots // *Physiologia plantarum*. 1997. V. 100, No. 3. – P. 463–473.
196. O'Brien J.A., Daudi A., Finch P., Butt V.S., Whitelegge J.P., Souda P., Ausubel F.M., Bolwell G.P. A peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in cultured arabidopsis cells functions in MAMP-elicited defence // *Plant Physiology*. 2012. V. 158, No. 4. – P. 2013–2027.

197. Ohtsubo Y., Kudo T., Tsuda M., Nagata Y. Strategies for bioremediation of polychlorinated biphenyls // Applied Microbiology and Biotechnology. 2004. V. 65, No. 3. – P. 250–258.
198. Okazaki Y., Ishizuka A., Ishihara A., Nishioka T., Iwamura H. New dimeric compounds of avenanthramide phytoalexin in oats // The Journal of Organic Chemistry. 2007. V. 72, No. 10. – P. 3830–3839.
199. Otte O., Barz W. The elicitor-induced oxidative burst in cultured chickpea cells drives therapid insolubilization of two cell wall structural proteins // Planta. 1996. V. 200, No. 2. – P. 238–246.
200. Page R.D. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers // Computer Applications in the Biosciences. 1996. V. 12, No. 4. – P. 357–358.
201. Palazón J., Cusidó R.M., Roig C., Piñol M.T. Expression of the *rolC* gene and nicotine production in transgenic roots and their regenerated plants // Plant Cell Reports. 1998. V. 17, No. 5. – P. 384–390.
202. Park S.Y., Ryu S.H., Kwon S.Y., Lee H.S., Kim J.G., Kwak S.S. Differential expression of six novel peroxidase cDNAs from cell cultures of sweet potato in response to stress // Molecular Genetics and Genomics. 2003. V. 269, No. 4. – P. 542–552.
203. Passardi F., Penel C., Dunand C. Performing paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall // Trends in Plant Science. 2004. V. 9, No. 11. – P. 534–540.
204. Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife // Plant Cell Reports. 2005. V. 24, No. 5. – P. 255–265.
205. Passardi F., Tognolli M., De Meyer M., Penel C., Dunand C. Two cell wall associated peroxidases from *Arabidopsis* influence root elongation // Planta. 2006. V. 223, No. 5. – P. 965–974.
206. Passardi F., Zamocky M., Favet J. Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are these patches of order in chaos? // Gene. 2007. V. 397, No. 1-2. – P. 101–113.

207. Pedreira J., Herrera M.T., Zarra I., Revilla G. The overexpression of *AtPrx37*, an apoplastic peroxidase, reduces growth in *Arabidopsis* // *Physiologia Plantarum*. 2011. V. 141, No. 2. – P.177–187.
208. Peng M., Kud J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal activity *in vitro* and on tobacco leaf disks // *Phytopathology*. 1992. V. 82, No. 6. – P. 696–699.
209. Prochaska J.F., Keeton J.T., Tizard I.R., Miller D.R. System for polymerizing collagen and collagen composites *in situ* for a tissue compatible wound sealant, delivery vehicle, binding agent and/or chemically modifiable matrix // US Pat. No. 6509031. 2003.
210. Raitman O.A., Katz E., Buckmann A.F., Willner I. Integration of polyaniline/poly(acryl acid) films and redox enzymes on electrode supports: an *in situ* electrochemical/surface plasmon resonance study of the bioelectrocatalyzed oxidation of glucose or lactate in the integrated bioelectrocatalytic systems // *Journal of the American Chemical Society*. 2001. V. 124, No. 22. – P. 6487–6496.
211. Ranieri A., Castagna A., Pacini J., Baldan B., Mensuali Sodi A., Soldatini G.F. Early production and scavenging of hydrogen peroxide in the apoplast of sunflower plants exposed to ozone // *Journal of Experimental Botany*. 2003. V. 54, No. 392. – P. 2529–2540.
212. Regalado C., Garcia-Almendarez B.E., Duarte-Vazquez M.A. Biotechnological applications of peroxidases // *Phytochemistry Reviews*. 2004. V. 3, No. 1. – P. 243–256.
213. Richards K.D., Schott E.J., Sharma Y.K., Davis K.R., Gardner R.C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana* // *Plant Physiology*. 1998. V. 116, No. 1. – P. 409–418.
214. Ricker A. J. Studies on infectious hairy roots of nursery apple trees // *Agricultural Research*. 1930. V. 41, No. 7. – P. 438–446.
215. Rigden D.J., Carneiro M. A structural model for the *rolA* protein and its interaction with DNA // *Proteins*. 1999. V. 37, No. 4. – P. 697-708.

216. Repka V., Fischerová I., Silhárová K. Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures // *Biologia Plantarum*. 2004. V. 48, No. 2. – P. 273–283.
217. Roach T., Beckett R.P., Minibayeva F.V., Colville L., Whitaker C., Chen H., Bailly C., Kranner I. Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant *Castanea sativa* seeds // *Plant, Cell and Environment*. 2010. V. 33, No. 1. – P. 59–75.
218. Robles-Hernandez L., Gonzales-Franco A.C., Crawford D.L., Chun W.W.C. Review of environmental organopollutants degradation by white-rot basidiomycete mushrooms // *Tecnociencia Chihuahua*. 2008. V. 2, No. 1. – P. 32–39.
219. Roda A., Simoni P., Mirasoli M., Baraldini M., Violante F.S. Development of a chemiluminescent enzyme immunoassay for urinary 1-hydroxypyrene // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2002. V. 372, No. 7-8. – P. 751–758.
220. Romano C.P., Hein M.B., Klee H.J. Inactivation of auxin in tobacco transformed with the indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas savastoni* // *Genes and Development*. 1991. V. 5, No. 3. – P. 438–446.
221. Ros Barcelo A., Munoz R. Peroxidases: their role in the control of plant cell growth // *Plant Peroxidases 1980–1990: Progress and prospects in biochemistry and physiology*, University of Geneve, Geneve, Switzerland. 1992. – P. 71–89.
222. Ros Barcelo' A., Pomar F. Plant peroxidases: versatile catalysts in the synthesis of bioactive natural products // *Studies in natural products chemistry*, The Netherlands: Elsevier. 2002. V. 27. – P. 735–791.
223. Rouet M.A., Mathieu Y., Lauriere C. Characterization of active oxygen-producing proteins in response to hypo-osmolarity in tobacco and *Arabidopsis* cell suspensions: identification of a cell wall peroxidase // *Journal of Experimental Botany*. 2006. V. 57, No. 6. – P. 1323–1332.
224. Ruzgas T., Emneus J., Gorton L., Marko-Varga G. The development of a peroxidase biosensor for monitoring phenol and related aromatic compounds // *Analytica Chimica Acta*. 1995. V. 311, No. 3. – P. 245–253.

225. Ryan B.J., Carolan N., O'Fagain C. Horseradish and soybean peroxidases: Comparable tools for alternative niches? // Trends in Biotechnology. 2006. V. 24, No. 8. – P. 355–363.
226. Sakharov I.Y., Vorobiev A.C., Castillo Leon J.J. Synthesis of polyelectrolyte complexes of polyaniline and sulfonated polystyrene by palm tree peroxidase // Enzyme and Microbial Technology. 2003. V. 33, No. 5. – P. 661–667.
227. Sato S., Mizuno Y., Hattori N. Urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels as a biomarker for progression of Parkinson disease // Journal of Neurology. 2005. V. 64, No. 6. – P. 1081–1083.
228. Savio L.E.B., Astarita L.V., Santarem E.R. Secondary metabolism in micropropagated *Hypericum perforatum* L. grown in non-aerated liquid medium // Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2012. V. 108, No. 3. – P. 465–472.
229. Schmülling T., Schell J., Spena A. Single genes from *Agrobacterium rhizogenes* influence plant development // EMBO Journal. 1988. V. 7, No. 9. – P. 2621–2629.
230. Schmülling T., Fladung M., Grossmann K., Schell J. Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA // The Plant Journal. 1993. V. 3, No. 3. – P. 371–382.
231. Schopfer P. Histochemical demonstration and localization of H₂O₂ in organs of higher plants by tissue printing on nitrocellulose paper // Plant Physiology. 1994. V. 104, No. 4. – P. 1269–1275.
232. Schügerl K., Hitzmann B., Jurgens H., Kullick T., Ulber R., Weigal B. Challenges in integrating biosensors and FIA for on-line monitoring and control // Trends in Biotechnology. 1996; V. 14, No. 1. – P. 21–31.
233. Schuller D.J., Ban N., van Huystee R., McPherson A., Poulos T.L. The crystal structure of peanut peroxidase // Structure. 1996. V. 4. – P. 311–321.
234. Schweikert C., Liszkay A., Schopfer P. Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxy radicals // Phytochemistry. 2000. V. 53, No. 5. – P. 562–570.

235. Shin K.S. The role of enzymes produced by white-rot fungus *Irpex lacteus* in the decolorization of the textile industry effluent // Journal of Microbiology. 2004. V. 42, No. 1. – P. 37–41.
236. Shin S., Kim Y. Production of anthraquinone derivatives by hairy roots of *Rubia cordifolia* var. pratensis // Saengyak Hakhoechi. 1996. V. 27, No. 4. – P. 301–308.
237. Shinde A.N., Malpathak N., Fulzele P.D. Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding // Biotechnology and Bioprocess Engineering. 2009. V. 14, No. 3. – P. 288–294.
238. Shkryl Y.N., Veremeichik G.N., Bulgakov V.P., Tchernoded G.K., Mischenko N.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N. Individual and combined effects of the *rolA*, *B* and *C* genes on anthraquinone production in *Rubia cordifolia* transformed calli // Biotechnology and Bioengineering. 2008. V. 100, No. 1. – P. 118–125.
239. Sinkar V.P., Pythoud F., White F.F., Nester E.W., Gordon M.P. *rolA* locus of the Ri plasmid directs developmental abnormalities in transgenic tobacco plants // Genes & Development. 1988. V. 2 No. 6. – P. 688–697.
240. Slightom J.L., Durand-Tardif M., Jouanin L., Tepfer D. Nucleotide sequence analysis of T_L-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* agropine type plasmid. Identification of open reading frames // The Journal of Biological Chemistry. 1986. V. 261, No. 1. – P. 108–121.
241. Smith E.F., Townsend C.O. A plant-tumor of bacterial origin // Science. 1907. V. 25, No. 643. – P. 671–673.
242. Smith A.T., Santama N., Dacey S. Expression of a synthetic gene for horseradish peroxidase-C in *Escherichia coli* and folding and activation of the recombinant enzyme with Ca²⁺ and heme // The Journal of Biological Chemistry. 1990. V. 265, No. 22. – P. 13335–13343.
243. Somssich I. E Schmelzer E., Bollmann J., Hahlbrock K. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding pathogenesis-related proteins in cultured parsley cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986. V. 83, No. 8. – P. 2427–2430.

244. Sotomayor M., López-Serrano M., DiCosmog F., Ros Barceló A. Purification and characterization of α -3',4'-anhydrovinblastine synthase (peroxidase-like) from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don // FEBS Letters. 1998. V. 428, No. 3. – P. 299–303.
245. Spadiut O., Rossetti L., Dietzsch C., Herwig C. Purification of a recombinant plant peroxidase produced in *Pichia pastoris* by a simple 2-step strategy // Protein Expression and Purification. 2012. V. 86, No. 2. – P. 89–97.
246. Spena A., Schmulling T., Koncz C., Schell J. Independent and synergistic activity of *rolA*, *B* and *C* loci in stimulating abnormal growth in plants // EMBO Journal. 1987. V. 6, No 13. – P. 3891–3899.
247. Stintzi A., Heitz T., Prasad V., Wiedemann-Merdinoglu S., Kauffmann S., Geoffroy P., Legrand M., Fritig B. Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens // Biochimie. 1993. V. 75, No. 8. – P. 687–706.
248. Strickland E.H., Kay E., Shannon L.M., Horwitz J. Peroxidase isoenzymes from horseradish roots. 3. Circular dichroism of isoenzymes and apoisoenzymes // The Journal of Biological Chemistry. 1968. V. 243, No. 13. – P. 3560–3565.
249. Sudisha J., Sharathchandra R.G., Amruthesh K.N., Kumar A., Shekar H. Pathogenesis-related proteins in plant defense response // Plant Defence: Biological Control. 2012. V. 12. – P. 379—403.
250. Sugaya S., Uchimiya H. Deletion analysis of the 5'-upstream region of the *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid *rolC* gene required for tissue-specific expression // Plant Physiology. 1992. V. 99, No. 2. – P. 464–467.
251. Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. Calmodulin-dependent activation of MAP kinase for ROS homeostasis in *Arabidopsis* // Molecular Cell. 2011. V. 41, No. 6. – P. 649–660.
252. Tams J.W., Welinder K.G. Mild chemical deglycosylation of horseradish-peroxidase yields a fully active, homogeneous enzyme // Analytical Biochemistry. 1995. V. 228, No. 1. – P. 48–55.
253. Tanaka M., Nagano S., Ishimori K., Morishima I. Hydrogen bond network in the distal site of peroxidases: spectroscopic properties of Asn70 →Asp horseradish peroxidase mutant // Biochemistry. 1997. V. 36, No. 32. – P. 9791–9798.

254. Tatsumi K., Wada S., Ichikawa H. Removal of chlorophenols from wastewater by immobilized horseradish peroxidase // Biotechnology and Bioengineering. 1996. V. 51, No. 1. – P. 126–130.
255. Tinland B. The integration of T-DNA into plant genomes // Trends in Plant Science. 1996. V. 1, No. 6. P. 178–184.
256. Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D.G. *Arabidopsis* gp91phox homologues *AtrobohD* and *AtrobohF* are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response // The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2002. V. 99, No. 1. – P. 517–522.
257. Trovato M., Mauro M.L., Costantino P., Altamura M.M. The *rolD* gene from *Agrobacterium rhizogenes* is developmentally regulated in transgenic tobacco // Protoplasma. 1997. V. 197, No. 1-2. – P. 111–120.
258. Trovato M., Linhares F. Recent advances on rol genes research: a tool to study plant differentiation // Current Topics in Plant Biology. 1999. V. 1. – P. 51–62.
259. Trovato M., Maras B., Linhares F., Costantino P. The plant oncogene *rolD* encodes a functional ornithine cyclodeaminase // The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001. V. 98, No. 23. – P. 13449–13453.
260. Tung C.W., Dwyer K.G., Nasrallah M.E., Nasrallah J.B. Genomewide identification of genes expressed in *Arabidopsis* pistils specifically along the path of pollen tube growth // Plant Physiology. 2005. V. 138, No. 2. – P. 977–989.
261. van Altvorst A.C. Van Koehorst H.J.J., Bruinsma T., Jansen J., Custers J., De Jong J., Dons J.J.M. Adventitious shoot formation from *in vitro* leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) // Scientia Horticulturae. 1992. V. 51. – P. 223–235.
262. Vanacker H., Carver T.L., Foyer C.H. Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley-powdery mildew interaction // Plant Physiology. 2000. V. 123, No. 4. – P. 1289–1300.
263. Venis M.A., Napier R.M., Barbier-Brygoo H., Maurel C., Perrot-Rechenmann C., Guern J. Antibodies to a peptide from the maize auxin-binding protein have auxin

- agonist activity // The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1992. V. 89, No. 15. – P. 7208–7212.
264. Vieira Dos Santos C., Delavault P., Letousey P., Thalouarn P. Identification by suppression subtractive hybridization and expression analysis of *Arabidopsis thaliana* putative defense genes during *Orobanche ramosa* infection // Physiological and Molecular Plant Pathology. 2003. V. 62, No. 5. – P. 297–303.
265. Vilaine F., Rembur J., Chriqui D., Tepfer M. Modified development in transgenic tobacco plants expressing a *rolA*::GUS translational fusion and subcellular localization of the fusion protein // Molecular Plant-Microbe Interactions. 1998. V. 11. – P. 855–859.
266. Wally O., Punja Z. Enhanced disease resistance in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) plants over-expressing a rice cationic peroxidase // Planta. 2010. V. 232, No. 5. – P. 1229–1239.
267. Wang C.J., Chan Y.L., Shien C.H., Yeh K.W. Molecular characterization of fruit-specific class III peroxidase genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) // J Plant Physiology. 2015. V. 177. – P. 83–92.
268. Wang L., Burhenne K., Kristensen B.K., Rasmussen S.K. Purification and cloning of a Chinese red radish peroxidase that metabolise pelargonidin and forms a gene family in *Brassicaceae* // Gene. 2004. V. 343, No. 2. – P. 323–335.
269. Wang Y., Lin J.S., Wang G.X. Calcium-mediated mitochondrial permeability transition involved in hydrogen peroxide-induced apoptosis in tobacco protoplasts // Journal of Integrative Plant Biology. 2006. V. 48, No. 4. – P. 433–439.
270. Wang J.E., Liu K.K., Li D.W., Zhang Y.L., Zhao Q., He Y.M., Gong, Z.H., A novel peroxidase *CanPOD* gene of pepper is involved in defense responses to *Phytophtora capsici* infection as well as abiotic stress tolerance // International Journal of Molecular Sciences. 2013. V. 14, No. 2. –P. 3158–3177.
271. Weber M., Trampczynska A., Clemens S. Comparative transcriptome analysis of toxic metal responses in *Arabidopsis thaliana* and the Cd²⁺-hypertolerant facultative metallophyte *Arabidopsis halleri* // Plant, Cell and Environment. 2006. V. 29, No. 5. – P. 950–963.

272. Welinder K.G. Plant peroxidases. Their primary, secondary and tertiary structures, and relation to cytochrome c peroxidase // European Journal of Biochemistry. 1985. V. 151, No. 3. – P. 497–504
273. Welinder K.G., Justesen A.F., Kjaersgaard I.V., Jensen R.B., Rasmussen S.K., Jespersen H.M., Duroux L. Structural diversity and transcription of class III peroxidases from *Arabidopsis thaliana* // European Journal of Biochemistry. 2002. V. 269, No. 24. – P. 6063–6081.
274. Wen X., Jia Y., Li J. Degradation of tetracycline and oxytetracycline by crude lignin peroxidase prepared from *Phanerochaete chrysosporium*-a white rot fungus // Chemosphere. 2009. V. 75, No. 8. – P. 1003–1007.
275. White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* // Journal of Bacteriology. 1985. V. 164, No. 1. – P. 33–44.
276. White P. The cultivation of animal and plant cells // New York: Ronald Press. 1963. – 239 P.
277. Woodward A.W., Bartel B. Auxin: regulation, action, and interaction // Annals of Botany. 2005. V. 95, No. 5. – P. 707–735.
278. Xing T., Wang X.J., Malik K., Miki B.L. Ectopic expression of an *Arabidopsis* calmodulin-like domain protein kinase-enhanced NADPH oxidase activity and oxidative burst in tomato protoplasts // Molecular Plant-Microbe Interactions. 2001, V. 14, No. 10. – P. 1261–1264.
279. Xu J.F., Sun Y., Su Z.G. Enhanced peroxidase production by suspension culture of carrot compact callus aggregates // Journal of Biotechnology. 1998. V. 65, No. 2–3. – P. 203–208.
280. Yamazaki I., Piette L. Mechanism of free radical formation and disappearance during the ascorbic acid oxidase and peroxidase reactions // Biochimica et Biophysica Acta. 1961. V. 50, No. 1. – P. 62–69.
281. Yavo B., Brunetti I.L., da Fonseca L.M., Catalani L.H., Campa A. Selective activity of butyrylcholinesterase in serum by a chemiluminescent assay // Luminescence. 2001. V. 16, No. 5. – P. 299–304.

282. Yokoyama R., Hirose T., Fujii N., Aspuria E.T., Kato A., Uchimiya H. The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants // Molecular Genetics and Genomics. 1994. V. 244, No. 1. – P. 15–22.
283. Yonetani T., Yamamoto H., Erman J.E., Leigh J.S.Jr., Reed G.H. Electromagnetic properties of hemoproteins // The Journal of Biological Chemistry. 1972. Vol. 247, No. 8. – P. 2447–2455.
284. Yi S.Y., Hwang B.K. Molecular cloning and characterization of a new basic peroxidase cDNA from soybean hypocotyls infected with *Phytophthora sojae* f.sp. glycines // Molecular Cell. 1998. V. 8, No. 5. – P. 556–564.
285. Zakharova G.S., Uporov I.V., Tishkov V.I. Horseradish peroxidase: modulation of properties by chemical modification of protein and heme // Biochemistry (Mosc). 2011. V. 76, No. 13. – P. 1391–1401.
286. Zalai D., Dietzsch C., Herwig C., Spadiut O. A dynamic fed batch strategy for a *Pichia pastoris* mixed feed system to increase process understanding // Biotechnology Progress. 2012. V. 28, No. 3. – P. 878–886.
287. Zhuang H., Cui Y., Zhu W., Zhu Y., Xu G. Development of a diagnostic kit of enzyme linked immunoassay for detecting serum anti-hepatitis E virus IgG // Zhonghua Yufang Yixue Zazhi. 2001. V. 35, No. 5. – P. 315–317.
288. Zipor G., Duarte P., Carqueijeiro I., Shahar L., Ovadia R., Teper-Bamnolker P., Eshel D., Levin Y., Doron-Faigenboim A., Sottomayor M., Oren-Shamir M. In planta anthocyanin degradation by a vacuolar class III peroxidase in *Brunfelsia calycina* flowers // New Phytology. 2015. V. 205, No. 2. – P. 653 – 665.
289. Zorn H., Langhoff S., Scheibner M., Nimtz M., Berger R.G. A peroxidase from *Lepista irina* cleaves β,β-Carotene to flavor compounds // Biological Chemistry. 2003. V. 384, No. 7. – P. 1049–1056.
290. Zupan J.R., Zambryski P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell // Plant Physiology. 1995. V. 107, No. 4. – P. 1041–1047.