Правительство Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«Санкт-Петербургский государственный университет»
(СПбГУ)

УДК 574.522; 58.018; 577.121.4
Рег № НИОКТР АААА-А17-117041010109-9
Инв. № 37860759

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления
научных исследований СПбГУ

_____ Е.В. Лебедева
« » _____20___ г.

ОТЧЁТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

Выявление биохимических маркеров ключевых этапов эмбриогенеза фукусовых водорослей

По гранту РФФИ
(№ 17-04-01331-а от 15.03.2017 г.)

Руководитель НИР,
Доцент кафедры физиологии и биохимии растений Тараховская Е.Р.

Санкт-Петербург
2020

Итоговый отчет по гранту No (17-04-01331 а)

«Выявление биохимических маркеров ключевых этапов эмбриогенеза фукусовых водорослей»

Руководитель: Тараховская Елена Ролановна

Реферат

Целью проекта являлось определение спектра маркерных химических соединений, обеспечивающих прохождение физиологических процессов на ключевых этапах эмбрионального развития фукусовых водорослей. Для изучения эмбриогенеза фукоидов были впервые задействованы современные «омик-технологии» (метаболомика, протеомика), что не только привело к получению значительного объема новых данных, но и позволило консолидировать накопленный массив данных, полученных ранее. В ходе выполнения проекта был получен значительный объем новых данных по биохимии эмбриогенеза бурой макрофитной водоросли *Fucus vesiculosus*. Все полученные данные обсуждались в сравнении с соответствующими биохимическими характеристиками взрослых организмов. Было показано, что в течение первых 9 суток развития происходит постоянное перераспределение внутриклеточных ресурсов эмбрионов, отражающее протекающие анатомические и физиологические процессы. Ключевую роль в распределении ресурсов для обеспечения энергетического обмена и биосинтетических процессов играет метаболит цикла Кребса лимонная кислота. Среди вторичных метаболитов существенный вклад в обеспечение развития эмбрионов вносят специфические фенольные соединения бурых водорослей, флоротаннины и уникальный фермент ванадий-зависимая галопероксидаза. В течение первых нескольких дней эмбриогенеза существенно изменяется спектр ключевых белков клеток фукоидов: от профиля, характерного для меристематической ткани (преобладание белков, ассоциированных с клеточным дыханием, метаболизмом белка, синтезом клеточной стенки) по направлению к профилю зрелых фотоассимиляционных клеток (преобладание белков, ассоциированных с процессами фотосинтеза, метаболизма углеводов и внутриклеточного транспорта). В целом, полученные данные позволяют выявить ряд биохимических маркеров, характеризующих ключевые этапы развития зигот и эмбрионов и таким образом, обозначить биохимическую основу для прохождения ключевых анатомических и физиологических процессов эмбриогенеза фукусовых водорослей.

Введение

Достижение репродуктивного возраста и воспроизводство популяций морских макрофитных водорослей, в первую очередь, определяется выживанием эмбрионов и молодых растений. При этом, в особенно уязвимом положении находятся обитатели литоральной зоны. Литоральные и сублиторальные фукусовые водоросли – виды-эдификаторы, определяющие функционирование и стабильность прибрежных экосистем в умеренных и арктических морях. Как и большинство морских макрофитов, эти водоросли продуцируют огромное количество гамет, но только немногие из них доживают до состояния взрослого растения, и самый высокий уровень смертности приходится на период раннего эмбриогенеза.

Бурые водоросли порядка Fucales (роды *Fucus, Pelvetia, Ascophyllum*) известны как уникальная модельная система для исследования физиологических процессов, сопровождающих эмбриональное развитие растительного организма [1-3]. Повышенный интерес к этим объектам вызван целым рядом интересных особенностей, отличающих их от большинства макрофитных водорослей и высших растений. При размножении гаметы этих водорослей выходят в воду, и оплодотворение и все процессы эмбриогенеза происходят независимо от тканей материнского растения. Таким образом, на всех стадиях развития эмбрионы относительно легкодоступны для исследований.

Яйцеклетки фукоидов имеют округлую форму без каких-либо анатомических или физиологических проявлений полярности и лишены клеточной стенки. Первым морфологическим проявлением дифференцировки после оплодотворения является изменение формы клетки – появление на одном из ее полюсов ризоидального выступа, обозначающего возникшую ось полярности зиготы [1; 4]. Первое деление зиготы уже асимметрично и происходит в плоскости, перпендикулярной сформировавшейся оси полярности. Дочерние клетки существенно различаются как по структуре, так и по назначению – одна из них дает начало основной части таллома водоросли, а вторая – ризоиду [4]. В ходе эмбриогенеза фукоидов за очень короткий промежуток времени происходит серия важнейших физиологических процессов, таких как оплодотворение, первичный синтез клеточной стенки, поляризация клетки, прикрепление к субстрату, прорастание зиготы, формирование ризоида и первые этапы органогенеза. Всего за несколько дней яйцеклетка превращается в полноценный эмбрион, обладающий зачатками всех вегетативных органов взрослого растения. При этом, одновременно с поддержанием активного роста и развития, клетки должны вырабатывать системы адаптивных ответов на множество стрессовых факторов, таких как резкие изменения освещенности, температуры и солености воды, периодическая осушка, гидродинамические воздействия и т. д. [5-6]. Очевидно, обеспечение прохождения всех этих процессов связано с серьезнейшими перестройками метаболома и протеома клеток, которые, на данный момент, совершенно не исследованы. С появлением современных методов, позволяющих характеризовать биологические объекты сразу по большому количеству параметров (метаболомика, протеомика), появилась возможность для консолидации накопленного массива данных по анатомии и физиологии эмбриогенеза фукоидов, что позволит подвести общую биохимическую основу под известные последовательности физиологических процессов. На выполнение этой задачи направлен данный проект. Более того, полученная в результате выполнения проекта совокупность данных будет иметь и предсказательную силу в плане обнаружения ранее не изученных физиологических реакций, сопровождающих такие сложные процессы как эмбриогенез.

Основная часть отчета о НИР

Цель данного проекта – определить спектр маркерных химических соединений, обеспечивающих прохождение физиологических процессов на ключевых этапах эмбрионального развития фукусовых водорослей.

Конкретные задачи проекта:

- На основе результатов предварительных исследований и анализа литературных данных составить математическую модель, позволяющую с высокой точностью

выявить характеристические точки на временной шкале эмбриогенеза фукусовых водорослей.

- Определить спектр низкомолекулярных метаболитов в гаметах, зиготах и на разных этапах эмбриогенеза фукусовых водорослей.
- Исследовать содержание ключевых вторичных метаболитов (в частности, флоротаннинов) в гаметах, зиготах и на разных этапах эмбриогенеза фукусовых водорослей.
- Детально исследовать динамику активности ряда ферментов (в частности, ванадий-зависимых галопероксидаз), обеспечивающих прохождение ключевых биохимических реакций, сопровождающих конкретные этапы эмбриогенеза фукусовых водорослей.
- Выявить спектр ключевых белков и пептидов, синтезирующихся в характеристических точках, соответствующих разным этапам эмбрионального развития фукусовых водорослей.
- Выявить конкретные маркерные соединения и/или группы соединений, составляющие биохимическую основу для прохождения ключевых физиологических процессов и, на их основе, сформировать целостную картину биохимии и физиологии эмбриогенеза фукусовых водорослей.

Исследование проводили с помощью следующих методик:

1. В качестве основного объекта исследования использована бурая макрофитная водоросль *Fucus vesiculosus* L. Ряд методик предварительно тестировался на других представителях пор. Fucales: *F. edentatus* Bachelot de la Pyl., F. serratus L. и *Pelvetia canaliculata* L. Получение гамет и ведение синхронной культуры эмбрионов осуществлялось по методике Quatrano [4] с модификациями [7-8]. Временем оплодотворения считался момент через 15 мин после объединения суспензий яйцеклеток и антерозоидов. Пробы яйцеклеток, зигот и эмбрионов (20-150 мг сыр. массы) отбирали в 9 характеристических точках эмбриогенеза (яйцеклетки, 1, 3, 6 и 12 ч ПО и 1, 3, 6 и 9 сут. ПО). Взрослые талломы *Fucus vesiculosus* L., собирали в период размножения (со зрелыми рецептакулами). Пробы (20-150 мг сыр. массы) отбирали в 4 зонах таллома: основание (сразу над прикрепительной подошвой), средняя зона (уплощенные участки таллома без воздушных пузырей), апексы (верхние 5 мм) и рецептакулы.

2. Для экстракции метаболитов использовали 100% метанол. Идентификацию низкомолекулярных метаболитов и определение их относительного содержания проводили методом метаболомики на основе газовой хроматографии - масс-спектрометрии (GC-MS). Высушенные экстракты растительного материала были дериватизированы метоксиамин-гидрохлоридом и BSTFA и проанализированы на хроматографе Trace GC Ultra совмещенном с масс-спектрометром MAT95 XP с двойной фокусировкой и магнитным секторным масс-анализатором (Thermofinnigan, Bremen, Germany) с электронной ионизацией под управлением программного обеспечения ChemStation. Для определения индексов удерживания (RI) аналитов использовали стандартную смесь алканов (C10–C32). Для подтверждения идентификации метаболитов использовали смесь стандартов, содержащую 20 аминокислот, 20 сахаров и

сахароспиртов, 19 органических кислот и флороглюцин. Для деконволюции пиков использовали программу AMDIS 2.65. Для идентификации метаболитов по их масс-спектрам и специфическим паттернам фрагментации использовали библиотеки NIST14, GMD и библиотеки масс-спектров, составленные и выверенные в ходе проведения предварительных исследований и дополненные данными о специфических метаболитах бурых водорослей. Количественное оценивание было проведено с помощью программы Xcalibur 2.0.7 на основе интегрирования площади пиков экстрагированных ионных хроматограмм, реконструированных для характерных *m/z* и RT метаболитов; для оценки содержания метаболитов, входящих в состав смеси стандартов, использовали метод добавок. Все анализы были выполнены в 3-10 биологических повторностях; математическая обработка данных (нормализация, анализ главных компонент, построение теплокарт) осуществлялось с помощью приложения MetaboAnalyst 4.0 (http://www.metaboanalyst.ca).

3. Анализ содержания запасного питательного вещества – ламинарана (β-1,3-глюкан, содержащий до 4% маннита) в клетках эмбрионов и взрослых растений фукуса был проведен по методу Gómez и Wiencke [9].

4. Для исследования минерального состава зигот, эмбрионов и взрослых талломов *F. vesiculosus*, пробы биологического материала (50-100 мг сух. массы) были раздроблены и подвергнуты мокрому озолению в смеси концентрированных азотной и хлорной кислот (HNO3:HClO4 = 5:1). После полного озоления проб, их элементный состав был проанализирован с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (ICPE-9000, Shimadzu, Япония). Анализ был выполнен на базе Научного парка СПбГУ («Ресурсный образовательный центр по направлению химия»).

5. Общее содержание флоротаннинов определяли спектрофотометрически с использованием реактива Фолина-Чокалтеу, с флороглюцином в качестве калибровочного стандарта ([10], с модификациями). Растворимую фракцию флоротаннинов экстрагировали 70% ацетоном. Флоротаннины клеточных стенок были экстрагированы с использованием метода щелочного гидролиза, после инкубации в 1 н NaOH по R. Koivikko с соавт. [11]. Разделение и детальный химический анализ флоротаннинов был осуществлен методом высокоэффективной жидкостной хроматографии – масс-спектрометрии. Протокол анализа является оригинальным и был разработан в ходе выполнения проекта. Полученные экстракты упаривали до водного остатка и подвергали процедуре многоступенчатой очистки сначала с дихлорметаном, затем – с эцилацетатом. Фракцию, содержащую флоротаннины, выпаривали, осадок растворяли в воде и наносили на колонку Gemini C18 (150 x 2 mm, 5 μ, Phenomenex). Анализ проводили на хроматографе Agilent 1100, сопряженном с масс-спектрометром Bruker Esquire 3000+ с электроспрей-ионизацией. Сканирование отрицательно заряженных ионов проводили в диапазоне *m/z* 150-2000.

6. Ванадий-зависимая галопероксидаза *F. vesiculosus* была выделена и очищена с применением водной двухфазной системы очистки белков, модифицированной для бурых водорослей. Дополнительно была проведена хроматографическая (HIC) очистка полученного препарата галопероксидазы. Иодо- и бромопероксидазную активность фермента определяли спектрофотометрически по скорости галогенирования тимолового синего [12]. В качестве субстратов использовали KBr и KI, определяя соответственно

бромо- и иодопероксидазную активность. Данный метод был модифицирован авторами проекта для использования в работе с зиготами и эмбрионами бурых водорослей. Количественное определение содержания пероксида водорода в яйцеклетках, зиготах и эмбрионах фукуса было проведено с использованием FOX-метода – по изменению окраски (λ=560 нм) ксиленового оранжевого при окислении $FeSO_4$ [13].

7. Семиполярные метаболиты анализировали методом нецелевой метаболомики в RP-HPLC-QqTOF-MS экспериментах, используя SWARH (Sequential window acquisition of all theoretical masss spectra) технологию в режиме детекции положительных и отрицательных ионов. Экстракция семиполярных вторичных метаболитов осуществлялась путем смешивания 150 мг сыр. массы раздробленного растительного материала с 900 мкл смеси 2:1 дихлорметана/этанол с добавлением 200 мкл раствора 0.1 М соляной кислоты. После перемешивания и последующего центрифугирования (4°C, 10000g, 5 мин) пробы отделившуюся неполярную фазу собирали, а растительный материал повторно экстрагировали тетрагидрофураном (500 мкл). После центрифугирования (4°C, 10000g, 5 мин) неполярную фазу собирали и объединяли с предыдущим сбором. Экстракт высушивали в потоке азота, ресуспензировали в 180 мкл смеси 3:1 метанол/вода, фильтровали и анализировали. Полученную масс-спектрометрическую информацию обрабатывали с помощью программы MSDial (версия 4.00), которая выполняла деконволюцию масс-спектров, детектирование пиков, выравнивание хроматограмм по времени удерживания аналитов, идентификацию и относительный количественный анализ аналитов. Идентификация основывалась на поиске и сравнении экспериментально полученных точных масс квазимолекулярного иона (MS1) и одного из фрагментных ионов аналита с масс-спектрометрическими данными стандартов библиотеки Американского национального института измерений и стандартов (NIST). Аннотация аналитов к соответствующим классам химических соединений основывалась на алгоритме поиска и идентификации веществ, установленного для программы MSDial [14].

8. Для исследования протеома *F. vesiculosus* была использована gel-free bottom-up протеомная стратегия на основе нано-ВЭЖХ – тандемной масс-спектрометрии (LC-MS/MS). Тотальный белок выделяли из 50-150 мг растительного материала методом фенольной экстракции. Пробоподготовка и хромато-масс-спектрометрический анализ осуществлялись по Paudel с соавт. [15]. После экстракции белок осаждали ледяным метанольным раствором ацетата аммония, промывали последовательно метанолом и ацетоном, подсушивали и растворяли в хаотропном буфере. После определения концентрации белка по методу Брэдфорд, аликвоты с содержанием 100-200 мкг белка были обработаны (переварены) трипсином. Полученные триптические пептиды были отмыты от компонентов дайжестной смеси на колонках для твердофазной экстракции (Oasis HLB cartridges, Waters GmbH). Очищенные пептиды после лиофилизации хранились при -80 °C. Для LC-MS/MS анализа пептиды растворяли в 3% ацетонитриле. LC-MS/MS был выполнен с помощью комплекса, включающего УВЭЖХ систему Agilent 1200 и масс-спектрометр Agilent 6538 UHD с QqTOF масс-анализатором. Были выполнены отдельные эксперименты для качественного и относительного количественного анализа. Для идентификации пептидов использовался DDA (data-dependent acquisition) алгоритм, в котором после сканирования всех пептидных ионов в диапазоне *m/z* 400-1500 (MS-скан или MS-survey scan) были отобраны до 6 ионов с наиболее интенсивным уровнем сигналов для фрагментации и регистрации MS/MS спектров. Для большей глубины охвата

протеома было осуществлено разделение на уровне пептидных ионов [16], что позволило идентифицировать ионы с очень низким уровнем сигнала и обнаружить не только доминирующие, но также и минорные белки, содержащиеся в анализируемых пробах.

Для идентификации пептидов был выполнен поиск полученных MS/MS спектров в UniprotKB (комбинированной базе данных последовательностей белков *Ectocarpus siliculosus, Fucus sp., Saccharina sp., Laminaria sp., Ascophyllum nodosum*). Использование для аннотирования данных нескольких частично секвенированных организмов дало лучшие результаты по сравнению с использованием единственного полностью секвенированного вида бурой водоросли (*E. siliculosus*), поскольку эктокарпус филогенетически не является близким к фукоидам. Использование подобной комбинированной базы данных является новым методическим подходом, разработанным в ходе выполнения данного проекта. Поиск осуществлялся с помощью поисковой машины SEQUEST, работающей на платформе программного обеспечения Proteome Discoverer 2.2. (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany).

9. Для исследования спектра белков с пост-трансляционными модификациями (окислительные модификации, гликирование) была использована обратнофазная высокоэффективная жидкостная хроматография в режиме онлайн с масс-спектрометрией высокого разрешения (гибридный масс-спектрометр, представляющий собой комбинацию линейной квадрупольной и орбитальной ионных ловушек, LIT-Orbitrap-MS) [15-16]. Анализ проводили в режиме записи данных, обусловленной полученными результатами (data-dependent acquisition, DDA-эксперименты) – по итогам каждого цикла орбитальной ловушки производилась регистрация пяти тандемных масс-спектров пептидных сигналов. Для максимального повышения эффективности данного подхода вся детектируемая m/z область (300-1500 *m/z*) была разделена на сегменты.

Основные результаты проекта:

1. В течение первых 9 суток развития происходит постоянное перераспределение внутриклеточных ресурсов эмбрионов фукусовых водорослей, отражающее протекающие анатомические и физиологические процессы. Ключевую роль в распределении ресурсов для обеспечения энергетического обмена и биосинтетических процессов играет метаболит цикла Кребса лимонная кислота.

2. Среди вторичных метаболитов существенный вклад в обеспечение развития эмбрионов вносят специфические фенольные соединения бурых водорослей, флоротаннины. В течение первых 12 ч развития низкомолекулярная фракция флоротаннинов класса кармалолов включается в состав матрикса клеточной стенки зигот, обеспечивая упрочнение стенки и прикрепление зигот к субстрату. Этот процесс сопровождается повышением активности ванадий-зависимой галопероксидазы – фермента, который катализирует образование поперечных сшивок между флоротаннинами и альгинатами клеточной стенки.

3. Исследования профиля метаболитов анатомически и физиологически различающихся зон таллома фукуса показало, что они связаны между собой донорно-акцепторными отношениями, по-видимому, основанными на системе дальнего транспорта метаболитов. В период размножения перераспределение ресурсов приводит к накоплению в рецептакулах метаболитов, являющихся биохимическими маркерами яйцеклеток и зигот

F. vesiculosus (глицерин, яблочная кислота, ламинаран). Метаболитный профиль меристематических тканей апексов таллома сходен с профилями 1-9 суточных эмбрионов фукуса.

4. В течение первых нескольких дней эмбриогенеза существенно изменяется спектр ключевых белков клеток фукуса: от профиля, характерного для меристематической ткани (преобладание белков, ассоциированных с клеточным дыханием, метаболизмом белка, синтезом клеточной стенки) по направлению к профилю зрелых фотоассимиляционных клеток (преобладание белков, ассоциированных с процессами фотосинтеза, метаболизма углеводов и внутриклеточного транспорта).

5. На основе полученных данных выявлен ряд первичных и вторичных метаболитов и белков, которые могут быть использованы как биохимические маркеры важнейших этапов раннего эмбриогенеза *F. vesiculosus*.

Заключение

В ходе выполнения проекта был получен значительный объем новых данных по биохимии эмбриогенеза бурой макрофитной водоросли *Fucus vesiculosus*. Все полученные данные обсуждались в сравнении с соответствующими биохимическими характеристиками взрослых организмов. Показано, что ключевую роль в метаболизме эмбрионов играет лимонная кислота, как первичный метаболит, перенаправляющий поток зафиксированного углерода с цикла Кребса на биосинтетические процессы. Исследована роль флороглюцина и его полимеров, флоротаннинов, в процессах формирования клеточной стенки зигот и их прикреплении к субстрату. Показано изменение спектра ключевых белков клеток в течение первых дней эмбриогенеза от профиля, характерного для меристематической ткани по направлению к профилю зрелых фотоассимиляционных клеток. Помимо изначально заявленных в проекте задач, был выполнен ряд дополнительных исследований (изучен минеральный состав эмбрионов, получена детальная характеристика общего и окисленного протеома фукуса на разных фазах приливно-отливного цикла, исследован спектр семиполярных метаболитов фукуса).

Полученные данные позволяют выявить ряд биохимических маркеров, характеризующих ключевые этапы развития зигот и эмбрионов и таким образом, обозначить биохимическую основу для прохождения ключевых анатомических и физиологических процессов эмбриогенеза фукусовых водорослей.

Таким образом, все запланированные работы выполнены в полном объеме. По результатам проекта подготовлены и опубликованы статьи, полученные данные были представлены на ряде всероссийских и международных конференций.

Основные публикации по результатам проекта:

1. Tarakhovskaya E., Lemesheva V., Bilova T., Birkemeyer C. Early embryogenesis of brown alga Fucus vesiculosus L. is characterized by significant changes in carbon and energy metabolism // Molecules. 2017. Vol. 22(9), 1509. http://www.mdpi.com/1420-3049/22/9/1509

2. Lemesheva V., Tarakhovskaya E. Physiological functions of phlorotannins // Biological Communications 2018. Vol. 63. P. 70-76. https://doi.org/10.21638/spbu03.2018.108102
3. Fritzsche S., Billig S., Rynek R., Abburi R., Tarakhovskaya E., Leuner O., Frolov A., Birkemeyer C. Derivatization of methylglyoxal for LC-ESI-MS analysis – stability and relative sensitivity of different derivatives // Molecules. 2018. 23(11), 2994. https://doi.org/10.3390/molecules23112994
4. Birkemeyer C., Osmolovskaya N., Kuchaeva L., Tarakhovskaya E. Distribution of natural ingredients suggests a complex network of metabolic transport between source and sink tissues in the brown alga *Fucus vesiculosus* // Planta. 2019. Vol. 249. P. 377-391. https://doi.org/10.1007/s00425-018-3009-4
5. Lemesheva V., Birkemeyer C., Garbary D., Tarakhovskaya E. Vanadium-dependent haloperoxidase activity and phlorotannin incorporation into the cell wall during early embryogenesis of *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae) // European Journal of Phycology. 2020. Vol. 55. P. 275-284. https://doi.org/10.1080/09670262.2019.1709131

Использованная литература:

[1] Kropf D.L. Induction of polarity in fucoid zygotes // Plant Cell 9 (1997) 1011–1020.
[2] Corellou F., Potin P., Brownlee C., Kloareg B., Bouget F.-I. Inhibition of the establishment of zygotic polarity by protein tyrosine kinase inhibitions leads to an alteration of embryo pattern in Fucus // Developmental Biology 219 (2000) 165-182.
[3] Tarakhovskaya E.R., Kang E.J., Kim K.Y., Garbary D.J. Influence of phytohormones on morphology and chlorophyll *a* fluorescence parameters in embryos of *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyceae) // Russian Journal of Plant Physiology 60 (2013) 176–183.
[4] Quatrano R. S. Development of cell polarity // Annual Reviews of Plant Physiology 29 (1978) 487-510.
[5] Vadas S., Johnson S., Norton T. A. Recruitment and mortality of early post-settlement stages of benthic algae // British Phycological Journal 27 (1992) 331–335.
[6] Van Alstyne K. L., Whitman S. L., Ehlig J. M. Differences in herbivore preferences, phlorotannin production, and nutritional quality between juvenile and adult tissues from marine brown algae // Marine Biology 139 (2001) 201–210.
[7] Polevoi V.V., Tarakhovskaya E.R., Maslov Y.I., Polevoi A.V. Role of auxin in induction of polarity in *Fucus vesiculosus* zygote // Russian Journal of Developmental Biology 34 (2003) 360–364.
[8] Tarakhovskaya E., Lemesheva V., Bilova T., Birkemeyer C. Early embryogenesis of brown alga *Fucus vesiculosus* L. is characterized by significant changes in carbon and energy metabolism // Molecules 22 (2017) 1509.
[9] Gómez I., Wiencke C. Seasonal changes in C, N and major organic compounds and their significance to morpho-functional processes in the endemic Antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis* // Polar Biology 19 (1998) 115–124.
[10] Creis E., Delage L., Charton S., Goulitquer S., Leblanc C., Potin P., Ar Gall E. Constitutive or inducible protective mechanisms against UV-B radiation in the brown alga Fucus vesiculosus? A Study of gene expression and phlorotannin content responses // PLoS ONE 10 (2015) e0128003.

[11] Koivikko R., Loponen J., Honkanen T., Jormalainen V. Contents of cytoplasmic, cell-wall-bound and exudes phlorotannins in the brown alga Fucus vesiculosus, with implications on their ecological functions // Journal of Chemical Ecology 31 (2005) 195–209.
[12] Verhaeghe E., Buisson D., Zekri E., Leblanc C., Potin P., Ambroise Y. A colorimetric assay for steady-state analyses of iodo- and bromoperoxidase activities // Analytical Biochemistry 379 (2008) 60–65.
[13] Gay C., Gebicki J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay // Analytical Biochemistry 284 (2000) 217–220.
[14] Tsugawa H., Cajka T., Kind T., Ma Y., Higgins B., Ikeda K., et al. MS-DIAL: data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis // Nature Methods 12 (2015) 523–526.
[15] Paudel G., Bilova T., Schmidt R., Greifenhagen U., Berger R., Tarakhovskaya E., Stöckhardt S., Balcke G., Humbeck K., Brandt W., Sinz A., Vogt T., Birkemeyer C., Wessjohann L., Frolov A. Osmotic stress is accompanied by protein glycation in Arabidopsis thaliana // Journal of Experimental Botany 67 (2016) 6283–6295.
[16] Bilova T., Lukasheva E., Brauch D., Greifenhagen U., Paudel G., Tarakhovskaya E., Frolova N., Mittasch J., Balcke G. U., Tissier A., Osmolovskaya N., Vogt T., Wessjohann L. A., Birkemeyer C., Milkowski C., Frolov A. A Snapshot of the plant glycated proteome: structural, functional and mechanistic aspects // Journal of Biological Chemistry 291 (2016) 7621-7636.