

ORIGINAL ARTICLE

Influence of nitrogen compounds on growth and the nitric oxide (NO) content in roots of etiolated pea seedlings

Glyan'ko A. K.*, Mitanova N. B., and Ischenko A. A.

*State Federal Budget Institution of Science Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry
Siberian Division of the Russian Academy Sciences; 664033, Irkutsk, p/b 317, Russia*

*E-Mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Received September 26, 2012

The data on the influence of different concentration of sodium nitroprusside (SNP), potassium nitrate (KNO_3), sodium nitrite (NaNO_2) and L-arginine on 3 days-old etiolated pea seedlings growth and nitric oxide (NO) content in roots of these seedlings are obtained. It is found that 24 h exposition of seedlings to SNP showed negative influence on growth at a 4 mM dose; SNP at 0.05 mM doze stimulates their growth and 0.1 mM doze did not influence on seedlings growth. Using KNO_3 negative influence on growth at the same exposition was showed only at superhigh concentration – 20 mM. Using NaNO_2 negative influence on growth was shown at a doze of 2 mM but concentration of 0.1 and 0.5 mM did not influence on it. The exposition of seedlings to L-arginine caused growth inhibition already at concentration of 0.5 mM and reached maximum at 4 mM doze. Determination of NO level in roots using fluorescent probe DAF-2DA in variants with the greatest growth inhibition has showed, that the maximal inhibition of growth in roots and highest level of NO in roots in variants with SNP (4 mM) and NaNO_2 (2 mM) was observed. In variants with KNO_3 (20 mM) and L-arginine (4 mM) maximal growth inhibition did not coincide with NO accumulation and was observed after 30 min after the beginning of plants exposition and further it was reduced in 24 h. Results are discussed in connection with possible influence NO and participation of the investigated connections in generation nitric oxide in roots of pea seedlings.

Key words: L-arginine, growth, etiolated seedlings, pea, sodium nitroprusside, potassium nitrate, sodium nitrite, nitric oxide

ORIGINAL ARTICLE

Влияние азотных соединений на рост и содержание оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха

Гляньюко А. К., Митанова Н. Б., Ищенко А. А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск

*E-Mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 26 Сентября 2012 года

Получены данные о влиянии разных концентраций нитропруссид натрия (НПН), нитрата калия (KNO_3), нитрита натрия ($NaNO_2$) и L- аргинина на рост 3-х суточных этиолированных проростков гороха, а также на содержание оксида азота (NO) в корнях этих проростков. Установлено, что при экспозиции проростков на НПН в течение 24 ч отрицательное влияние на рост проявилось при дозе 4 мМ; доза НПН 0,05 мМ оказала стимулирующее влияние, а доза 0,1 не оказала влияния на рост. На фоне KNO_3 отрицательное влияние на рост при этой же экспозиции проявилось только при супервысокой концентрации – 20 мМ. На фоне $NaNO_2$ отрицательное влияние на рост оказала доза 2 мМ, а дозы 0,1 и 0,5 мМ не оказали влияния. Экспозиция проростков на L-аргинине – вела к ингибированию роста уже при концентрации 0,5 мМ, достигая максимума при концентрации 4 мМ. Определение уровня NO в корнях с помощью флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2DA) в вариантах с наибольшим ингибированием роста корней показало, что максимальное ингибирование роста и наибольшее содержание NO в корнях наблюдалось в вариантах с НПН (4 мМ) и нитритами (2 мМ). В вариантах с нитратами (20 мМ) и L-аргинином (4 мМ) максимальное ингибирование роста не совпадало с накоплением NO в корнях. В этих вариантах накопление NO наблюдалось спустя 30 мин после начала экспозиции растений, а затем снижалось через 24 ч. Результаты обсуждаются в связи с возможным влиянием NO на рост и участием изученных соединений в генерации оксида азота в корнях проростков гороха.

Key words: L-аргинин / горох / нитропруссид натрия / нитрат калия / нитрит натрия / оксид азота / рост этиолированных проростков

Активные формы азота (АФА) наряду с активными формами кислорода (АФК) играют в жизнедеятельности организмов непреходящую роль как сигнальные молекулы и цитотоксические вещества (Glyan'ko et al., 2010). Из АФА наибольшее внимание уделяется оксиду

азота (NO) – свободному радикалу и многофункциональной сигнальной молекуле. NO легко диффундирует через мембраны и участвует во внутриклеточных и межклеточных процессах в клетках, оказывая как положительное, так и отрицательное влияние на

метаболизм организмов (Benson-Bard et al., 2008; Колупаев, Карпец, 2009). Доказана кардинальная роль NO в функционировании иммунной, нервной, сердечно-сосудистой систем у животных организмов (Реутов и др., 2005). В растениях ключевая роль NO обнаружена в регуляции роста и развития растений, связанной, в частности, с прорастанием семян, цветением, закрыванием устьиц, образованием латеральных корней и корневых волосков, а также с экспрессией генов защиты и программированной клеточной смертью (Neill et al., 2003; 2007). NO может вступать в химические реакции с различными клеточными соединениями, обладающими либо токсичностью, либо свойствами регуляторных молекул. Так, при взаимодействии оксида азота с супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot-}$) образуется пероксинитрит ($ONOO^-$) – более токсичный радикал, чем сама молекула NO (Yamasaki, Sakihama, 2000). Токсичность $ONOO^-$ заключается в окислении тиоловых остатков, нитровании тирозина белков, что препятствует их фосфорилированию (Reiter et al., 2000). NO реагирует с белками, содержащими металлы (металлонитрозилирование), остатки цистеина (S-нитрозилирование) и тирозина (нитрование с участием $ONOO^-$). Эти посттрансляционные модификации белков играют существенную роль в модуляции сигнальной функции оксида азота (Benson-Bard et al., 2008). NO реагирует с глутатионом с образованием S-нитрозоглутатиона (GSNO), который может функционировать как мобильный резервуар биологической активности NO (Feechan et al., 2005). Доказано участие NO в устойчивости растений к патогенам через каскад реакций связанных с гемоглобином и сигнальными

системами салициловой кислоты, жасмоната и этилена (Mur et al., 2012). О возможном влиянии NO на бобово-ризобийный симбиоз предполагается в работе Глян'ко с соавт. (2012).

Особое внимание в последние годы уделяется процессам взаимодействия NO с потоками внутриклеточного и внеклеточного кальция (Ca^{2+}), которому (как и NO) отводят ключевую роль в регуляции жизненных функций организмов (Courtois et al., 2008; Медведев, 2010; Колупаев, Карпец, 2009; Васильева и др., 2011). Примечательно, что почти все типы Ca^{2+} -каналов на плазмалемме и внутри клетки подвержены регуляции NO (Clementi, 1998). Прямое влияние NO на активность Ca^{2+} -каналов связано с S-нитрозилированием белков (обратимым образованием ковалентной связи между остатком цистеина и NO) или косвенно – через каскад реакций, в который вовлекаются циклические ГМФ, АДФ-рибоза, протеинкиназы (Courtois et al., 2008). Активация Ca^{2+} -проникающих каналов внутриклеточных органелл и плазмалеммы ведет к повышению концентрации цитозольного кальция. С другой стороны, уменьшение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме оказывает стимулирующее влияние на синтез NO (Benson-Bard et al., 2008).

В литературе окончательно не решен вопрос об источниках генерации и локализации NO в растениях. Тем не менее в настоящее время общепринято, что основными источниками образования NO в растениях являются L-аргинин- и нитрат-нитритзависимые пути генерации оксида азота (Benson-Bard et al., 2008). Первый путь синтеза NO осуществляется с участием L-аргинина как субстрата в реакции, катализируемой ферментом(ами), подобного(ых) NO-синтазе из животных клеток.

Второй путь связан с восстановлением нитратов и нитритов цитозольной нитратредуктазой (НР), которая катализирует восстановление нитратов до нитритов и далее нитритов до NO. Подробно физиологические механизмы генерации NO с участием L-аргинина обсуждены в статье Corras et al. (2006), а при участии НР (нитрат-нитрит-NO-редуктазы) - в работах Rockel et al. (2002) и Meyer et al. (2005).

Литературные данные свидетельствуют об участии NO в образовании корней (Correa-Aragunde et al., 2004; Lamattina et al., 2003, Tewari et al., 2008). Причем в этих процессах отмечается тесная функциональная связь оксида азота с фитогормональным обменом (Molina-Favero et al., 2007). Предполагают, что в ауксин-зависимом образовании придаточных корней NO действует как вторичный мессенджер в синтезе ИУК (Pagnussat et al., 2003). По нашим данным экзогенный донор NO – нитропруссид натрия (НПН), отрицательно влиял на рост клубеньковых бактерий *in vitro* и проростков гороха в зависимости от концентрации НПН (Глянько и др., 2009). Несомненный интерес представляет вопрос о генерации NO в эпидермальных клетках корней проростков гороха при действии внешних биотических и абиотических факторов (Глянько и др., 2012).

Связь ростовых процессов растения с накоплением в клетках NO – процесс практически не исследованный, особенно при использовании соединений, являющихся источниками или субстратами для ферментативных реакций образования оксида азота.

В связи с этим в настоящей статье сделана попытка выяснить связь роста этиолированных проростков гороха с уровнем NO в корнях при

изучении влияния азотных экзогенных соединений на эти процессы. В опытах использовали разные концентрации экзогенного донора NO - нитропруссид натрия, и азотных соединений (L-аргинина, нитрата калия - KNO₃, нитрита натрия - NaNO₂), являющихся субстратами для ферментативного образования оксида азота в клетках растений.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследований - этиолированные проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский (селекция ЗАО «НПФ Сибирская аграрная компания», Россия). Семена, промытые теплой водой с мылом и поверхностно стерилизованные в течение 15 мин 3%-ным раствором пероксида водорода, проращивали в кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C в течение 2 суток, считая с момента замачивания. Для исследований отбирали проростки, критерием однородности которых служила длина корней (включая эпикотиль) 25-30 мм. Для дальнейшего роста проростки помещали на 24 ч в пластмассовые кюветы на фильтровальную бумагу, смоченную дистиллированной водой или растворами испытываемых соединений.

Для окрашивания срезов корней использовали флуоресцентный зонд 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2DA). Это соединение проникает через клеточную мембрану и деацетилирует с помощью внутриклеточных эстераз в 4,5-диаминофлуоресцеин (DAF-2), который образует с NO флуоресцирующее соединение – диаминотриазолфлуоресцеин триазол (DAF-2T) [Nakatsubo et al., 1998; Gould et al., 2003]. Для получения окрашенного соединения (DAF-2T)

отрезки корней инкубировали с 10 мкМ DAF-2DA в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4) в течение 30 мин при температуре 26 °С.

Из инкубированных отрезков корней получали поперечные срезы толщиной 100-150 мкм (участок 10-20 мм от апекса) и анализировали их на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Германия) с цифровой монохромной камерой Axio Cam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений «Axio Vision Rel.4.6» с использованием блока фильтров № 10 и длиной волны возбуждения 450-490 нм, эмиссией 515-565 нм.

Применяли реактивы: DAF-2DA (Calbiochem, Germany); нитропруссид натрия (MP Biomedicals, USA), L-аргинин, KNO₃ и NaNO₂ (Россия, Реахим).

Результаты исследований представлены в виде графиков, отображающих скорость роста проростков и интенсивность флуоресцентного свечения в клетках. Величины представляют средние арифметические из 3 независимых экспериментов, проведенных в трехкратной биологической повторности. Количество анализируемых срезов при микроскопических исследованиях не менее 20 в каждой повторности. Достоверность различий средних значений оценивали по критерию Стьюдента. Статистическая обработка данных проведена с помощью пакета программ Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучали два физиологических параметра: скорость роста этиолированных проростков гороха (мм/ч) и содержание NO в корнях (интенсивность флуоресцентного свечения в срезах корней). Полученные результаты сводятся к следующему.

1. Нитропруссид натрия (НПН). Данное соединение способно в клетках организмов высвобождать оксид азота и с этим связано его широкое применение в исследованиях как экзогенного донора NO. Как видно из данных на рис. 1 стимулирующее влияние на рост проростков гороха оказала концентрация НПН 0,05 мМ; концентрация 0,1 мМ не оказала влияния на рост, а ингибирующий эффект NO четко проявился при концентрации 4 мМ. Уровень NO в клетках корня достигает максимума при концентрации НПН 4 мМ (рис. 2).

2. Нитрат (NO₃⁻) - субстрат для ферментативной реакции восстановления NO₃⁻ до нитрита (NO₂⁻), катализируемой цитозольной нитратредуктазой (НР) (EC 1.7.1.1). Далее нитрит восстанавливается самой же НР до NO или же восстанавливается в пластидах нитритредуктазой (НИР) (EC 1.7.1.4) до аммиака (NH₃). Интересно отметить, что интенсификация образования NO с участием цитозольной НР наблюдается при низкой концентрации нитратов в клетке и повышенном содержании нитритов, вероятно, вследствие того, что сродство НР к нитритам при этих условиях в 2 раза выше по сравнению с нитратами (Rockel et al., 2002). Восстановление NO₃⁻ с участием пластидной НИР связано с ассимиляцией растением окисленного азота (Meyer et al., 2005). Возможны и другие реакции образования NO в растениях, например, с участием нитрат- и нитритвосстанавливающих ферментов, локализованных на плазмалемме клеток корней (Stohr et al., 2001; Stohr, Strelau, 2006). Связанная с плазмалеммой нитрит- NO-оксидоредуктаза корней в качестве донора электронов использует цитохром c в отличие от НР, использующей НАД(Ф)Н.

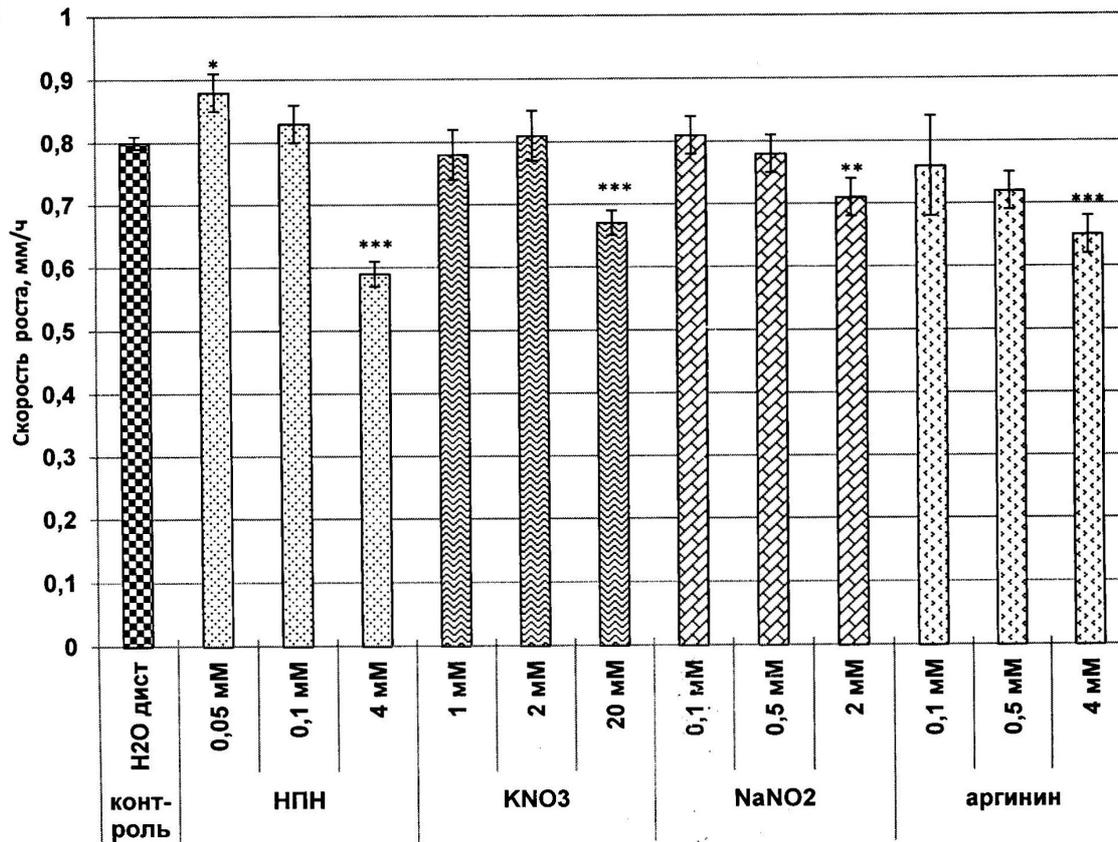


Рисунок 1. Скорость роста корней проростков гороха в зависимости от действия различных концентраций источников NO (экспозиция 24 ч).

* - различие достоверно при $P \geq 0,95$; ** - различие достоверно при $P \geq 0,99$;

*** - различие достоверно при $P \geq 0,999$.

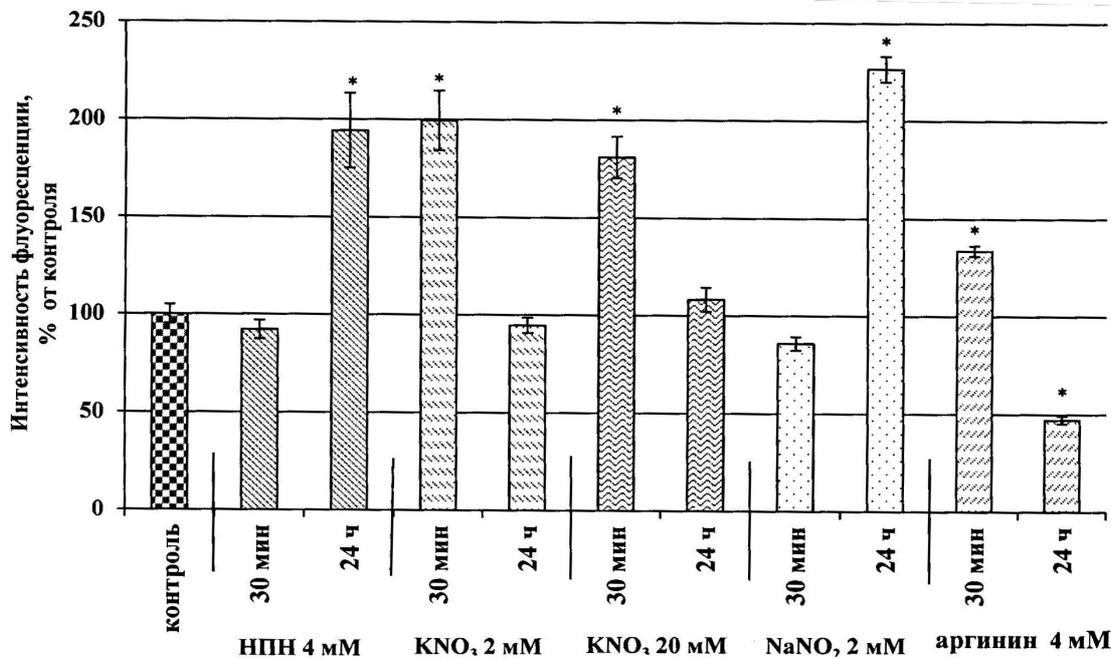


Рисунок 2. Уровень NO в срезах корней этилированных проростков гороха в зависимости от экзогенных источников оксида азота и времени экспозиции проростков на растворах.

* Различие достоверно при $P \geq 0,99$

В наших опытах низкие концентрации KNO_3 не оказали влияния на рост корней и только сверхвысокая доза 20 мМ оказала отрицательное влияние на ростовые процессы, снизив достоверно скорость роста проростков на 16 %. (табл. 1). Однако уровень NO в корнях при этой дозе и экспозиции 24 ч не отличался от контроля (рис. 2).

3. Нитрит (NO_2^-). Является сильно токсичным соединением и в клетках растений восстанавливается до NH_3 или NO. Восстановление экзогенного NO_2^- может, по-видимому, осуществляться уже на плазмалемме клеток корня с участием нитрит-NO-редуктазы (Stohr et al., 2001), а также цитозольной НР и пластидной ННР. Из рис. 1 видно, что концентрации $NaNO_2$ 0,1 и 0,5 мМ не оказали достоверного влияния на рост корней. Ингибирующее влияние на рост нитрита наблюдается при концентрациях 2,0 мМ. Уровень NO в этом варианте превышает контроль более чем в 2 раза (рис. 2).

4. L-аргинин. Эта белковая аминокислота в животных тканях является субстратом в реакции окисления L-аргинина до L-цитруллина и NO, катализируемой ферментом NO-синтазой (КФ 1.14.13.39). В растениях доказано участие L-аргинина в реакциях, ведущих к образованию NO, но фермент(ы) идентичный(ые) NO-синтазе животных не идентифицирован(ы) (Corpas et al., 2006; Besson-Bard et al., 2008). Есть данные, что L-аргинин может использоваться как субстрат в реакциях, катализируемых аргиназой и аргининдекарбоксилазой, при биосинтезе полиаминов (спермина, спермидина) с образованием NO (Yamasaki, Cohen, 2006).

В наших исследованиях испытывались концентрации L-аргинина 0,1; 0,5 и 4,0 мМ. Как

следует из рис. 1 концентрация 0,1 мМ не оказала влияния, а негативное влияние аргинина на рост корней проявилось при концентрации 0,5 и особенно сильно при 4 мМ (рис 1). Однако уровень NO в корнях при этой концентрации и экспозиции 24 ч не повышается, а снижается по сравнению с контролем (рис. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами ранее результаты свидетельствуют о том, что синтез NO в корнях 2-3-суточных этиолированных проростков гороха происходит в эпидермальных клетках корня, что позволяет предполагать о роли NO как первичного защитного барьера при действии на растение экстремальных внешних факторов (Глянко и др., 2012). Подобные результаты также получены Corpas et al. (2006) в опытах с 10-14-дневными проростками гороха. В эпидермальных клетках NO может служить сенсором или рецептором внешних сигналов и способствовать быстрой передаче сигнальной информации в геном, что ведет к активации защитных систем растительного организма при стрессовых воздействиях.

Можно считать, что генерация оксида азота в эпидермальных клетках корня происходит с участием метаболических систем, использующих в качестве субстратов реакций L-аргинин, NO_3^- или NO_2^- . Это подтверждается результатами опытов с ингибиторами ферментативных реакций (Глянко, Митанова, 2011; Глянко и др., 2012).

В наших опытах ингибирование роста проростков гороха совпадает с максимальным накоплением в корнях NO в вариантах с НПН (4мМ) и нитритом (2 мМ). В вариантах с нитратом и аргинином отрицательное влияние

испытуемых концентраций этих соединений на рост выявлено при высоких концентрациях этих соединений (20 и 4 мМ соответственно). Однако накопления NO в корнях при этих концентрациях и экспозиции 24 ч не обнаружено. В предыдущих опытах (Глянько и др., 2012) с нитратной солью в концентрации 2 и 20 мМ наибольший уровень NO в корнях наблюдался через 30 мин после начала экспозиции, а через 1 и 24 ч не отличался от контроля. Возникает вопрос каким образом растение поддерживает на низком уровне содержание NO при различных концентрациях нитратной соли в среде? Известно, что ферментативное образование продукта определяется скоростями его генерации и утилизации: замедление утилизации ведет к накоплению продукта и замедлению его генерации. И наоборот. В связи с этим можно предполагать, что происходит быстрая метаболизация образовавшихся нитритов до NH_3 с помощью пластидной нитритредуктазы без образования NO как промежуточного продукта. Возможно быстрое связывание образующегося оксида азота соединениями, синтезируемыми при участии нитратов. Так, установлено, что при питании растений нитратами образуется различные формы гемоглобина, который может связывать молекулы NO (Ohwaki et al., 2005), обеспечивая тем самым нормальные физиологические условия для роста растений. Полагают, что индукция синтеза несимбиотических форм гемоглобина тесно связана с NP-зависимым синтезом NO, а синтез гемоглобина с влиянием нитратов, нитритов и самой молекулы NO на экспрессию соответствующих генов (Parazzolli et al., 2006). Таким образом, при питании проростков гороха нитратами не происходит

существенного накопления молекул оксида азота в клетках и сам механизм ингибирования роста проростков, вероятно, не связан напрямую с накоплением NO.

В случае с L-аргинином максимальное накопление NO (как и в случае с нитратами) в корнях наблюдается спустя 30 мин при концентрации 2 мМ (рис. 2). При увеличении времени экспозиции проростков до 24 ч уровень оксида азота снизился ниже контроля. О механизме регуляции содержания NO в этом варианте (как и в варианте с NO_3^-) можно только предполагать. Возможна регуляция активности соответствующего фермента конечным продуктом реакции и локализация образующегося NO в компартментах, в которых возможно связывание NO. Кроме того, не исключена быстрая метаболизация L-аргинина для синтеза белковых соединений и вследствие этого недостаток субстрата для ферментативного образования NO.

В вариантах с НПН и нитритами рост проростков тормозится высокими дозами указанных соединений (4 и 2 мМ соответственно). Это совпадает с максимальным накоплением NO в корнях при этих концентрациях. Очевидно, что эндогенное содержание NO в корнях в варианте с экзогенным НПН определяется скоростью освобождения NO из этого соединения в клетках. И при данных условиях проведения опыта максимальное накопление NO в варианте с НПН приходится на 24 ч., что возможно и оказывает негативное влияние на рост проростков.

В нашей предыдущей работе (Глянько и др., 2012) было показано, что временная динамика (30, 60 мин и 24 ч) накопления NO в корнях

проростков гороха в варианте с NaNO_2 характеризуется постепенным увеличением уровня оксида азота в корнях с достижением максимума через 24 ч. Возникает вопрос: за счет какого механизма(ов) осуществляется генерация NO на фоне нитритов? По нашим данным ингибитор нитратредуктазы – вольфрамат натрия, не оказывает влияния на уровень NO на фоне нитритов, но снижает активность фермента на фоне нитратов (Глянко, Митанова, 2011). Это говорит о том, что цитозольная НР, возможно, не участвует в реакции восстановления NO_2^- до NO на фоне экзогенных нитритов. И эта реакция катализируется другим ферментом, на активность которого ингибитор НР не оказывает действия. Это согласуется с тем, что ингибирующее действие вольфрамата натрия связано с замещением им молибдена в активном центре НР, что ведет к инактивации фермента (Xiong et al., 2012).

Накопление NO в этом варианте, возможно, объясняется локализацией NO в определенных клеточных структурах и недоступностью этой молекулы к местам дальнейшего восстановления. По данным Foissner et al. (2000) эпидермальные клетки листьев табака содержали оксид азота в цитоплазме, плазмалемме, хлоропластах, пероксисомах, ядре. Результаты исследований Corpas et al. (2004) с отрезками листьев 14-дневных растений гороха свидетельствуют о локализации NO в проводящих сосудах клеток, а в стареющих растениях (50-дневных) – в пероксисомах. По данным Викторовой и др. (2010) наибольшая генерация NO в апопластном пространстве листьев проростков озимой пшеницы наблюдалась при инфильтрации в листья раствора соли нитрита по сравнению с

нитратной солью и нитропруссидом натрия. Вопрос о клеточной и субклеточной локализации NO в корнях этиолированных проростков гороха предстоит решить.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что торможение роста проростков в ряде вариантов совпадает с накоплением NO в корнях: такая закономерность наблюдается в вариантах с НРН и нитритами. Ингибирующее влияние NO на рост в этих вариантах может быть связано с негативными эффектами оксида азота на процессы метаболизма: усиление перекисного окисления липидов, модификация белков, содержащих остатки цистеина и тирозина. Это ведет к ингибированию металлосодежавших ферментов, например, цитохрома *c* в митохондриях (Yamasaki et al., 2001), накоплению S-нитрозотиолов, S-нитрозоглутатиона и других дериватов NO (Valderrama et al., 2007). В вариантах с нитратами и L- аргинином, где максимальное ингибирование роста не совпадает с накоплением NO, метаболизация оксида азота может быть связана с его быстрым включением в обменные процессы, в результате чего образуются соединения, могущие оказывать отрицательный эффект на рост проростков (например, образование пероксинитрита, более токсического соединения, чем сама молекула NO).

Следует также отметить, что по данным литературы избыток NO в клетках может устраняться путем связывания его различными соединениями. Из них следует отметить ураты, связывающие пероксинитрит (Alamillo, Garcia-Olmedo, 2001), несимбиотический гемоглобин (Perazzolli et al., 2004, 2005; Vieweg et al., 2005), S-

нитрозилирование белков (Benson-Bard et al., 2008). Немаловажное значение имеет также выделение газообразного NO из поверхностных клеток растений (Wildt et al., 1997). Не исключается участие самих клубеньковых бактерий в генерации и детоксикации NO при формировании и функционировании бобово-ризобиального симбиоза (Sanchez et al., 2011). Вопросы эти исследованы недостаточно.

Авторы выражают благодарность А.В. Степанову за методическую помощь при проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

- Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Глянько А.К. (2011). Физиологическая роль кальция при бобово-ризобиальном симбиозе. *Журнал стресс-физиологии и биохимии*, **7** (4), 398-414.
- Викторова Л.В., Максютлова Н.Н., Трифонова Т.В., Андрианов В.В. (2010) Образование пероксида водорода и оксида азота при введении нитрата и нитрита в апопласт листьев пшеницы. *Биохимия*, **75**, 117-124.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г. (2007). Особенности действия активных форм кислорода и азота при бобово-ризобиальном симбиозе. *Вестник Харьковского нац. аграрного ун-та, серия Биология*, **3** (12), 27-41.
- Глянько А.К., Митанова Н.Б., Макарова Л.Е., Васильева Г.Г. (2009). Влияние азотсодержащих соединений на рост клубеньковых бактерий в культуре и их взаимодействие с корнями проростков гороха. *С.-х. биология*, № 1, 83-88.
- Глянько А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В. (2012). Влияние факторов среды на генерацию оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха. *Прикладная биохимия и микробиология*, **48**, 95-102.
- Колупаев Ю.Е., Карпец В.Е. (2009). Участие оксида азота (NO) в трансдукции сигналов абиотических стрессоров у растений. *Вестник Харьковского нац. аграрного ун-та. Серия Биология*, **3** (18), 6-19.
- Медведев С.С. (2010). Кальциевая сигнальная система растительной клетки. В кн.: *Клеточная сигнализация* (ред. Гречкин А.Н.), Казань, изд-во ФЭН, с. 26-36.
- Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. (2005). Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине. *Успехи соврем. биологии*, **125**, 41-65.
- Alamillo J.M., and Garcia-Olmedo F. (2001). Effects of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J.*, **25**, 529-540.
- Baron C., and Zambryski P.C. (1995). The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu. Rev. Genet.*, **29**, 107-129.
- Besson-Bard A., Pugin A., and Wendehenne D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 21-39.
- Clementi E. (1998). Role of nitric oxide and its intracellular signaling pathways in the control of Ca²⁺ homeostasis. *Biochem. Pharm.*, **55**, 713-718.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Leon A.M., Sandalio L.M., and del Rio L. (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, **224**, 246-254.

- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Quiros M., Leon A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gomez M., and del Rio L.A. (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.*, **136**, 2722-2733.
- Correa-Aragunde N., Graziano M., and Lamattina L. (2004). Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, **218**, 900-905.
- Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A., and Wendehenne D. (2008). Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J. Exp. Bot.*, **59**, P. 155-163.
- Ferguson B.J., Indrasumunar A., Hayashi S., Lin M.-H., Lin Y.-H., Reid D.E., and Gresshoff P. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.*, **52**, 61-76.
- Feechan A., Kwon E., Yun B.W., Wang Y., Pallas J.A., and Loake G.J. (2005). A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, **102**, 8054-8059.
- Foissner I., Wendehenne D., Langebartels C., and Durner J. (2000). In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.*, **23**, 817-824.
- Gould K.S., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A., and Wendehenne D. (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cell: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.*, **26**, 1851-1862.
- Glyan'ko A.K., and Vasil'eva G.G. (2010). Reactive oxygen and nitrogen species in legume-rhizobial symbiosis: a review. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **46**, 15-22.
- Glyan'ko A.K., Mitanova N.B., and Stepanov A.V. (2010). The physiological role of nitric oxide (NO) in plants. *Вестник Харьковского нац. аграрного ун-та. Серия Биология*, **1** (19), 6-20.
- Yamasaki H., and Sakihama Y. (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.*, **468**, 89-92.
- Yamasaki H., and Cohen M.F. (2006). NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.*, **11**, 522-524.
- Yamasaki H., Shimoji H., Ohshiro Y., and Sakihama Y. (2010). Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide*, **5**, 261-270.
- Lamb C., and Dixon R.A. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **48**, 251-275.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M., and Pagnussat G. (2003). Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 109-136.
- Meyer C., Lea U.S., Provan F., Kaiser W.M., and Lillo C. (2005). Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth. Res.*, **83**, 181-189.
- Mur L.A.J., Carver T.L.W., and Prats E. (2006). NO way to live: the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.*, **57**, 489-505.
- Molina-Favero C., Creus C.M., Lanteri M.L., Correa-Aragunde N., Lombardo M.C., Barassi C.A., and

- Lamattina L. (2007). Nitric oxide and plant growth promoting rhizobacteria: common features influencing root growth and development. *Adv. Bot. Res.*, **46**, 1-33.
- Mur L.A.J., Sivakumaran A., Mandon J., Cristescu S. M., Harren F.J.M., and Hebelstrup K.H. (2012). Haemoglobin modulates salicylate and jasmonate/ethylene-mediated resistance mechanisms against pathogens. *J. Exp. Bot.*, **63**, 4375-4387.
- Nakatsubo N., Kojima H., Kikuchi K., Nagoshi H., Hirata Y., Maeda D., Imai Y., Irimura T., and Nagano T. (1998). Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Lett.*, **427**, 263-266.
- Neill S.J., Desikan R., and Hancock J.T. (2003). Nitric oxide signaling in plants. *New Phytol.*, **159**, 11-35.
- Neill S., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., and Wilson I. (2008). Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.*, **59**, 25-35.
- Ohwaki Y., Kawagishi-Kobayashi M., Wakasa K., Fujihara S., and Yoneyama T. (2005). Induction of class-1 non-symbiotic haemoglobin genes by nitrate, nitrite and nitric oxide in cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 324-331.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L., and Lamattina L. (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.*, **132**, 1241-1248.
- Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M.G., Zago E., Zeier J., Sonjda M., Lamb C., and Delledonne M. (2004). Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell*, **16**, 2785-2794.
- Perazzolli M., Romero-Puertas M.C., and Delledonne M. (2006). Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *J. Exp. Bot.*, **57**, 479-488.
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., and Kaiser W.M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.*, **53**, 103-110.
- Sanchez C., Cabrera J.J., Gates A.J., Bedmar E.J., Richardson D.J., and Delgado M.J. (2011). Nitric oxide detoxification in the rhizobial-legume symbiosis. *Biochem. Soc. Transactions*, **39**, 184-188.
- Shimoda Y., Nagata M., Suzuki A., Abe M., Sato S., Kato T., Tabata S., Higashi S., and Uchiumi T. (2005). Symbiotic rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic haemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.*, **46**, 99-107.
- Stohr C., Strube F., Marx G., Ulrich W.R., and Rocker P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, **212**, 835-841.
- Storh C., and Stremmlau S. (2006). Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J. Exp. Bot.*, **57**, 463-470.
- Tewari R.K., Kim S., Hahn E-J., and Paek K-Y. (2008). Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng*. *Plant Biotech. Rep.*, **2**, 113-122.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque L., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varea P., del Rio L.A., and

- Barroso J.B. (2007). Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.*, **581**, 453-461.
- Vieweg M.F., Hohnjec N., and Kuster H. (2005). Two genes encoding different truncated hemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular mycorrhiza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta*, **5**, 757-766.
- Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P., and Segschneider H.J. (1997). Emission of NO from several higher plant species. *J. Geophys. Res.*, **102**, 5919-5927.
- Xiong J., Fu G., Yang Y., Zhu C., and Tao L. (2012). Tungstate: is it really a specific nitrate reductase inhibitor in plant nitric oxide research? *J. Exp. Bot.*, **63**, 33-41.