

ORIGINAL ARTICLE

**Rhythmical changes of a level nitric oxide (NO) in roots
etiolated seedlings of pea (*Pisum sativum* L.) and
influence of exogenous calcium**

A.K. Glyan'ko, A.A. Ischenko

Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, PO 317, Irkutsk, 664033, Russia

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

Received September 16, 2014

Studied time dynamics (during 60 minutes) a level nitric oxide (NO) in cross cuts of roots 2 – daily etiolated seedlings of pea sowing (*Pisum sativum* L.) by use of fluorescent probe DAF-2DA and a fluorescent microscope depending on action exogenous calcium (Ca^{2+}). During an exposition of seedlings on water, solution CaCl_2 are shown fluctuation in level NO in roots – his increase and decrease that testifies to the certain rhythm in generation NO. Exogenous factors (Ca^{2+}) change time dynamics of level NO in comparison with variant “water”. Ca^{2+} chelate EGTA removes action exogenous calcium on rhythmical change of a level NO in roots. Results are discussed in aspect of close interference of signaling systems and molecules (Ca^{2+} , NO, H_2O_2).

Key words: Pisum sativum L., calcium (Ca^{2+}), calcium chelate (EGTA), fluorescent probe, nitric oxide (NO)

ORIGINAL ARTICLE

Ритмические изменения уровня оксида азота (NO) в корнях этиолированных проростков гороха (*Pisum sativum* L.) и влияние экзогенного кальция

А.К. Глянько, А.А. Ищенко

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, 664033, Иркутск, ул. Лермонтова, 132, Россия

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

Поступила в редакцию 16 Сентября 2014 г.

Изучали временную динамику (в течение 60 мин) уровня оксида азота (NO) в поперечных срезах корней 2-суточных этиолированных проростков гороха посевного (*Pisum sativum* L.) с использованием флуоресцентного зонда DAF-2DA (4,5-диаминофлуоресцеин диацетат) и флуоресцентного микроскопа в зависимости от действия экзогенного кальция (Ca^{2+}). В течение экспозиции проростков на воде и растворе $CaCl_2$ (100 мкМ) показаны флуктуации в уровне NO в корнях – его повышение и снижение, что свидетельствует об определенном ритме в генерации NO. Экзогенный Ca^{2+} изменяет временную динамику уровня NO по сравнению с вариантом «вода». Хелатор Ca^{2+} ЭГТА (этиленгликоль тетрауксусная кислота) нивелирует действие экзогенного кальция на ритмичное изменение уровня NO в корнях. Результаты обсуждаются в аспекте тесного взаимовлияния сигнальных систем и молекул (Ca^{2+} , NO, H_2O_2).

Key words: *Pisum sativum* L., кальций (Ca^{2+}), хелат кальция (ЭГТА), флуоресцентная проба, оксид азота (NO)

Активные формы азота (АФА) включают низкомолекулярные соединения: NO, пероксинитрит ($OONO^-$), N_2O_3 , NO_2^- , NO^- , NO^+ , NO_2^{\cdot} - радикал и др. Роль АФА в процессах взаимодействия сигнальных систем одна из

наименее изученных сторон. При изучении этого вопроса основное внимание уделяется NO – молекуле-радикалу, обладающей широким спектром биологического действия (Dmitriev, 2004). Следует заметить, что NO в растительных тканях

может выполнять роль и метаболита, и сигнальной молекулы и токсичного соединения (Glyan'ko *et al.*, 2009; Meilhos *et al.*, 2011). Как метаболит она может участвовать в посттрансляционной модификации белков (S-нитрозилирование, металлонитрозилирование, тирозиннитрование с OONO⁻); как сигнальная молекула – инициировать экспрессию генов; как токсическое вещество – вызывать совместно с АФК апоптоз клеток. В растениях NO выполняет функцию сигнальной молекулы и одного из важнейших компонентов защитной системы при действии стрессовых факторов (Kolupaev, Karpets, 2009). Анализируя литературные данные, можно прийти к заключению, что биохимическая генерация NO регулируется механизмом(ами), в котором(ых), по-видимому, задействован кальций. Известно, что NO контролирует гомеостаз ионов кальция (Ca²⁺) в клетках организмов (Clementi, 1998) и почти все типы кальциевых каналов и транспортеров регулируются оксидом азота через S-нитрозилирование белков или с участием вторичных мессенджеров NO – циклических ГМФ (сGMP), АДФР (сADPR) и протеинкиназ (ПК) (Besson-Bard *et al.*, 2008). Эндогенные и экзогенные источники NO активируют приток Ca²⁺ в цитоплазму из внеклеточного пространства (Garcia-Mata *et al.*, 2003; Lamotte *et al.*, 2004). С другой стороны, увеличение концентрации цитозольного Ca²⁺ под действием внешних факторов влияет на синтез NO, что ведет к усилению физиолого-биохимических процессов и каскаду сигнальных реакций, сопровождаемых

экспрессией генов. Так, показана активация Ca²⁺-кальмодулинзависимой киназы (CCaMK) ритмичными изменениями концентрации кальция в цитоплазме и органеллах, что сопровождается усилением генерации NO (Courtois *et al.*, 2008). Оксид азота в свою очередь может влиять на кальциевые каналы путем S-нитрозилирования сенсора кальция кальмодулина (CaM), что блокирует приток Ca²⁺ в цитоплазму (Jeandroz *et al.*, 2013). Исходя из этого, можно говорить о перекрестном и взаимном влиянии двух сигнальных соединений на процессы метаболизма, особенно при трансдукции абиотических и биотических сигналов (Jeandroz *et al.*, 2013; Vandelle *et al.*, 2006). Однако механизмы с помощью которых NO модулирует поток Ca²⁺ в клетках до конца непонятны.

В данном случае, речь может идти об автоколебательных процессах в химических реакциях, когда эти колебания включаются в цепь взаимодействий между собой и регулируются, по-видимому, геномом (Detari, Karcagi, 1984). О тесном взаимодействии сигнальных молекул, в частности, Ca²⁺, NO и H₂O₂, в растительных клетках в литературе известно (Jeandroz *et al.*, 2013; Steinhorst, Kudla, 2013). Однако механизмы, управляющие этими взаимодействиями, до конца не выяснены. Наиболее изученными в этом плане являются механизмы колебаний (осцилляций) Ca²⁺ в цитоплазме, образующиеся за счет притока этого элемента из внеклеточного пространства и внутриклеточных органелл и последующим его уменьшением (оттоком) из цитоплазмы (Denisenko,

Kuz'mina, 2013).

В задачу наших исследований входило изучение динамики уровня NO в корнях этиолированных проростков гороха с целью выяснения характера изменений NO в зависимости от экзогенного кальция и оценке генерации NO как автоколебательного процесса, зависящего от других процессов и регулируемого, вероятно, единым механизмом.

MATERIALS AND METHODS

Объектом исследований служили проростки гороха посевного (*Pisum sativum* L.), сорт Ямальский, выращенные в пластмассовых кюветах на влажной фильтровальной бумаге при 22°C. Перед замачиванием семена промывали теплой проточной водой с мылом и обеззараживали 3 % раствором перекиси водорода в течение 15 мин. После этого семена заливали прокипяченной водопроводной водой (60°C) и помещали в термостат для прорастания при 22°C в течение 48 ч. Для исследований отбирали однородные проростки с длиной корней 25-30 мм.

В экспериментах с действием экзогенного кальция опытные проростки экспонировали на растворе CaCl₂ в концентрации 100 мкМ. Обработку проростков кальцием и ЭГТА (100 мкМ) проводили перед началом опыта. Содержание NO в тканях корня определяли с использованием флуоресцентного зонда 4,5-диаминофлуоресцеин диацетата (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). Перед окрашиванием исходные корни прединкубировали на соответствующих варианту опыта средах (H₂O, CaCl₂, CaCl₂+ЭГТА) в течение необходимого времени: 10, 20, 30 и так далее минут. Затем отрезки корней (участки 5 – 15 мм от апекса) инкубировали в среде для окрашивания, содержащей 10 мкМ DAF-2DA и 10 мМ трис-HCl (pH 7.4), в течение 20 мин на качалке, при 26°C. Интенсивность флуоресценции оценивали на поперечных срезах (толщина 100 – 150 мкм) из окрашенных отрезков корней с использованием флуоресцентного микроскопа Axio Observer ZI (Германия) с цифровой монохромной камерой Axio Cam MRm3 и пакетом программного обеспечения для захвата и анализа изображений Axio Vision Rel.4.6. Блок фильтров № 10, длина волны возбуждения 450-490 нм, эмиссия 515-565 нм. Основное флуоресцентное свечение в срезах корней в наших опытах зафиксировано в эпидермальных клетках корня (Glyan'ko, 2013). Результаты анализа срезов корней представлены в относительных единицах интенсивности флуоресцентного свечения, выраженные в % от нулевой точки (0 мин), значение которой принималось за 100%.

Содержание общего кальция в корнях проростков определяли на атомно-абсорбционном спектрометре модели 403 фирмы Perkin Elmer (США) в пламени ацетилен-воздух (Glyan'ko *et al.*, 2013). Результаты представляют собой средние

арифметические с указанием стандартной ошибки из трех независимых экспериментов. Число анализируемых срезов корней при микроскопических исследованиях не менее 10. Достоверность различий средних значений оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel.

RESULTS AND DISCUSSION

На рисунке 1 представлены кривые линии, характеризующие динамику уровня NO в течение 60 мин. В варианте «вода» четко прослеживаются ритмичность флуктуаций в содержании оксида азота: повышение через 10, 30, 50 мин и уменьшение через 20, 40 и 60 мин. Флуктуации в уровне NO наблюдаются и на фоне действия экзогенного источника кальция (100 мкМ CaCl₂) (рис. 1). Однако временная зависимость флуктуаций уровня NO в этом случае иная: повышение уровня оксида азота через 20, 40, 60 мин, снижение – через 10, 30, 50 минут. Таким образом, экзогенный кальций влияет на содержание оксида азота, изменяя временную амплитуду его синтеза и сохраняя ритмичность флуктуаций. Надо полагать, что подобное влияние экзогенного кальция связано с увеличением апопластного и внутриклеточного Ca²⁺. Об этом косвенно можно судить по содержанию общего кальция в корнях проростков спустя 60 мин. после начала экспозиции. Так, содержание общего кальция в корнях с 860±36 мкг/г сухого вещества в контроле увеличивается до 1043±28 мг/г сухого вещества в варианте с экзогенным Ca²⁺, что, по-

видимому, может служить объяснением характера динамики флуктуаций NO в варианте с экзогенным кальцием. Опыт с экспозицией проростков на растворе CaCl₂ + ЭГТА свидетельствует о нивелировании влияния экзогенного кальция на флуктуации уровня NO (рис. 1). Это, по-видимому, можно объяснить связыванием внеклеточного кальция ЭГТА.

Общий вывод, который можно сделать из полученных результатов состоит в том, что в краткосрочных опытах обнаружены ритмичные изменения уровня оксида азота и влияние на эти флуктуации ионов кальция. Можно предположить, что активация Ca²⁺-каналов и стимуляция поступления ионов Ca²⁺ в цитоплазму оказывает влияние на генерацию NO. Однако здесь необходимо заметить, что вопрос о путях синтеза NO в растениях остается до настоящего времени до конца нерешенным. С одной стороны бесспорно признается путь синтеза NO с участием цитозольной нитратредуктазы (НР), но функциональная связь между ионами кальция и активностью НР остается под вопросом (Courtois *et al.*, 2008). Второй путь синтеза NO, связанный с использованием в качестве субстрата L-аргинина, подтвержден многочисленными исследованиями [Besson-Bard *et al.*, 2008; Glyan'ko, 2013], но не доказан присутствием в растениях фермента идентичного NO-синтазе (NOS) млекопитающих, катализирующей окислительную реакцию синтеза NO из L-аргинина в животных клетках. Что же касается взаимосвязи между Ca²⁺ и генерацией NO по аргинин-зависимому пути, то имеются

данные о необходимости ионов кальция в реакции, катализируемой предполагаемой растительной NO-синтазой (Vandelle *et al.*, 2006). Зависимость активности конститутивной изоформы cNOS млекопитающих от кальмодулина и ионов Ca^{2+} (Bogdan, 2001) подтверждена также и в опытах с различными видами растений (Corpas *et al.*, 2006). Предполагаются и другие источники генерации NO – с участием гидроксилamina, полиаминов, ксантиноксидоредуктазы, неэнзиматического пути и, возможно, другие (Freschi, 2013). Множество путей синтеза NO в растениях затрудняет определение основного из них. Можно предположить, что это будет зависеть от мест их локализации в клетках, тканях, органах. По данным Glyan'ko (2013) в этиолированных проростках гороха функционируют как NP-путь синтеза NO, так и L- аргинин зависимый путь.

NO играет специфическую роль в регуляции Ca^{2+} -гомеостаза путем модуляции активности Ca^{2+} -каналов как на плазмалемме, так и на мембранах внутриклеточных органелл (Besson-Bard *et al.*, 2008). Так, показана активация Ca^{2+} -кальмодулинзависимой киназы (CCaMK) изменениями концентрации кальция в цитоплазме и органеллах, что сопровождается усилением генерации NO (Courtois *et al.*, 2008). Оксид азота в свою очередь может блокировать приток Ca^{2+} в цитоплазму через кальциевые каналы путем S-нитрозилирования сенсора кальция кальмодулина (CaM) (Jeandroz *et al.*, 2013). Исходя из этого, можно говорить о перекрестном и взаимном влиянии двух сигнальных соединений на процессы

метаболизма, особенно при трансдукции абиотических и биотических сигналов (Vandelle *et al.*, 2006; Kolupaev, 2007; Besson-Bard *et al.*, 2008a).

Накопление цитозольного NO будет вести к стимуляции процессов, оказывающих влияние на гомеостаз Ca^{2+} во внутриклеточных органеллах путем создания в цитоплазме кальциевых волн (осцилляций), составляющих звенья в трансдукции информации в геном (Medvedev, 2010; Jeandroz *et al.*, 2013). Кальциевые волны осуществляются за счет мембранного транспорта, Ca^{2+} -АТФаз, киназ, белков-сенсоров (Tarchevsky, 2002). Действие NO на генерацию АФК, которые влияют на Ca^{2+} -каналы, может проявляться в ингибировании активности НАДФН-оксидазы за счет S-нитрозилирования цистеина (Cys890) фермента (Yun *et al.*, 2011).

Необходимо отметить роль АФК ($O_2^{\cdot-}$, H_2O_2), основными продуцентами которых являются мембранная НАДФН-оксидаза и апопластная супероксиддисмутаза (Marino *et al.*, 2012). АФК оказывают влияние, как и NO, на проницаемость Ca^{2+} -каналов, связывают оксид азота с образованием пероксинитрита ($OONO^-$), образуют положительную обратную связь по регуляции НАДФН-оксидазы путем фосфорилирования фермента (Kimura *et al.*, 2012). О волновой природе функционирования АФК (H_2O_2) в растительных клетках сообщается в ряде работ, в которых доказывается наличие в клетках арабидопсиса АФК-волн, выполняющих функцию системного сигнала на длинные дистанции,

связанного с формированием системной устойчивости к действию стрессоров (Miller *et al.*, 2009; Mittler *et al.*, 2011). И главную роль в этих процессах играет НАДФН-оксидаза (RbohD oxidase) – генератор АФК, активность которой связана с Ca^{2+} -сигналингом и Ca^{2+} -регулируемыми киназами (Steinhorst, Kudla, 2013). Показаны колебания в активности микросомальной НАДФН-оксидазы этиолированных проростков гороха, что может влиять на уровень генерации АФК (Glyan'ko, Ischenko, 2013).

Флуктуации NO могут поддерживаться за счет связывания этой молекулы «NO-мишенями», к которым, в частности, относятся несимбиотический гемоглобин и нитрозоглутатион (GSNO) (Besson-Bard *et al.*, 2008; Sanchez *et al.*, 2011). GSNO является внутриклеточным резервуаром NO и может спонтанно освобождать оксид азота и выполнять роль проводника NO между клетками (Neill *et al.*, 2008).

Все эти процессы ведут к формированию NO-волн, которые оказывают влияние на выход Ca^{2+} из внутриклеточных органелл (вакуолей, ядра и др.) в цитоплазму и на обратный процесс. Наличие в клетке многочисленных « Ca^{2+} -мишеней» создает условия для уменьшения концентрации этого элемента в цитоплазме и формированию кальциевых осцилляций, которые наряду с NO-волнами, инициируют экспрессию ядерных генов. Эти процессы осуществляются за счет различных процессов (Medvedev, 2010). Особую роль в этом выполняют кальмодулин (CaM) и протеинкиназы, зависящие от Ca^{2+} и осуществляющие

фосфорилирование белков – факторов регуляции транскрипции (Steinhorst, Kudla, 2013; Tarchevsky, 2002).

Необходимо отметить, что существенным компонентом сигнальных систем являются Ca^{2+} -спайки (calcium spiking), образующие в результате флуктуаций в концентрации кальция. Ca^{2+} -спайки локализуются в околядерном пространстве и формируются с участием белков ионных каналов (CASTOR, POLLUX), нуклеопоринов (NUP85, NUP133) и связаны с осцилляциями кальция в нуклеоплазме (Oldroyd, Downie, 2008). Они, в частности, активируют кальций-зависимую кальмодулинкиназу (CCaMK) и далее рецептор цитокинина – гистидинкиназу (LjHK1, MtCRE1), что инициирует процесс деления клеток. В то же время действие цитокинина тесно связано с NO (Freschi, 2013).

Эндогенный ритм генерации NO в корнях, по всей вероятности, свидетельствует о наличии в клетках механизма, регулирующего как образование NO, так и АФК. Это подтверждается данными литературы о том, что в ответ на различные факторы генерация NO и АФК в клетках происходит одновременно и изменения в концентрации одного из компонентов оказывает влияние на уровень другого (Neill *et al.*, 2008). Подобный механизм, очевидно, связан с гомеостазом ионов Ca^{2+} , выражающийся в пульсирующем изменении концентрации этого иона в цитоплазме (Ca^{2+} -волны). В последнее время это явление в литературе обозначается термином « Ca^{2+} -сигнатура» (calcium signatures),

которое характеризует флуктуации в концентрации внутриклеточного кальция по таким параметрам как: амплитуда, частота, продолжительность пульсов (Whalley, Knight, 2013). Показано влияние АФК (H_2O_2) на синтез NO с участием НР у проростков арабидопсиса (Wang *et al.*, 2010).

Таким образом, из вышеизложенного можно сделать вывод об определенном ритме в изменении уровня NO в клетках проростков гороха

и о тесном взаимодействии Ca^{2+} , NO и АФК – как компонентов сигнальных систем растения, функционирование которых регулируется, вероятно, сходным(и) механизмом(ами). В этой связи предстоит выяснить механизм действия кальция и его влияние на перекрестное взаимодействие других сигнальных молекул, в частности, NO и H_2O_2 . Все эти механизмы, по-видимому, инициируются действием внешних факторов.

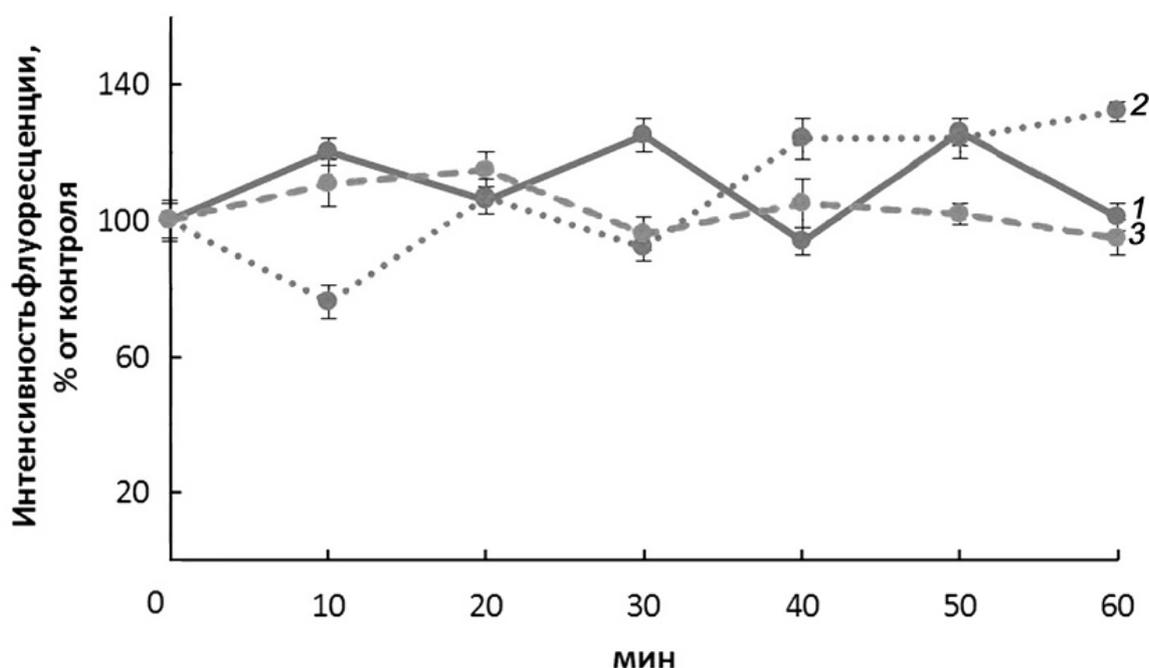


Рисунок 1. Рис. Динамика интенсивности флуоресценции в корнях этиолированных проростков гороха на фоне воды, экзогенного кальция и ЭГТА.

1 - вода; 2 - 100 мкМ $CaCl_2$; 3 - 100 мкМ $CaCl_2$ + 100 мкМ ЭГТА

ACKNOWLEDGMENT

Авторы выражают благодарность А.В. Степанову, Г.Г. Васильевой за помощь в проведении исследований.

REFERENCES

Besson-Bard A., Pugin A. and Wendehenne D. (2008)

New insights into nitric oxide signaling in plants.

Annu. Rev. Plant Biol., **59**, 21-39.

Besson-Bard A., Courtois C., Gauthier A., Dahan J., Dobrowolska G., Jeandroz S., Pugin A. and Wendehenne D. (2008a) Nitric oxide in plants production and cross-talk with Ca^{2+} signaling. *Mol.*

- Plant*, **1**, 218-228.
- Bogdan C. (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends Cell Biol.*, **11**, 66-75.
- Clementi E. (1998) Role of nitric oxide and its intracellular signaling pathways in the control of Ca^{2+} homeostasis. *Biochem. Pharmacol.*, **55**, 713-718.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Leon A.V., Sandalio L.M. and del Rio L.A. (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, **224**, 246-254.
- Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A. and Wendehenne D. J. (2008) Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca^{2+} and protein kinases. *Exp. Bot.*, **59**, 155-163.
- Denisenko V.Yu. and Kuz'mina T.I. (2013) On the problem of identification of intracellular signaling pathways. *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 431-433.
- Detari L. and Karcagi V. (1984) *Biorhythms* (Ed. V.B. Chernyshov). M.: Mir Press, 160 p.
- Dmitriev A.P. (2004) The signaling role of nitric oxide in plants. *Cytol. Genet. (Ukraine)*, **38**, 67-75.
- Freschi L. (2013) Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Front. Plant Sci.*, **4**, Article 398.
- Garcia-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L. and Blatt M.R. (2003) Nitric oxide regulates K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11116-11121.
- Glyan'ko A.K., Mitanova N.B. and Stepanov A.V. (2010) The physiological role of nitric oxide (NO) in plants. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, **1** (19), 6-20.
- Glyan'ko A.K. and Ischenko A.A. (2013) Influence of rhizobial inoculation and calcium ions on the NADPH oxidase activity in roots of etiolated pea seedlings. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **49**, 215-219.
- Glyan'ko A.K. (2013) Initiation of nitric oxide (NO) synthesis in roots of etiolated seedlings of pea (*Pisum sativum* L.) under the influence of nitrogen-containing compounds. *Biochemistry (Moscow)*, **78**, 471-476.
- Glyan'ko A.K., Ischenko A.A., Stepanov A.V., Vasil'eva G.G. and Projdakova O.A. (2013) Dynamics of synthesis nitric oxide (NO) in roots etiolated seedlings of pea (*Pisum sativum* L.). *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, **3** (30), 32-38.
- Jeandroz S., Lamotte O., Astier J., Rasul S., Trapet P., Besson-Bard A., Bourque S., Nicolas-Frances V., Berkowitz G.A. and Wendehenne D. (2013) There's more to the picture than meets the eye: nitric oxide cross talk with Ca^{2+} signaling. *Plant Physiol.*, **163**, 459-470.
- Kimura S., Kaya H., Kawarazaki T., Hiraoka G., Senzaki E., Michikawa M., Kuchitsu K. (2012) 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 Ca²⁺ and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, **1823**, 398-405.
- Kolupaev Yu.Ye. and Karpets Yu.V. (2009) Participation of nitrogen oxide (NO) in transduction of abiotic stressors signals in plants. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, **3** (18), 6-19.
- Kolupaev Yu. Ye. (2007) Calcium and stress reactions of plants. *The Bulletin of Kharkiv National Agrarian University. Series Biology*, **3** (10), 24-41.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A., Mori I.C. and Schroeder J.I. (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.*, **135**, 516-529.
- Marino D., Dunand C., Puppo A. and Pauly N. (2012) A burst of plant NADPH oxidase. *Trends Plant Sci.*, **17**, 9-15.
- Meilhoc E., Boscan A., Bruand C., Puppo A. and Brouquisse R. (2011) Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Sci.*, **181**, 573-581.
- Medvedev C.C. (2010) *Calcium signaling systems*. In: Signaling in cells (Ed. A.N. Grechkin). Kazan: FEN Press, pp. 26-36.
- Miller G., Schlauch K., Tam R., Cortes D., Torres M.A., Shulaev V., Dangi J.L. and Mittler R. (2009) The plant NADPH oxidase RBohD mediates rapid systemic in response to diverse stimuli. *Sci. Signal.*, **2(84)**, ra 45.
- Mittler R., Vanderauwera S., Suzuki N., Miller G., Tognetti V.B., Vandepoele K., Gollery M., Shulaev V. and Van Breusegem F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.*, **16**, 300-309.
- Nakatsubo A., Kojimaa H., Kikuchia K., Nagoshib H., Maedaa D., Imaia Y., Irimuraa T., Naganoa T. (1998) Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. *FEBS Letters*, **427**, 263-266.
- 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.
- Oldroyd G.E.D. and Downie J.A. (2008) Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **59**, 519-546.
- Sanchez C., Cabrera J.J., Gates A., Bedmar E.J., Richardson D.J. and Delgado M.J. (2011) Nitric oxide detoxification in the rhizobium-legume symbiosis. *Biochem. Soc. Transactions*, **39**, 184-188.
- Steinhorst L. and Kudla J. (2013) Calcium and reactive oxygen species rule the waves of signaling. *Plant Physiol.*, **163**, 471-485.
- Tarchevsky I.A. (2002) *Plant cell signaling systems* (Ed. A.N. Grechkin). M: Nauka, 294 p.
- Vandelle E., Poinsson B., Wendehenne D., Bentejac M. and Pugin A. (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses // *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **19**, 429-440.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D. and Song C.- P. (2010)

- Hydrogen peroxide – mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **22**, 2981-2998.
- Whalley H.J. and Knight M.R. (2013) Calcium signatures are decoded by plants to give specific gene responses. *New Phytol.* **197**, 690-693.
- Yun B.W., Feechan A., Yin M., Saidi N.B., Le Bihan T., Yu M., Moore J.W., Kang J.G., Kwon E., Spoel S.H., Pallas J.A. and Loake G.J. (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature*, **478**, 264-268.