

УДК 581.1

## НИТРАТНЫЙ СИГНАЛИНГ В РАСТЕНИЯХ. ЭВОЛЮЦИОННЫЕ АСПЕКТЫ

© 2022 г. А. В. Никитин<sup>а</sup>, \*, С. Ф. Измайлов<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: nitrogenexchange@mail.ru

Поступила в редакцию 11.02.2021 г.

После доработки 15.04.2021 г.

Принята к публикации 17.04.2021 г.

В сопряжении с распознаванием (сенсинг) и транспортом рассматриваются сигнальные свойства нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ) у видов, различающихся в эволюционно-таксономическом отношении, от примитивных прокариот до цветковых растений. На основании сравнительно-физиологического анализа авторы делают предположения о некоторых путях филогенетического становления сигнальных каскадов, запускаемых указанным ионом. Возможно, нитрат возник на Земле еще в катархее при анаэробном характере первичной атмосферы. Далее появился кислородный фотосинтез, создав предпосылки для нитрификации как главного источника  $\text{NO}_3^-$ . Возрастающий градиент уровней нитрата в среде способствовал созданию полиморфизма его низко- и высокоаффинных сенсоров и транспортеров. Система сенсинга и сигналинга нитрата от прокариот была унаследована эукариотами, получив у них дальнейшее развитие. У цветковых растений налицо становление новых регуляторных механизмов, определяющих возможность тонкой настройки сенсинга и поглощения разных доз  $\text{NO}_3^-$  с участием транспортеров соответствующего сродства. В зависимости от органно-тканевой локализации данного иона расширяется спектр его сенсоров, что определяет метаболическую направленность основных функций растений, связанную с усвоением азота, фотосинтезом, ростовыми и продукционными процессами.

**Ключевые слова:** сенсинг нитрата, нитратный сигналинг, растения, грибы, прокариоты, биогеохимическая и молекулярная эволюция

**DOI:** 10.31857/S0015330322010158

### ВВЕДЕНИЕ

Обзор является логическим продолжением серии наших предшествующих публикаций, посвященных создающемуся за последние десятилетия новому разделу физиологии и биохимии – нитратному сигналингу. В предшествующих обзорах [1, 2] освещались вопросы, относящиеся к возникновению исследований в этой области как следствию создания новых инструментальных возможностей в ряде смежных биологических дисциплин на рубеже XX–XXI веков. Подводились итоги результатам первых изысканий по идентификации путей сенсинга и транспорта нитрата в связи с дальнейшей каскадной природой сигналинга азотного, углеродного, вторичного обмена, а также механизмов ее реализации. В данном обзоре рассматривается процесс эволюции нитратного сигналинга как явления, начиная от его формирования с последующей модификацией и усложнением. Используемый сравнительно-физиологический подход позволяет не только

рассмотреть филогенетическое развитие механизмов регуляторного действия нитрата, но и его современный результат – полиморфизм проявлений на организменном уровне.

### ПРЕДПОСЫЛКИ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В КАТАРХЕЕ

Бытует представление, что нитрат ( $\text{NO}_3^-$ ) практически полностью представляет собой продукт биогенной нитрификации. Это обстоятельство, а также гипотеза об анаэробном характере первичной атмосферы, позволили предположить, что азот в добиологический катархейский эон – 4.5–4.0 млрд. лет назад (далее млрд. л. н.) был в восстановленных формах, таких как аммоний и цианид. Однако уже тогда, по-видимому, происходил электрохимический синтез нитрата с участием  $\text{CO}_2$  как донора кислорода [3–5]. Ввиду фотолитического восстановления двухвалентным железом

вероятная концентрация нитрата при pH 6–8 и температуре 0–50°C была не более 1 мкМ [3, 5].

Однако существует и другая точка зрения. Уже в самом начале существования географической оболочки Земли было возможно и локальное обогащение среды нитратом до концентрации 10–20 мМ [3, 4]. В частности, оно могло иметь место в дождевой воде, вследствие образования при грозовых разрядах оксидов азота и их дальнейшей реакции с капельно-жидкой водой в облаках. С учетом того, что в круг продуктов первичного электросинтеза наряду с органическими веществами входил и нитрат, было весьма вероятно совместное их накопление, в силу чего указанный ион оказался своего рода маркером гидрохимической обстановки, необходимой для абιοгенеза. Отсюда и следствие — возможность появления первичных реакций сенсинга нитрата уже у ранних организмов как адаптации к поиску абιοгенных органических соединений.

## СТАНОВЛЕНИЕ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В АРХЕЕ

### *Изменение окружающей среды*

В архее (4.0–2.5 млрд. л. н.) началось активное преобразование среды обитания прокариотами. Не позднее 3.2 млрд. л. н. появились цианобактерии с оксигенным фотосинтезом, их колонии на поверхности биогенных карбонатных построек — строматолитов стали первыми аэробными оазисами [6]. 2.7 млрд. л. н. последние распространились по всему шельфу [7]. Уже в самых древних образцах строматолитов выявлены следы активности диазотрофов, нитрификаторов и денитрификаторов, совместно реализующих замкнутый цикл азота современного типа [8–10]. Вероятно, соответствующие прокариоты находились в разных слоях бактериальных матов, различающихся по уровню кислорода и, соответственно, нитрата. Иными словами, последний был маркером аэробной микросреды. Однако, как отражено на рис. 1а, на протяжении всего архейского эона основная часть Мирового океана оставалась анаэробной, что обусловило преобладание аммонийной формы азота.

Вышеописанные особенности архейских биогеоценозов определили возможность дифференцированного сенсинга нитрата в низких (микромольных) и высоких (миллимолярных) концентрациях, начиная с наиболее ранних этапов биологической эволюции. Весьма вероятно, что связь определенных диапазонов уровня указанного иона с микроусловиями среды, оптимальными для конкретных групп прокариот, стала движущей силой эволюционного становления первичных каскадов нитратного сигналинга.

### *Сенсинг и поглощение нитрата прокариотами*

Активные исследования сенсинга нитрата бактериями имели место уже в конце 1980-х гг., что было связано со сравнительной легкостью работы с указанными объектами. Так, у *Escherichia coli* были выявлены рецепторные гистидиновые протеинкиназы NarX, NtrB и NarQ [11, 12]. У других протеобактерий обнаружены Nar-белки одного типа — NarX или NarQ [13]. Показана способность названных сенсоров нитрата к автофосфорилированию в его присутствии [12].

У ряда прокариот найдены высокоаффинные сенсоры и транспортеры нитрата: NreA (константа диссоциации соответствующего комплекса  $K_D$  22 мкМ) *Staphylococcus carnosus* Schliefer & Fischer [14] и NrtB ( $K_M$  порядка 1 мкМ) *Synechococcus* sp. PCC7942 [15], одной из наиболее примитивных цианобактерий [16], соответственно. Такие белки могли быть унаследованы от видов первичной биосферы, где указанный ион находился преимущественно в следовых количествах. Свидетельством в пользу трансцепторной природы цианобактериального NrtB является то, что у *Anabaena* sp. он ассоциирован с фактором транскрипции NtrC [17].

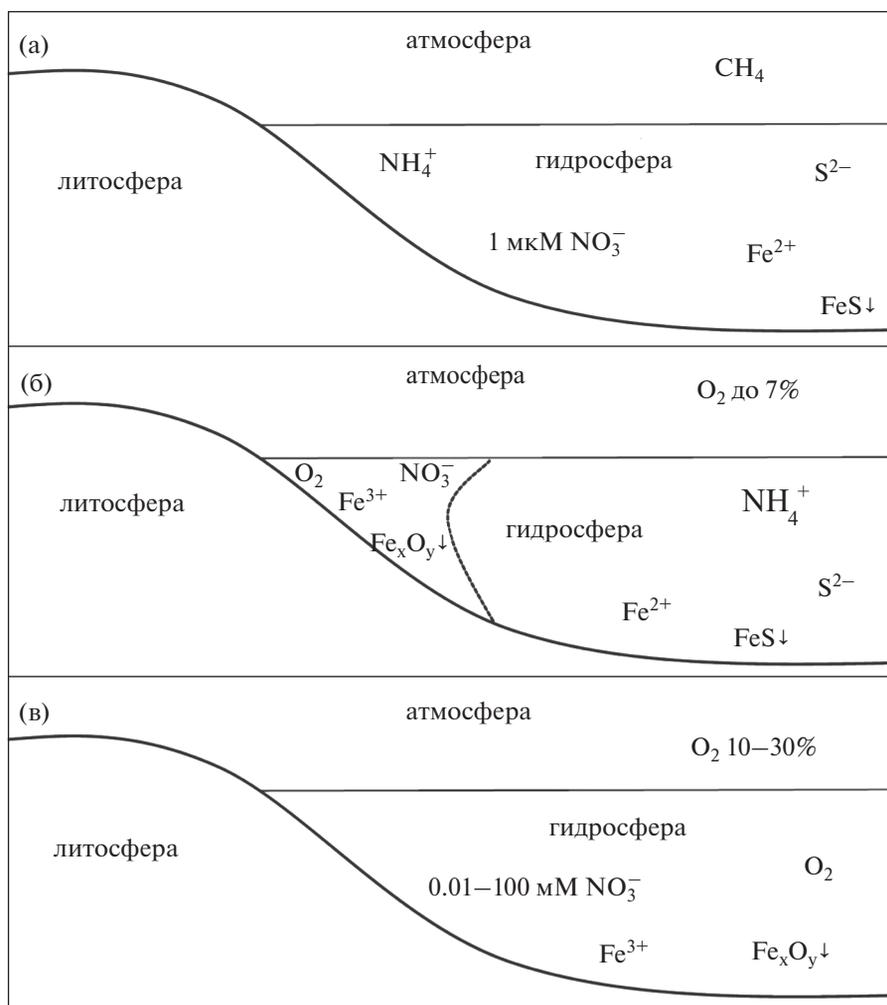
У прокариот выявлены и низкоаффинные транспортеры нитрата, например, NrtS ( $K_M$  2.5 мМ) *Synechococcus elongatus* [18]. Его гомологи найдены у цианобактерий, протеобактерий и актинобактерий и, по-видимому, унаследованы от видов кислородных оазисов, став адаптивным преимуществом указанных групп в аэробной среде.

Сродство белков NrtS к нитрату у ряда видов сравнительно высокое ( $K_M$  0.49 мМ,  $\gamma$ -протеобактерия *Marinomonas mediterranea*) [18], что может быть как примитивным признаком, так и поздней адаптацией к олиготрофным экотопам. У филогенетически продвинутого штамма *Synechococcus* sp. PCC 7002 [16] обнаружены два близких между собой транспортера нитрата низкого сродства — NrtS1 и NrtS2 ( $K_M > 3$  мМ), гетеромерный комплекс которых имеет высокое сродство к субстрату ( $K_M$  0.15 мМ) [18].

### *Трансдукция нитратного сигнала у прокариот*

К концу 1980-х гг. уже было известно, что запускаемые нитратом двухкомпонентные прокариотические каскады трансдукции сигнала состоят из рецепторной гистидинкиназы и фосфорилируемого ей фактора транскрипции [11]. У *E. coli* последний представлен двумя белками — NarL и NtrC [11]. У других протеобактерий обнаружено лишь по одному модулю трансдукции нитратного сигнала — NarX-NarL или NarQ-NarP [13].

Фосфорилированный NarL индуцировал ряд белков, задействованных в “нитратном дыхании” — формиаатдегидрогеназу (*fdnG*), диссимиляторную



**Рис. 1.** Геохимия нитрата в основные эоны геологической истории: а – архей, б – протерозой, в – фанерозой. Вертикальными стрелками обозначено отложение пирита ( $\text{FeS}$ ) и оксидов железа ( $\text{Fe}_x\text{O}_y$ ).

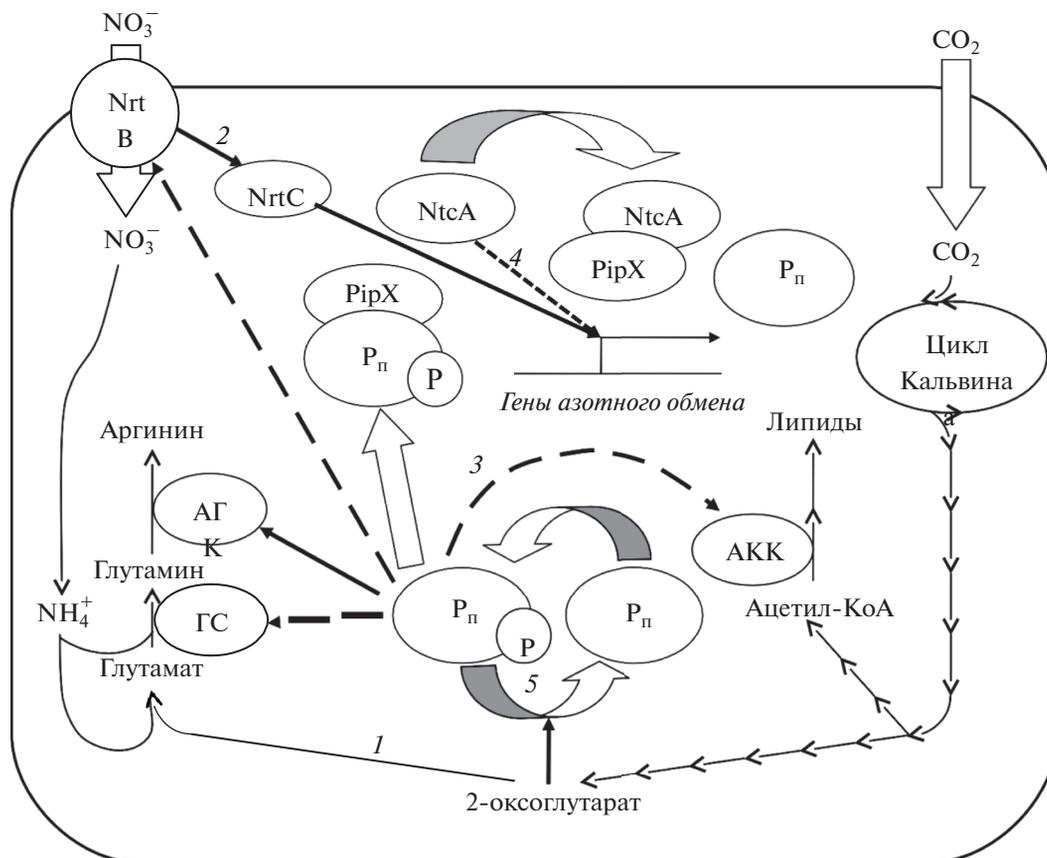
нитратредуктазу (*narG*) у *E. coli* [19] и *Mycobacterium tuberculosis* [20], экспортер нитрата (*narK*), фумаратредуктазу (*frdA*) *E. coli* [21], периплазматическую нитратредуктазу (*napF*) *Haemophilus influenzae* Rd и *E. coli* [22]. У *Klebsiella pneumoniae* M5al NarL индуцировал респираторную, но не ассимиляторную нитратредуктазу [23], что подтверждает связь сигнального действия нитрата с использованием последнего как донора кислорода.

Одна из прокариотических систем совместного сигналинга нитрата и кислорода, сложившаяся как механизм выбора доступного акцептора электронов, исследована у *S. carnosus* и представляет собой комплекс Nre-белков, включающий вышеупомянутый рецептор NreA,  $\text{O}_2$ -сенсорную протеинкиназу NreB и фактор транскрипции NreC [14]. При сочетании нитрата с аноксией у *S. carnosus* индуцируются плазмалеммная нитратредуктаза, транспортеры нитрата и нитрита, цитозольная нитритредуктаза, участвующие в “нитратном ды-

хании”. Ввиду высокой чувствительности NreA к нитрату можно предположить, что *S. carnosus* способен использовать указанный ион как окислитель уже в микромолярных концентрациях, которые имели место в архейский период.

Вышеописанные сигнальные каскады задействованы, в первую очередь, во включении “нитратного дыхания” у факультативно анаэробных прокариот. Такая особенность согласуется с предположением, что в условиях исходных архейских биогеоценозов именно нитрат как акцептор электронов мог мигрировать на сравнительно далекие расстояния, а кислород расходовался еще в пределах бактериальных матов, сформированных с участием цианобактерий.

У примитивной цианобактерии – *Synechococcus* WH5701 описан типичный для всего отдела каскад C/N-сигналинга, включающий белки P<sub>II</sub>, NtcA и PipX [24]. Первый из них является цитозольным сенсором отношения АТФ/АДФ, а так-



**Рис. 2.** Ключевые звенья C- и N-сигналинга у цианобактерий. АГК – N-ацетилглутаматкиназа, АКК – ацетил-КоА-карбоксилаза, ГС – глутаминсинтетаза. Международные обозначения: NrtB – транспортер нитрата, NrtC – белок, взаимодействующий с предыдущим, NtcA – фактор транскрипции генов азотного обмена, P – фосфат, PipX – коактиватор транскрипции генов азотного обмена. Стрелки: 1 – метаболические пути, 2 – позитивное сигнальное действие, 3 – негативное сигнальное действие, 4 – подавленное в отсутствие активного комплекса с PipX действие фактора транскрипции NtcA, 5 – переходы между возможными состояниями регуляторных молекул.

же C-акцептора аммиака – 2-оксоглутарата. При достаточном уровне энергии и углерода P<sub>II</sub> дефосфорилируется, что приводит к диссоциации его комплекса с PipX. Последний активирует фактор транскрипции NtcA, который индуцирует нитрат- и нитритредуктазу [24], а у *Anabaena* PCC7120 и глутаминсинтетазу (*glnA*) [25]. В результате интенсифицируются восстановление нитрата и ассимиляция аммония. Напротив, фосфорилированный P<sub>II</sub> активирует N-ацетилглутаматкиназу (ключевой фермент синтеза аргинина) и ингибирует транспортеры нитрата [26], вызывая переход от поглощения к депонированию азота. Описанная регуляторная система характерна для цианобактерий [26]. Соответствующие представления отражены на рис. 2.

У нефотосинтезирующих прокариот при дефиците 2-оксоглутарата фосфорилированный P<sub>II</sub> активирует глюкозамин-6-фосфатдеаминазу, но ингибирует ацетил-КоА-карбоксилазу (ключевой фермент синтеза липидов), транспортеры нитрата и аммония, глутаминсинтетазу, а также

фактор транскрипции генов азотного обмена GlnR [26]. В результате происходит эффективное использование органических источников азота и углерода. Налицо архаичный сигнальный каскад, позволяющий клетке определить, какой из макроэлементов – углерод или азот – находится в минимуме, и переключить метаболизм на преимущественную утилизацию дефицитного ресурса. Сохранение такого рода “молекулярной машины” до наших дней свидетельствует в пользу ее эффективности в постоянно меняющейся на протяжении геологической истории окружающей среде.

Отметим, что активность белков P<sub>II</sub> у *Proteobacteria* и *Actinobacteria* регулируется посредством уридинилирования и аденилирования, соответственно, а не фосфорилирования, характерного именно для *Cyanobacteria* [27].

У *E. coli* и ряда других протеобактерий [28], а также цианобактерии *Anabaena* sp. [17] мишенью P<sub>II</sub> является вышеназванный рецептор нитрата NtrB. У *Rhodobacter capsulatus* появилась дополни-

тельная гистидинкиназа NtrY, способная фосфорилировать два фактора транскрипции – NtrC и NtrX [28]. У *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 выявлены независимые каскады передачи сигнала о наличии азота в среде – NtrB-NtrC и NtrY-NtrX, причем последний индуцирует рецептор нитрата NarX и соответствующий фактор транскрипции NarL [29]. Такая многоплановость регуляции становится понятной исходя из того, что *H. seropedicae* – диазотроф. Сенсинг низкого C/N-баланса с участием как NtrB, NtrY, так и P<sub>II</sub>-белков приводит к репрессии генов, задействованных в азотфиксации, после чего индуцируемый в таких условиях сенсор NarX определяет адаптацию метаболизма бактерий к утилизации собственно нитрата.

По-видимому, уже у ранних прокариот наряду с нитратным сложился и сигналинг монооксида азота. При этом основным его источником является не нитрат, а аргинин – субстрат NO-синтазы [30]. Сенсинг оксида азота в клетках прокариот, по-видимому, осуществляется с участием связывающего его и кислород гемопротеида, а сигналинг – ассоциированного с последним ц-ди-ГМФ-расщепляющего фермента [31]. Аналогично, по крайней мере, у *Burkholderia pseudomallei* 1026b нитрат с участием фактора транскрипции NarL индуцировал ц-ди-ГМФ-фосфодиэстеразу (*cdpA*), тем самым снижая уровень вторичного мессенджера – ц-ди-ГМФ [32]. Конечным эффектом и нитрата, и оксида азота было подавление образования биопленок и/или их распад на отдельные клетки. Такой параллелизм может быть связан с тем, что биопленки – универсальная адаптация прокариот к азотному голоданию, связанная с их межклеточной кооперацией. Этот вопрос еще требует своего экспериментального изучения.

Как видно из вышеизложенного, в ранней эволюции прокариот, происходившей в условиях преобладания аноксии, происходила адаптация к использованию нитрата как окислителя, распространяющегося за пределы аэробных сообществ. Тем не менее, уже тогда появились приспособления к утилизации указанного иона и как основного источника азота. Среди них: высоко- и низкоаффинные сенсоры – трансцепторы нитрата, возможность регуляции их сродства к иону, способность указанных белков к автофосфорилированию, активация факторов транскрипции путем фосфорилирования последних. Соответственно, в процессе эволюции произошла специализация с дополнением C/N-сигналинга собственно нитратным.

## РАЗВИТИЕ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В ПРОТЕРОЗОЕ

### *Изменение окружающей среды*

Как отображено на рис. 16, в протерозое (2.5–0.54 млрд. л. н.) уровень свободного кислорода

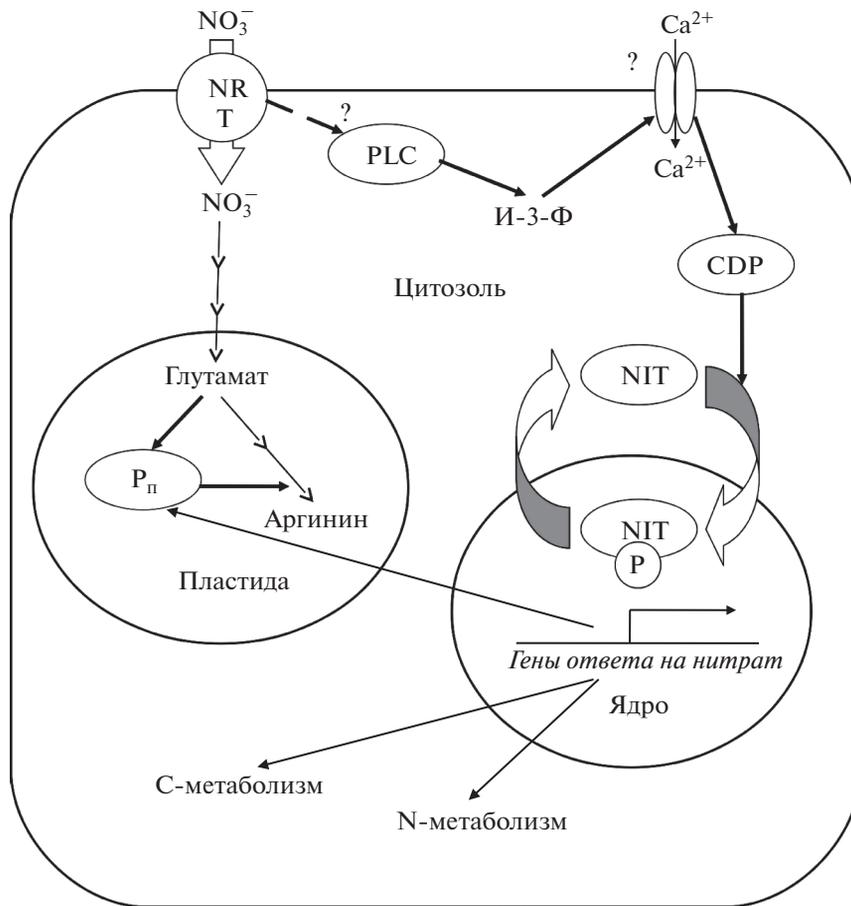
в атмосфере достиг 7% [33]. Одной из причин этого было освоение цианобактериями новых экологических ниш. Так, уже в самом начале протерозоя произошел переход от пленок к матам из нитевидных колоний [16]. В период 1.6–1.0 млрд. л. н. сложились как экологическая группа планктонные цианобактерии [34]. Также произошло накопление связанного азота в среде, что отражено в увеличении концентрации указанного макроэлемента в протерозойских осадочных породах в 3.8 раз [35]. В планетарном масштабе распространился биогеохимический цикл азота современного типа, включающий нитрификацию [36].

Отметим, что 2.2 млрд. л. н. вследствие уменьшения пула атмосферного CO<sub>2</sub> уменьшилась электрохимическая наработка оксидов азота, что увеличило значение азотфиксации [37]. Кроме того, 0.85–0.64 млрд. л. н. повысилась биодоступность молибдена и ванадия, что обеспечило нитратредуктазу необходимыми кофакторами [38]. В результате сложились условия для биологического прогресса диазотрофов [38].

### *Эволюция прокариот*

Изученным в молекулярно-биологическом аспекте примером эволюционно продвинутых цианобактерий, отличающихся такими инновациями, как нитчатые колонии и гетероцисты, является *Anabaena* [39]. Для нее характерна регуляция экспрессии нитрат- и нитритредуктазы не только C/N-балансом, но и самим нитратом с участием уже двух факторов транскрипции – NtcA и NtcB [17]. Вероятно, это позволяет дифференцировать реакции клетки на уровни указанного иона. У представителей рода найдены типичные для всего отдела транспортеры и сенсоры нитрата, распространенные выше – NrtB [17].

В связи с накоплением свободного кислорода в среде цианобактерии приобрели различные варианты пространственно-временного разграничения оксигенного фотосинтеза и анаэробной диазотрофии [38, 39]. В частности, сформировался специальный тип азотфиксирующих клеток – гетероцисты. Их адаптивными особенностями являются: многослойная оболочка с низкой проницаемостью для кислорода, отсутствие процесса фотосинтеза и наличие интенсивного дыхания. В связи с появлением гетероцист расширилось разнообразие мишеней тех факторов транскрипции, что ранее регулировали лишь использование связанного азота. Так, белок NtcA стал индуцировать *hetR* (запуск формирования гетероцист), *nifH* (редуктаза динитрогеназы), *gor* (глутатионредуктаза) и репрессировать *rbcLS* (фотосинтез). У мутантов *ntcA* нарушалось усвоение как нитратного, так и молекулярного азота [26]. С другой стороны, у цианобактерий *Calothrix rhizosoleniae* SC01 и *Richelia intracellularis* HN01, имеющих гетероци-



**Рис. 3.** Предполагаемая схема нитратного сигналинга у зеленых водорослей. CDPK – кальцийзависимые протеинкиназы, NIT – специфичный для водорослей фактор транскрипции генов, регулируемых нитратом, NRT – трансцепторы нитрата, PLC – фосфолипаза С, P – фосфат, И-3-Ф – инозиттрифосфат.

сты, нет генов, определяющих формирование альтернативных кислородных барьеров – гопанодисодержащих мембран [40].

Судя по филогении ключевого для диазотрофии гена *nifD*, формы с гетероцистами имеют монофилетическое происхождение [41]. По-видимому, данное эволюционное приобретение стало удачным ароморфозом, за которым быстро (в геологическом масштабе) последовала адаптивная радиация группы с заполнением практически всех доступных экологических ниш.

*Сенсинг и поглощение нитрата эукариотами*

Как отражено на рис. 3, у эукариот системы сенсинга и сигналинга нитрата, унаследованные от прокариот, получили дальнейшее развитие. Ранние этапы такой эволюции видны на примере примитивных пикопланктонных водорослей порядка *Mamiellales* (класс *Mamiellophyceae*) [42]. Так, у *Micromonas* sp. RCC299, *Ostreococcus lucimarinus* SSE9901, *O. tauri* OTN95 обнаружено по одному низкоаффинному транспортеру нитрата из се-

мейства NRT1 [43]. У типичной зеленой водоросли – хламидомонады Рейнхардта (*Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang.) также выявлен лишь один белок NRT1 [44]. Прослеживается родство NRT1-семейства и прокариотических пептидных транспортеров POT и PTR с сохранением механизма симпорта лиганда с протоном, а также обусловленных им консервативных особенностей структуры [45]. Некоторые из них определяют и возможность сенсинга нитрата. Можно предположить эволюционную смену узнаваемых NPF/POT/PTR лигандов от органических форм азота, типичных продуктов абиогенного синтеза, до нитрата как характерного компонента аэробного биологического круговорота. Отметим, что Nrt-белки прокариот относятся к транспортерам ABC-типа, а не NPF/POT/PTR [17], и, очевидно, стали сенсорами нитрата независимо от последних.

По последовательностям генов высокоаффинных транспортеров нитрата из семейства *NRT2* *Mamiellales* занимают промежуточное положение между другими зелеными водорослями (*Ch. reinhardtii*, *Chlorella sorokiniana* Shihira & R.W. Krauss и

*Dunaliella salina* (Dunal) Teodor.) и прокариотами [43]. Авторы исследования предполагают, что филогения *NRT2* отражает примитивность указанного порядка в ряду одноклеточных растений. У *Ch. reinhardtii* обнаружено четыре белка *NRT2*, узнающих нитрат, и два транспортера нитрита того же семейства [44]. Отсюда видно, что у ранних фототрофных эукариот субстратная специфика представителей семейства *NRT2* еще находилась в состоянии своего становления.

Экспрессия *NRT2* динофлагеллят *Lingulodinium polyedra* (F.Stein) J.D. Dodge не индуцировалась нитратом [46]. Вероятно, механизм такой индукции сложился у эволюционно продвинутых одноклеточных водорослей. У *Arabidopsis* в ней участвует нитратный сенсор *NRT1.1* [47]. Возможно, исходно белки *NRT1* были трансцепторами нитрата, тогда как *NRT2* только его транспортерами.

#### Трансдукция нитратного сигнала у эукариот

По-видимому, уже у ранних эукариот складывалось взаимодействие транспортеров *NRT2* с адапторными белками *NAR2*, необходимое для локализации их комплексов на плазмалемме, а также осуществления сенсорной и транспортной функций. У плесневого гриба *Aspergillus nidulans* (Eidam) G.Winter *NRT2* функционирует автономно [48]. У *Chlamydomonas* лишь два из шести транспортеров указанного семейства взаимодействуют с белками *NAR2* [44]. У цветковых растений, таких как *Arabidopsis*, *NAR2* необходим для работы всех известных *NRT2*-белков [49]. Налицо становление нового механизма “тонкой настройки” сенсинга и поглощения микродоз нитрата.

Сигнальные белки  $P_{II}$  были унаследованы от прокариот растениями, у которых локализованы в появившихся в ходе симбиогенеза пластидах и стали сенсорами глутамината, основного маркера N-статуса организма [50, 51]. На преемственность хлоропластов по отношению к цианобактериям указывает и общий тип посттрансляционной модификации указанных белков фосфорилированием, а не иными путями, характерными для других прокариот [28]. Также произошла специализация круга мишеней белков  $P_{II}$ . В пластидах последние регулируют наработку аргинина (что характерно и для прокариот) и поглощение цитозольного нитрита [52].

У *Ch. reinhardtii* сам нитрат (4 мМ) индуцирует  $P_{II}$  [51]. В результате создается основа для последующего C/N-сигналинга, что обратно последовательности молекулярных событий, характерной для цианобактерий. Вероятная причина — эволюционное увеличение значимости нитрата как источника азота и регулятора разнообразных физиологических процессов.

В нашем предыдущем обзоре рассмотрено участие в передаче нитратного сигнала у высших растений ионов кальция и кальцийзависимых протеинкиназ [2]. Как оказалось, такого рода звенья появились уже у весьма примитивных эукариот. Так, у *O. tauri* выявлена индукция, по крайней мере, одного из генов упомянутых протеинкиназ, *OtCDPK1*, при дефиците минерального азота в среде [53]. Аналогично у *Arabidopsis* в подобных условиях происходит активация протеинкиназ *CIPK7*, *CIPK12* и *CIPK14* с участием сенсора кальция — кальцийнейрин-В-подобного белка *CBL8* [54]. Здесь можно говорить о конвергенции, а не о гомологии.

Для большинства водорослей характерны белки с консервативным RWP-RK-доменом, например, *NIT2*, близкие к факторам транскрипции нитратиндуцибельных генов высших растений — *NLP* и, по-видимому, являющиеся их эволюционными прототипами [55]. *NLP*-белки найдены уже у *Micromonas pusilla* CCMP1545, *M. sp.* RCC299, *Ostreococcus lucimarinus* из порядка *Mamiellales* [56]. Возможно, это результат горизонтального переноса ДНК либо независимого сохранения указанных белков, унаследованных от общего предка, в линиях *Mamiellophyceae* и *Embryophyta*. В последнем случае гены *NIT* зеленых водорослей являются результатом филогенетической девиации.

С появлением и ранней эволюцией эукариот претерпел ряд изменений не только нитратный, но и NO-сигналинг. В частности, увеличилось разнообразие ферментов, участвующих в передаче сигнала. Среди них растворимые гуанилатциклазы, цГМФ-зависимые протеинкиназы и фосфоэстеразы, регулируемые циклическими нуклеотидами каналы. Однако далеко не всегда упомянутые звенья каскада передачи сигнала, даже у водорослей, присутствуют совместно с NO-синтазой [57]. Последняя характерна для животных, но среди растений присутствует даже не у всех водорослей. Вероятно, сохранение генов NO-синтазы у ряда потомков первичных фотосинтезирующих эукариот либо их горизонтальный перенос между таксономически отдаленными группами растений [58]. Среди видов, скорее всего, имеющих указанный фермент как архаичную особенность, вышеупомянутый пикопланктонный *O. tauri* [59]. Уже у *Chlamydomonas* оксид азота нарабатывают нитрат- и нитритредуктаза, причем первый фермент способен выполнять ту же функцию и у высших растений [44]. В итоге эволюционной смены источников оксида азота последний стал маркером доступности экзогенного нитрата, а не величины эндогенного N-пула, представленного аргинином. Однако и в этом случае сохранился принцип сенсинга оксида азота специальным гемопротепидом — гемоглобином.

Как видим, уже у ранних эукариот (водоросли и грибы), по существу, появились основные компоненты того каскада нитратного сигналинга, что известен на примере *Arabidopsis*. Однако разнообразие соответствующих белков невелико, что, вероятно, связано с отсутствием дифференцировки на функционально разные типы клеток.

## РАЗВИТИЕ НИТРАТНОГО СИГНАЛИНГА В ФАНОРОЗОЕ

### *Изменение окружающей среды*

В фанерозое (541 млн. л. н. и далее) содержание кислорода в атмосфере варьировало от 10% в периоды массовых вымираний до 30% — при наибольшем расцвете жизни [33]. Возросла и интенсивность нитрификации. Лишь для глобальных биосферных кризисов был характерен анаэробный Мировой океан с преобладанием аммония [60]. Кроме того, весь фанерозойский эон продолжалось накопление связанного азота в среде, что отразилось в увеличении уровня азотсодержащих веществ в осадочных породах в 1.5 раза [35]. В итоге уже на рубеже эдиакария (635–541 млн. л. н.) и кембрия (541–485 млн. л. н.) именно нитрат стал основным источником азота для растений, определяющим продуктивность морских экосистем [61, 62]. В настоящее время в составе океанского фитопланктона господствующее положение занимают нитрофильные зеленые водоросли, а не аммонифильные или диазотрофные цианобактерии [61, 63, 64]. Суммарная изложенного выше приведена на рис. 1в.

Представляет интерес то обстоятельство, что с геологической динамикой биогеохимического цикла азота связывают чередование холодных и теплых эпох, характерное для фанерозоя [65]. Так, холодные (“ледниковые”) эпохи приурочены к относительно высокому содержанию нитрата в Мировом океане, вследствие этого — депонированию углерода фитопланктоном, что уменьшало уровень одного из основных природных парниковых газов CO<sub>2</sub>. В теплые эпохи ситуация обратная, уровень нитрата находился в минимуме и преобладало гетеротрофное высвобождение углерода в атмосферу. Отрицательные обратные связи (в первом случае уменьшение пула доступных фитопланктону макроэлементов из-за ограничения стока рек при оледенении, во втором — накопление биогенных элементов в Мировом океане вследствие интенсификации их вымывания) обеспечили колебательный характер описанных изменений.

### *Сенсинг и поглощение нитрата высшими растениями*

В первую очередь усложнение механизмов сигналинга нитрата коснулось его трансцепторов.

У высших растений появились многочисленные NRT1-белки, различающиеся по своей локализации и функциям [44, 66]. Среди них и основной сенсор нитрата у *Arabidopsis* — NRT1.1, находящийся практически во всех органах растения, но прежде всего, в меристемах [66, 67]. Такое широкое распространение свидетельствует в пользу как физиологической значимости функций, так и древнего происхождения данного белка.

Разнообразие транспортеров нитрата низкого сродства хорошо изучено на примере *Arabidopsis*. NRT1.5 локализован в перикле, а NRT1.8 — в паренхиме ксилемы корня [66, 68]; NRT1.9 — в клетках-спутниках флоэмы корня [69]; NRT1.4 — в проводящей системе черешка листа [70]; NRT1.7, NRT1.11 и NRT1.12 — в жилках зрелых листьев [71, 72], тогда как NRT1.6 — в проводящих пучках семязачатков [73]. Такой полиморфизм связан с регуляцией не только органного распределения нитрата (данную функцию мог бы выполнять NRT1.1), но и морфогенеза вегетативных и генеративных органов. Вероятно, диверсификация семейства NRT1 происходила при становлении многоклеточной организации и выходе растений на сушу, когда в условиях гетерогенности окружающей среды начала складываться органная компартиментация пулов нитрата.

На примере *Arabidopsis* можно проследить полиморфизм транспортеров нитрата высокого сродства семейства NRT2. Так, NRT2.1 сосредоточен в ризодерме и коре корня [49], тогда как NRT2.5 — в жилках сформированных листьев [74], а NRT2.7 — на тонопласте клеток зародыша [75]. В последнем случае функционирование именно высокоаффинного транспортера позволяет обеспечить успех семенного размножения даже при азотном голодании. Соответственно, показана стимуляция экзогенным нитратом прорастания семян уже в концентрациях от 100 (*Arabidopsis*, гулявник лекарственный *Sisymbrium officinale* (L.) Scop.) до 200 мкМ (овсюг *Avena fatua* L., ячмень двурядный *Hordeum distichum* L.) [76, 77]. 1 мМ нитрат также стимулировал прорастание спор щитовника мужского *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott, систематически отдаленного от цветковых растений представителя папоротников [78]. В приведенных случаях действие указанного иона было связано с эффектом фитохрома, подавлялось хлоратом и не зависело от ингибитора нитрат-редуктазы — вольфрамата. Это позволяет сделать вывод о наличии консервативного механизма сигналинга, задействующего трансцепторы нитрата.

В ходе эволюции от одноклеточных водорослей до цветковых в транспорте и распределении нитрата стали участвовать хлоридные каналы CLC/CLV [66], а также не найденные у *Chlamydomonas* медленные анионные каналы SLAC1/SLAH и белки семейства активируемых алюминием транспорте-

ров малата ALMT [44, 79, 80]. Практически все они участвуют в адаптации растений к водному дефициту. Например, белок *Arabidopsis* SLAH3 с низким сродством к субстрату (Км 8.3 мМ) обеспечивает выход нитрата из замыкающих клеток устьиц и далее закрытие устьичной щели. Сам указанный ион в концентрациях 20–100 мМ активирует SLAH3, подавляя транспирацию [80]. Аналогичный эффект нитрата (>3 мМ) как активирующего SLAC1 антитранспиранта показан для однодольных растений – финика пальчатого *Phoenix dactylifera* L. и ячменя обыкновенного *Hordeum vulgare* L., что связано с двумя точечными мутациями в третьем трансмембранном домене указанного канала [81, 82]. Вероятно, чувствительность SLAC1 злаков и пальм к нитрату сложилась как одна из адаптаций к нараставшей в неогене (23.0–2.6 млн. л. н.) засушливости климата.

В результате совершенствования систем транспортеров нитрата увеличивалась эффективность его поглощения у видов из прогрессивных таксономических групп, тогда как примитивные растения часто оказывались адаптированными к минимальному уровню азота нитрофобами. У псилопта голого *Psilotum nudum* (L.) Beauvois уже 3.5 мкМ нитрат более чем вдвое угнетал прорастание спор, а 35 мкМ – практически полностью блокировал процесс независимо от присутствия в среде аммония [83]. Последний как единственная форма азота уже в концентрации 3.5 мкМ на 50% увеличивал рост гаметофита псилопта, а в концентрации 35 мкМ – практически в 4 раза. Аналогичные результаты были получены для гроздовника рассеченного *Botrychium dissectum* f. *obliquum* (Muhl.) Fernald [84]. Оба исследованных вида весьма примитивны в эволюционном плане и могли унаследовать экстремальную аммонифильность от ранних наземных растений. Напротив, как это было упомянуто выше, прорастание спор эволюционно продвинутого папоротника – щитовника мужского стимулируется 1 мМ нитратом, подобно прорастанию семян исследованных цветковых растений [78]. Возможно, это пример физиологической конвергенции.

Менее олиготрофный, чем псилот и гроздовник, пример растений, также предпочитающих нитрату аммоний – хвойные, более древние, чем цветковые растения. Особое место занимает такой примитивный их представитель, как араукария бразильская *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, у которой рост на 4 мМ аммония был удовлетворительным, тогда как на 4 мМ нитрате наблюдалось азотное голодание [85]. На примере сосны Массона *Pinus massoniana* Lamb. показано, что толерантность к высоким дозам аммония связана с депонированием азота в форме аспарагина [86], в котором участвует архаичный регуляторный белок P<sub>II</sub> [52]. Весьма вероятно, что данная

физиологическая основа аммонифильности унаследована от древнейших эукариот.

У прогрессивных хвойных предпочтение нитрата или другого источника азота зависит от условий. Так, сосны корейская *Pinus koraiensis* Siebold & Zucc. и обыкновенная *Pinus sylvestris* L., ель корейская *Picea koraiensis* Nakai и особенно лиственница ольгинская *Larix gmelinii* var. *olgensis* (A. Henry) Ostenf. & Syrach при низкой обеспеченности азотом предпочтительно поглощали  $^{15}\text{NO}_3^-$ , а не  $^{15}\text{NH}_4^+$ , тогда как при высокой – наоборот [87]. В условиях теплицы сосна корейская поглощала преимущественно глицин, тогда как лиственница тонкощуйчатая *Larix kaempferi* (Lamb.) Carrière, дуб монгольский *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb. и орех маньчжурский *Juglans mandshurica* Maxim. – нитрат [88]. Здесь и выше налицо примеры постепенного становления нитратофильности.

#### Трансдукция нитратного сигнала у высших растений

В ходе эволюционного усложнения морфогенеза высших растений на базе семейства трансцепторов нитрата низкого сродства NRT1/NPF сложился общий принцип котранспорта указанного иона и различных фитогормонов (ИУК, АБК, жасмонат, гиббереллины) [89]. На основе такого рода фактов была выдвинута гипотеза, что рецепторы эндогенных сигнальных молекул произошли от трансцепторов и их гомологов с исключительно рецепторной функцией [90]. В ходе эволюции могли последовательно происходить деспециализация NRT-белков по отношению к лигандам, включение в их число фитогормонов, появление гормон-транспортной функции и ее сопряжение с сенсингом нитрата. В результате появилась возможность регуляции указанным ионом многих морфогенетических процессов, связанных с корнепобеговой организацией.

Ярким подтверждением такого предположения является подавление 1–10 мМ нитратом экспорта ИУК из клеток корневых примордиев у *Arabidopsis*, что приводило к локальному накоплению ауксина с участием NRT1.1 [91]. Последний индуцировался указанным гормоном в области местного максимума внеклеточной концентрации нитрата [92]. Такая положительная обратная связь могла быть в основе эволюционно ранних механизмов ветвления осевых органов еще до того, как сложилась современная система транспорта и взаимодействия фитогормонов, вовлекающая в себя многообразные транспортеры, рецепторы и белки каскадов сигнальной трансдукции. Локализация NRT1.1, прежде всего, в зачатках различных частей растения [67] свидетельствует в пользу универсальности связанного с ним процесса местного сосредоточения ИУК в участках мери-

стемы с последующей дифференцировкой их по темпам роста.

Другой пример эволюционной надстройки механизмов нитратного сигналинга — появление NLP-белков, основных регуляторов транскрипции индуцируемых нитратом генов у различных видов с корнепобеговой организацией и мохообразного *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp., но не у большинства исследованных красных и зеленых водорослей [56]. Процессы появления и диверсификации NLP-белков коррелировали с усложнением органно-тканевой организации растений, став основой для широкого круга морфогенетических реакций, запускаемых нитратом. Примерами могут служить связь NLP7 белка с ростом корневой системы, а также NLP8 — с прорастанием семян *Arabidopsis* [93, 94]. Различиям в структуре указанных факторов транскрипции соответствуют специфические наборы генов-мишеней. Показано, что белок NLP7 индуцировал ген другого регулятора транскрипции — *ANRI*, локализованного в апексах боковых корней и поддерживающего их рост в обогащенной нитратом почве, а также ген рецептора ИУК, *AFB3*, участвующий в гормональной регуляции ризогенеза [93]. Мишенью NLP8 был ген АБК-8'-гидроксилазы *CYP707A*, которая катализировала первую реакцию деградации АБК и тем самым выводила семена из состояния покоя [94]. Круг знаний о молекулярных механизмах такого рода дифференцированных нитратзависимых процессов роста морфогенеза продолжает расширяться. Становится понятным, что важное значение в эволюции белков семейства NLP имело изменение распознаваемых регуляторных последовательностей ДНК. Напротив, сам принцип передачи сигнала с трансцепторов, узнающих различные лиганды, на протеинкиназы, фосфорилирующие консервативные факторы транскрипции, которые затем мигрируют в ядро, где взаимодействуют с генами-мишенями, типичен для современных эукариот и, вероятно, унаследован ими от общего предка [95].

Нами показано на примере гороха посевного *Pisum sativum* L., что среди мишеней позитивного сигнального действия нитрата у высших растений находится и стартовый фермент углеводного метаболизма — сахарозсинтаза, обеспечивающая субстратом наработку структурных полисахаридов и ряд других биосинтезов [96, 97]. Учитывая, что указанный белок выявлен даже у цианобактерий [98], можно предполагать широкое распространение и его регуляции нитратом у широкого круга растений как способа стимуляции роста гетеротрофных органов. Среди них: семязачаток, зародышевая ось, корень, гипокотиль, а также практически все меристемы разнотипной локализации. В упомянутых примерах возможны различия в соотношении интенсивностей конститутивной (например, с участием цитозольной инвертазы) и

нитратзависимой утилизации сахарозы, что, в конечном счете, на донорно-акцепторном уровне определяет варианты перестройки архитектоники растения в зависимости от обеспеченности нитратом. Вклад позитивного нитратного сигналинга сахарозсинтазы в конкретные морфогенетические процессы — актуальная проблема, по существу, остающаяся неразработанной.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прогрессивная направленность эволюции систем сенсинга и передачи сигнала нитрата в целом выражается в появлении организмов со все более высокой приспособляемостью к широкому диапазону концентраций указанного иона в окружающей среде. От первых прокариот к разнообразным современным растениям постепенно сложились дифференцированные механизмы сенсинга и передачи сигналов нитрата, участвующие в результирующих физиологических реакциях. При этом реализовались различные типы эволюционных изменений (параллелизм, дивергенция, а также дифференциация семейств белков от одного предшественника). В ближайшей перспективе предстоит развитие исследований по изучению органно-тканевой и внутриклеточной специфики сигнальных каскадов, запускаемых нитратом, и их взаимодействию с другими агентами (свет, фитогормоны, углеводы и др.). С учетом важности популяции как единицы эволюционного процесса важно выявить внутри- и межвидовую специфику трансцепторов нитрата и связанных с ними путей передачи сигналов, вплоть до полиморфизма генов-мишеней у представителей разных экологических ниш с целью повышения продуктивности культурных растений и сохранения биоразнообразия природных комплексов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит описания каких-либо экспериментов с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121033000137-1).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Izmailov S.F., Nikitin A.V., Rodionov V.A.* Nitrate signaling in plants: Introduction to the problem // *Russ. J. Plant Physiol.* 2018. V. 65. P. 477. <https://doi.org/10.1134/S1021443718040027>
2. *Izmailov S.F., Nikitin A.V.* Nitrate signaling in plants: Mechanisms of implementation // *Russ. J. Plant Physiol.* 2020. V. 67. P. 31. <https://doi.org/10.1134/S1021443720010082>
3. *Wong M.L., Charnay B.D., Gao P., Yung Y.L., Russell M.J.* Nitrogen oxides in early Earth's atmosphere as electron

- acceptors for life's emergence // *Astrobiol.* 2017. V. 17. P. 975.  
<https://doi.org/10.1089/ast.2016.1473>
4. *Laneville M., Kameya M., Cleaves H.J.* Earth without life: A systems model of a global abiotic nitrogen cycle // *Astrobiol.* 2018. V. 18. P. 897.  
<https://doi.org/10.1089/ast.2017.1700>
  5. *Ranjan S., Todd Z.R., Rimmer P.B., Sasselov D.D., Babbin A.R.* Nitrogen oxide concentrations in natural waters on early Earth // *Geochem. Geophys. Geosyst.* 2019. V. 20. P. 2021.  
<https://doi.org/10.1029/2018GC008082>
  6. *Eickmann B., Hofmann A., Wille M., Thi H.B., Boswell A.W., Schoenberg R.* Isotopic evidence for oxygenated Mesoarchaean shallow oceans // *Nature Geosci.* 2018. V. 11. P. 133.  
<https://doi.org/10.1038/s41561-017-0036-x>
  7. *Yang J., Junium C.K., Grassineau N.V., Nisbet E.G., Izon G., Mettam C., Martin A., Zerkle A.L.* Ammonium availability in the Late Archaean nitrogen cycle // *Nature Geosci.* 2019. V. 12. P. 553.  
<https://doi.org/10.1038/s41561-019-0371-1>
  8. *Ruvidy R., White III R.A., Neilan B.A., Burns B.P.* Unravelling core microbial metabolisms in the hypersaline microbial mats of Shark Bay using high-throughput metagenomics // *ISME J.* 2016. P. 183.  
<https://doi.org/10.1038/ismej.2015.87>
  9. *Molina V., Dorador C., Fernández C., Bristow L., Eissler Y., Hengst M., Hernandez K., Olsen L.M., Harrod C., Marchant F., Anguita C., Cornejo M.* The activity of nitrifying microorganisms in a high-altitude Andean wetland // *FEMS Microbiol. Ecol.* 2018. V. 94. Art. fiy062. P. 1.  
<https://doi.org/10.1093/femsec/fiy062>
  10. *Mettam C., Zerkle A.L., Claire M.W., Prave A.R., Poulton S.W., Junium C.K.* Anaerobic nitrogen cycling on a Neoproterozoic ocean margin // *Earth Planet. Sci. Lett.* 2019. 527. Art. 115800.  
<https://doi.org/10.1016/j.epsl.2019.115800>
  11. *Nohn T., Noji S., Taniguchi S., Saito T.* The *narX* and *narL* genes encoding the nitrate-sensing regulators of *Escherichia coli* are homologous to a family of prokaryotic two-component regulatory genes // *Nucl. Acid Res.* 1989. V. 17. P. 2947.  
<https://doi.org/10.1093/nar/17.8.2947>
  12. *Cavicchioli R., Schröder I., Constanti M., Gunsalus R.P.* The NarX and NarQ sensor-transmitter proteins of *Escherichia coli* each require two conserved histidines for nitrate-dependent signal transduction to NarL // *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 2416.  
<https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2416-2424.1995>
  13. *Stewart V.* Nitrate- and nitrite-responsive sensors NarX and NarQ of proteobacteria // *Biochem. Soc. Trans.* 2003. V. 31 (Pt 1). P. 1.  
<https://doi.org/10.1042/bst0310001>
  14. *Niemann V., Koch-Singenstreu M., Neu A., Nilkens S., Götz F., Uden G., Stehle T.* The NreA protein functions as a nitrate receptor in the staphylococcal nitrate regulation system // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. P. 1539.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.12.026>
  15. *Omata T., Andriess X., Hirano A.* Identification and characterization of a gene cluster involved in nitrate transport in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC7942 // *Mol. Gen. Genet.* 1993. V. 236. P. 193.  
<https://doi.org/10.1007/BF00277112>
  16. *Uyeda J.C., Harmon L.J., Blank C.E.* A comprehensive study of cyanobacterial morphological and ecological evolutionary dynamics through deep geologic time // *PLoS ONE.* 2016. V. 11. Art. e0162539. P. 1.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162539>
  17. *Herrero A., Flores E.* Genetic responses to carbon and nitrogen availability in *Anabaena* // *Environ Microbiol.* 2019. V. 21. P. 1.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.14370>
  18. *Maeda S.-I., Aoba R., Nishino Y., Omata T.* A novel bacterial nitrate transporter composed of small transmembrane proteins // *Plant Cell Physiol.* 2019. V. 60. P. 2180.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcz112>
  19. *Darwin A.J., Li J., Stewart V.* Analysis of nitrate regulatory protein NarL-binding sites in the *fdnG* and *narG* operon control regions of *Escherichia coli* K-12 // *Mol. Microbiol.* 1996. V. 20. P. 621.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5491074.x>
  20. *Shivakumar K.V., Karunakar P., Chatterjee J.* Inhibition of NarL of *Mycobacterium tuberculosis*: an *in silico* approach // *Interdiscip. Sci.* 2014. V. 6. P. 292.  
<https://doi.org/10.1007/s12539-014-0179-z>
  21. *Li J., Kustu S., Stewart V.* *In vitro* interaction of nitrate-responsive regulatory protein NarL with DNA target sequences in the *fdnG*, *narG*, *narK* and *frdA* operon control regions of *Escherichia coli* K-12 // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 241. P. 150.  
<https://doi.org/10.1006/jmbi.1994.1485>
  22. *Stewart V., Bledsoe P.J.* Fnr-, NarP- and NarL-dependent regulation of transcription initiation from the *Haemophilus influenzae* Rd *napF* (periplasmic nitrate reductase) promoter in *Escherichia coli* K-12 // *J. Bacteriol.* 2005. V. 187. P. 6928.  
<https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6928-6935.2005>
  23. *Stewart V., Cali B.M.* Genetic evidence that NarL function is not required for nitrate regulation of nitrate assimilation in *Klebsiella pneumoniae* M5al // *J. Bacteriol.* 1990. V. 172. P. 4482.  
<https://doi.org/10.1128/jb.172.8.4482-4488.1990>
  24. *Laichoubi K.B., Beez S., Espinosa J., Forchhammer K., Contreras A.* The nitrogen interaction network in *Synechococcus* WH5701, a cyanobacterium with two PipX and two P(II)-like proteins // *Microbiol.* 2011. V. 157. Pt. 4. P. 1220.  
<https://doi.org/10.1099/mic.0.047266-0>
  25. *Golden J.W., Yoon H.S.* Heterocyst formation in *Anabaena* // *Curr. Opin. Microbiol.* 1998. V. 1. P. 623.  
[https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(98\)80106-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(98)80106-9)
  26. *Forchhammer K., Selim K.A.* Carbon/nitrogen homeostasis control in cyanobacteria // *FEMS Microbiol. Rev.* 2019. pii: fuz025. P. 1.  
<https://doi.org/10.1093/femsre/fuz025>
  27. *Merrick M.* Post-translational modification of P<sub>II</sub> signal transduction proteins // *Front. Microbiol.* 2015. V. 5. Art. 763. P. 1.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00763>
  28. *Drepper T., Wiethaus J., Giaourakis D., Gross S., Schubert B., Vogt M., Wiencek Y., McEwan A.G., Mase-*

- pohl B.* Cross-talk towards the response regulator NtrC controlling nitrogen metabolism in *Rhodobacter capsulatus* // FEMS Microbiol. Lett. 2006. V. 258. P. 250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00228.x>
29. *Bonato P., Alves L.R., Osaki J.H., Rigo L.U., Pedrosa F.O., Souza E.M., Zhang N., Schumacher J., Buck M., Wassem R., Chubatsu L.S.* The NtrY-NtrX two-component system is involved in controlling nitrate assimilation in *Herbaspirillum seropedicae* strain SmR1 // FEBS J. 2016. V. 283. P. 3919. <https://doi.org/10.1111/febs.13897>
  30. *Rafferty S.* Nitric oxide synthases of bacteria-and other unicellular organisms // Open Nitric Oxide J. 2011. V. 3. P. 25. <https://doi.org/10.2174/1875042701103010025>
  31. *Arora D.P., Hossain S., Xu Y., Boon E.M.* Nitric oxide regulation of bacterial biofilms // Biochem. 2015. V. 54. P. 3717. <https://doi.org/10.1021/bi501476n>
  32. *Mangalea M.R., Plumley B.A., Borlee B.R.* Nitrate sensing and metabolism inhibit biofilm formation in the opportunistic pathogen *Burkholderia pseudomallei* by reducing the intracellular concentration of c-di-GMP // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 1353. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01353>
  33. *Large R.R., Mukherjee I., Gregory D., Steadman J., Corkrey R., Danyushевsky L.V.* Atmosphere oxygen cycling through the Proterozoic and Phanerozoic // Mineral. Deposita. 2019. V. 54. P. 485. <https://doi.org/10.1007/s00126-019-00873-9>
  34. *Sánchez-Baracaldo P.* Origin of marine planktonic cyanobacteria // Sci. Rep. 2015. V. 5. Art. 17418. P. 1. <https://doi.org/10.1038/srep17418>
  35. *Johnson B.W., Goldblatt C.* A secular increase in continental crust nitrogen during the Precambrian // Geochem. Persp. Lett. 2017. V. 4. P. 24. <https://doi.org/10.7185/geochemlet.1731>
  36. *Garvin J., Buick R., Anbar A.D., Arnold G.L., Kaufman A.J.* Isotopic evidence for an aerobic nitrogen cycle in the latest Archean // Sci. 2009. V. 323. P. 1045. <https://doi.org/10.1126/science.1165675>
  37. *Navarro-González R., McKay C.P., Mvondo D.N.* A possible nitrogen crisis for Archean life due to reduced nitrogen fixation by lightning // Nature. 2001. V. 412. P. 61. <https://doi.org/10.1038/35083537>
  38. *Sánchez-Baracaldo P., Ridgwell A., Raven J.A.* A neoproterozoic transition in the marine nitrogen cycle // Curr. Biol. 2014. V. 24. P. 652. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.01.041>
  39. *Uyeda J.C., Harmon L.J., Blank C.E.* A comprehensive study of cyanobacterial morphological and ecological evolutionary dynamics through deep geologic time // PLoS ONE. 2016. V. 11. Art. e0162539. P. 1. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162539>
  40. *Cornejo-Castillo F.M., Zehr J.P.* Hopanoid lipids may facilitate aerobic nitrogen fixation in the ocean // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 18269. <https://doi.org/10.1073/pnas.1908165116>
  41. *Esteves-Ferreira A.A., Cavalcanti J.H.F., Vaz M.G.M.V., Alvarenga L.V., Nunes-Nesi A., Araújo W.L.* Cyanobacterial nitrogenases: phylogenetic diversity, regulation and functional predictions // Genet. Mol. Biol. 2017. V. 40. P. 261. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0050>
  42. *Marin B., Melkonian M.* Molecular phylogeny and classification of the *Mamiellophyceae* class. nov. (*Chlorophyta*) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons // Protist. 2010. V. 161. P. 304. <https://doi.org/10.1016/j.protis.2009.10.002>
  43. *McDonald S.M., Plant J.N., Worden A.Z.* The mixed lineage nature of nitrogen transport and assimilation in marine eukaryotic phytoplankton: a case study of *Micromonas* // Mol. Biol. Evol. 2010. V. 27. P. 2268. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq113>
  44. *Calatrava V., Chamizo-Ampudia A., Sanz-Luque E., Oc-aña-Calahorra F., Llamas A., Fernandez E., Galvan A.* How *Chlamydomonas* handles nitrate and the nitric oxide cycle // J. Exp. Bot. 2017. V. 68. P. 2593. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw507>
  45. *Longo A., Miles N.W., Dickstein R.* Genome mining of plant NPFs reveals varying conservation of signature motifs associated with the mechanism of transport // Front. Plant Sci. 2018. V. 4. Art. 1668. P. 1. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01668>
  46. *Bellefeuille S.D., Morse D.* The main nitrate transporter of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* is constitutively expressed and not responsible for daily variations in nitrate uptake rates // Harmful Algae. 2016. V. 55. P. 272. <https://doi.org/10.1016/j.hal.2016.03.021>
  47. *Ho C.H., Lin S.H., Hu H.C., Tsay Y.F.* CHL1 functions as a nitrate sensor in plants // Cell. 2009. V. 138. P. 1184. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.004>
  48. *Kotur Z., Unkles S.E., Glass A.D.M.* Comparisons of the *Arabidopsis thaliana* High-affinity Nitrate Transporter Complex AtNRT2.1/AtNAR2.1 and the *Aspergillus nidulans* AnNRTA: structure function considerations // Israel J. Plant Sci. 2017. V. 64. P. 21. <https://doi.org/10.1080/07929978.2016.1246147>
  49. *Orsel M., Chopin F., Leleu O., Smith S.J., Krapp A., Daniel-Vedele F., Miller A.J.* Nitrate signaling and the two component high affinity uptake system in *Arabidopsis* // Plant Signal Behav. 2007. V. 2. P. 260. <https://doi.org/10.4161/psb.2.4.3870>
  50. *Lapina T., Selim K.A., Forchhammer K., Ermilova E.* The PII signaling protein from red algae represents an evolutionary link between cyanobacterial and Chloroplastida PII proteins // Sci. Rep. 2018. V. 8. Art. 790. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19046-7>
  51. *Zalutskaya Z., Kochemasova L., Ermilova E.* Dual positive and negative control of *Chlamydomonas* PII signal transduction protein expression by nitrate/nitrite and NO via the components of nitric oxide cycle // BMC Plant Biol. 2018. V. 18. Art. 305. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1540-x>
  52. *Uhrig R.G., Ng K.K., Moorhead G.B.* PII in higher plants: a modern role for an ancient protein // Trends Plant Sci. 2009. V. 14. P. 505. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2009.07.003>
  53. *Caló G., Scheidegger D., Martínez-Noël G.M.A., Salerno G.L.* Ancient signal for nitrogen status sensing in the green lineage: Functional evidence of CDPK repertoire in *Ostreococcus tauri* // Plant Physiol. Bio-

- chem. 2017 V. 118. P. 377.  
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.07.009>
54. Yasuda S., Aoyama S., Hasegawa Y., Sato T., Yamaguchi J. Arabidopsis CBL-interacting protein kinases regulate carbon/nitrogen-nutrient response by phosphorylating ubiquitin ligase ATL31 // *Mol. Plant*. 2017. V. 10. P. 605.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.01.005>
  55. Chardin C., Girin T., Roudier F., Meyer C., Krapp A. The plant RWP-RK transcription factors: key regulators of nitrogen responses and of gametophyte development // *J. Exp. Bot*. 2014. V. 65. P. 5577.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/eru261>
  56. Mu X., Luo J. Evolutionary analyses of NIN-like proteins in plants and their roles in nitrate signaling // *Cell. Mol. Life Sci*. 2019. V. 76. P. 3753.  
<https://doi.org/10.1007/s00018-019-03164-8>
  57. Astier J., Mounier A., Santolini J., Jeandroz S., Wendehenne D. The evolution of nitric oxide signalling diverges between animal and green lineages // *J. Exp. Bot*. 2019. V. 70. P. 4355.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erz088>
  58. Jeandroz S., Wipf D., Stuehr D.J., Lamattina L., Melkonian M., Tian Z., Zhu Y., Carpenter E.J., Wong G.K., Wendehenne D. Occurrence, structure, and evolution of nitric oxide synthase-like proteins in the plant kingdom // *Sci. Signal*. 2016. V. 9. Art. re2.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aad4403>
  59. Weisslocker-Schaetzel M., André F., Touazi N., Foresi N., Lembrouk M., Dorlet P., Frelet-Barrand A., Lamattina L., Santolini J. The NOS-like protein from the microalgae *Ostreococcus tauri* is a genuine and ultrafast NO-producing enzyme // *Plant Sci*. 2017. V. 265. P. 100.  
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.09.019>
  60. Sun Y.D., Zulla M.J., Joachimski M.M., Bond D.P.G., Wignall P.B., Zhang Z.T., Zhang M.H. Ammonium ocean following the end-Permian mass extinction // *Earth Planet. Sci. Lett*. 2019. V. 518. P. 211.  
<https://doi.org/10.1016/j.epsl.2019.04.036>
  61. Xiang L., Schoepfer S.D., Zhang H., Cao C.-Q., Shen S.-Z. Evolution of primary producers and productivity across the Ediacaran-Cambrian transition // *Precamb. Res*. 2018. V. 313. P. 68.  
<https://doi.org/10.1016/j.precamres.2018.05.023>
  62. Chen Y., Diamond C.W., Stüeken E.E., Cai C., Gill B.C., Zhang F., Bates S., Chu X., Ding Y., Lyons T.W. Coupled evolution of nitrogen cycling and redoxcline dynamics on the Yangtze Block across the Ediacaran-Cambrian transition // *Geochim. Cosmochim. Acta*. 2019. V. 257. P. 243.  
<https://doi.org/10.1016/j.gca.2019.05.017>
  63. Stüeken E.E., Kipp M.A., Koehler M.C., Buick R. The evolution of Earth's biogeochemical nitrogen cycle // *Earth-Sci. Rev*. 2016. V. 160. P. 220.  
<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2016.07.007>
  64. Van Oostende N., Fawcett S.E., Marconi D., Lueders-Dumont J., Sabadel A.J.M., Woodward E.M.S., Jönsson B.F., Sigman D.M., Ward B.B. Variation of summer phytoplankton community composition and its relationship to nitrate and regenerated nitrogen assimilation across the North Atlantic Ocean // *Deep Sea Res. Part I: Oceanogr. Res. Pap*. 2017. V. 121. P. 79.  
<https://doi.org/10.1016/j.dsr.2016.12.012>
  65. Kvale K.F., Turner K.E., Landolfi A., Meissner K.J. Phytoplankton calcifiers control nitrate cycling and the pace of transition in warming icehouse and cooling greenhouse climates // *Biogeosci*. 2019. V. 16. P. 1019.  
<https://doi.org/10.5194/bg-16-1019-2019>
  66. Wang Y.-Y., Hsu P.-K., Tsay Y.-F. Uptake, allocation and signaling of nitrate // *Trends Plant Sci*. 2012. V. 17. P. 458.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.006>
  67. Guo F.-Q., Wang R., Chen M., Crawford N.M. The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHLI)* is activated and functions in nascent organ development during vegetative and reproductive growth // *Plant Cell*. 2001. V. 13. P. 1761.  
<https://doi.org/10.1105/TPC.010126>
  68. Zhang G.-B., Yi H.-Y., Gong J.-M. The *Arabidopsis* ethylene/jasmonic acid-NRT signaling module coordinates nitrate reallocation and the trade-off between growth and environmental adaptation // *Plant Cell*. 2014. V. 26. P. 3984.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.114.129296>
  69. Wang Y.-Y., Tsay Y.-F. *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.9 is important in phloem nitrate transport // *Plant Cell*. 2011. V. 23. P. 1945.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.111.083618>
  70. Chiu Ch.-Ch., Lin Ch.-S., Hsia A.-P., Su R.-Ch., Lin H.-L., Tsay Y.-F. Mutation of a nitrate transporter, *AtNRT1.4*, results in a reduced petiole nitrate content and altered leaf development // *Plant Cell Physiol*. 2004. V. 45. P. 1139.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pch143>
  71. Fan Sh.-Ch., Lin Ch.-S., Hsu P.-K., Lin Sh.-H., Tsay Y.-F. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate // *Plant Cell*. 2009. V. 21. P. 2750.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.109.067603>
  72. Hsu P.-K., Tsay Y.-F. Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth // *Plant Physiol*. 2013. V. 163. P. 844.  
<https://doi.org/10.1104/pp.113.226563>
  73. Almagro A., Lin S.H., Tsay Y.F. Characterization of the *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development // *Plant Cell*. 2008. V. 20. P. 3289.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.056788>
  74. Lezhneva L., Kiba T., Feria-Bourrellier A.-B., Lafouge F., Boutet-Mercey S., Zoufan P., Sakakibara H., Daniel-Vedele F., Krapp A. The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.5 plays a role in nitrate acquisition and remobilization in nitrogen-starved plants // *Plant J*. 2014. V. 80. P. 230.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12626>
  75. Chopin F., Orsel M., Dorbe M.F., Chardon F., Truong H.N., Miller A.J., Krapp A., Daniel-Vedele F. The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds // *Plant Cell*. 2007. V. 19. P. 1590.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.107.050542>
  76. Luna B., Moreno J.M. Light and nitrate effects on seed germination of Mediterranean plant species of several functional groups // *Plant Ecol*. 2009. V. 203. P. 123.  
<https://doi.org/10.1007/s11258-008-9517-8>

77. *Duermeyer L., Khodapanahi E., Yan D., Krapp A., Rothstein S.J., Nambara E.* Regulation of seed dormancy and germination by nitrate // *Seed Sci. Res.* 2018. V. 28. P. 150.  
<https://doi.org/10.1017/S096025851800020X>
78. *Haas C.J., Scheuerlein R.* Nitrate effect on phytochrome-mediated germination in fern spores: Investigations on the mechanism of nitrate action // *J. Plant Physiol.* 1991. V. 138. P. 350.  
[https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(11\)80299-3](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(11)80299-3)
79. *Sasaki T., Mori I.C., Furuichi T., Munemasa Sh., Toyooka K., Matsuoka K., Murata Y., Yamamoto Y.* Closing plant stomata requires a homolog of an aluminum-activated malate transporter // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 354.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq016>
80. *Geiger D., Maierhofer T., Al-Rasheid Kh.A.S., Scherzer S., Mumm P., Liese A., Ache P., Wellmann Ch., Marten I., Grill E., Romeis T., Hedrich R.* Stomatal closure by fast abscisic acid signaling is mediated by the guard cell anion channel SLAH3 and the receptor RCAR1 // *Sci. Signal.* 2011. V. 4. Art. ra32. P. 1.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001346>
81. *Müller H.M., Schäfer N., Bauer H., Geiger D., Lautner S., Fromm J., Riederer M., Bueno A., Nussbaumer T., Mayer K., Alquraishi S.A., Alfarhan A.H., Neher E., Al-Rasheid K.A.S., Ache P., Hedrich R.* The desert plant *Phoenix dactylifera* closes stomata via nitrate-regulated SLAC1 anion channel // *New Phytol.* 2017. V. 216. P. 150.  
<https://doi.org/10.1111/nph.14672>
82. *Schäfer N., Maierhofer T., Herrmann J., Jørgensen M.E., Lind C., von Meyer K., Lautner S., Fromm J., Felder M., Hetherington A.M., Ache P., Geiger D., Hedrich R.* A tandem amino acid residue motif in guard cell SLAC1 anion channel of grasses allows for the control of stomatal aperture by nitrate // *Curr. Biol.* 2018. V. 28. P. 1370.  
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.027>
83. *Whittier D.P.* Effects of nitrogen source on spore germination and gametophyte growth in *Ptilotum* // *Bot. Gaz.* 1990. V. 151. P. 50.  
<https://doi.org/10.1086/337804>
84. *Melan M.A., Whittier D.P.* Effects of inorganic nitrogen sources on spore germination and gametophyte growth in *Botrychium dissectum* // *Plant Cell Environ.* 1990. V. 13. P. 477.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1990.tb01325.x>
85. *Garbin M.L., Dillenburg L.R.* Effects of different nitrogen sources on growth, chlorophyll concentration, nitrate reductase activity and carbon and nitrogen distribution in *Araucaria angustifolia* // *Braz. J. Plant Physiol.* 2008. V. 20. P. 295.  
<https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000400005>
86. *Ren Q., Zhou Y., Zhou X.* Combined transcriptome and proteome analysis of masson pine (*Pinus massoniana* Lamb.) seedling root in response to nitrate and ammonium supplementations // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21(20). P. 7548.  
<https://doi.org/10.3390/ijms21207548>
87. *Zhou X., Wang A., Hobbie E.A., Zhu F., Qu Y., Dai L., Li D., Liu X., Zhu W., Koba K., Li Y., Fang Y.* Mature conifers assimilate nitrate as efficiently as ammonium from soils in four forest plantations // *New Phytol.* 2020. V. 229. P. 3184.  
<https://doi.org/10.1111/nph.17110>
88. *Zhu F., Dai L., Hobbie E.A., Koba K., Liu X., Gurmessa G.A., Huang S., Li S., Li Y., Han S., Fang Y.* Uptake patterns of glycine, ammonium, and nitrate differ among four common tree species of northeast China // *Front. Plant Sci.* 2019. V. 10. Art. 799.  
<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00799>
89. *Corratgé-Faillie C., Lacombe B.* Substrate (un)specificity of *Arabidopsis* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins // *J. Exp. Bot.* 2017. V. 68. P. 3107.  
<https://doi.org/10.1093/jxb/erw499>
90. *Thevelein J.M., Voordeckers K.* Functioning and evolutionary significance of nutrient transceptors // *Mol. Biol. Evol.* 2009. V. 26. P. 2407.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp168>
91. *Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A.* Nitrate-regulated auxin transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants // *Dev Cell.* 2010. V. 18. P. 927.  
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.05.008>
92. *Guo F.Q., Wang R., Crawford N.M.* The *Arabidopsis* dual-affinity nitrate transporter gene *AtNRT1.1 (CHLI)* is regulated by auxin in both shoots and roots // *J. Exp. Bot.* 2002. V. 53. P. 835.  
<https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.835>
93. *Yu L.-H., Wu J., Tang H., Yuan Y., Wang S.-M., Wang Y.-P., Zhu Q.-S., Li S.-G., Xiang C.-B.* Overexpression of *Arabidopsis NLP7* improves plant growth under both nitrogen-limiting and -sufficient conditions by enhancing nitrogen and carbon assimilation // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. Art. 27795.  
<https://doi.org/10.1038/srep27795>
94. *Yan D., Easwaran V., Chau V., Okamoto M., Ierullo M., Kimura M., Endo A., Yano R., Pasha A., Gong Y., Bi Y.-M., Provart N., Guttman D., Krapp A., Rothstein S.J., Nambara E.* NIN-like protein 8 is a master regulator of nitrate-promoted seed germination in *Arabidopsis* // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. Art. 13179.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms13179>
95. *Konishi M., Yanagisawa S.* *Arabidopsis* NIN-like transcription factors have a central role in nitrate signalling // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. Art. 1617.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms2621>
96. *Bruskova R.K., Nikitin A.V., Satskaya M.V., Izmailov S.F.* Effect of nitrate on pea sucrose synthase // *Russ. J. Plant Physiol.* 2009. V. 56. P. 74.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443709010117>
97. *Nikitin A.V., Izmailov S.F.* Enzymes of sucrose dissimilation as targets for nitrate in early ontogenesis of garden pea // *Russ. J. Plant Physiol.* 2016. V. 63. P. 152.  
<https://doi.org/10.1134/S1021443715060138>
98. *Curatti L., Giarrocco L., Salerno S.L.* Sucrose synthase and RuBisCo expression is similarly regulated by the nitrogen source in the nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. // *Planta.* 2006. V. 223. P. 891.  
<https://doi.org/10.1007/s00425-005-0142-7>