

УДК 631.81:633.15

МОДЕЛИРОВАНИЕ ПОГЛОЩЕНИЯ НИТРАТА ПРОРОСТКАМИ КУКУРУЗЫ: ОТКЛОНЕНИЕ ОТ МОДЕЛИ МИХАЭЛИСА–МЕНТЕН

© 2000 г. Н. В. Ивашикина*, О. А. Соколов*, Ц. Ф. Стармер**

*Всероссийский научно-исследовательский институт удобрений и агропочвоведения РАСХН, 127550 Москва, ул. Прянишникова, 31, Россия

**Medical University of South Carolina, 171 Ashley Avenue, Charleston, SC 29425, USA

Поступила в редакцию 22.02.2000 г.

Изучали кинетику поглощения NO_3^- 9-дневными проростками кукурузы, выращенными в условиях гидропоники. Поглощение NO_3^- измеряли по убыванию из раствора ион-селективными электродами с помощью установки, автоматизированной на базе ЭВМ. Результаты измерений анализировали используя модель Михаэлиса–Ментен. Анализ данных методом наименьших квадратов показал неспособность модели одновременно описать временную и концентрационную зависимость поглощения NO_3^- . Кинетические параметры V_{\max} и K_m , рассчитанные для концентрационной зависимости, существенно отличались от значений, полученных в результате анализа убывания NO_3^- из раствора. Решение дифференциальных уравнений для non-steady-state не позволило существенно улучшить соответствие между моделью и результатами измерений. Использование уравнения Михаэлиса–Ментен для обратимых реакций предсказывало установление равновесия между цитоплазмой и окружающим раствором, что не наблюдалось *in vivo*, по-видимому, вследствие ассимиляции цитоплазматического NO_3^- , транспорта в побег и вакуоль. Введение дополнительной ступени, связывающей цитоплазматический NO_3^- , значительно улучшило соответствие модели экспериментальным данным. Для разных экспериментальных условий высокое качество подгонки модели было достигнуто путем изменения 3 параметров: количества переносчиков, их сродства к NO_3^- и цитоплазматической концентрации NO_3^- .

ВВЕДЕНИЕ

Концентрация NO_3^- в почвенном растворе варьирует в широких пределах, достигая 20 мМ при интенсивном использовании удобрений [1–3]. Поглощение NO_3^- растениями в широком диапазоне концентраций является активным процессом, который обеспечивается функционированием переносчиков на плазмалемме корневых клеток [4–7]. Работа переносчиков регулируется рядом внешних факторов (таких как концентрация NO_3^- , температура, pH), а также внутренних сигналов, возникающих в результате ассимиляции и аккумуляции NO_3^- . Идентифицированы гены, кодирующие переносчики нитрата, показана регуляция синтеза переносчиков на уровне транскрипции [8–10]. Предложены модели посттрансляционной регуляции переносчиков, предполагающие участие электрохимического градиента протонов [11], мембранного потенциала [12] и фосфорилирования/дефосфорилирования транспортных белков [13].

В последние 20 лет появилось большое количество работ по изучению кинетики поглощения нитрата в зависимости от концентрации NO_3^- в среде и N-статуса растений [14–19]. Уравнение Михаэлиса–Ментен широко использовалось для анализа кинетики поглощения нитрата в диапазоне <1 мМ NO_3^- . Кинетические параметры V_{\max} и K_m изменялись в зависимости от условий азотного питания. Например, V_{\max} возрастала в течение первых часов контакта корней с NO_3^- [15]. V_{\max} снижалась, а K_m возрастала в результате повышения концентрации NO_3^- в окружающем растворе [18]. Кратковременное голодание растений приводило к повышению V_{\max} и снижению K_m [16]. Длительное устранение NO_3^- из раствора снижало как V_{\max} , так и K_m [14]. Повышение K_m отмечалось после предобработки растений в растворах, содержащих продукты ассимиляции нитрата: NH_4^+ и глутамат [19]. Перечисленные исследования, од-

нако, не привели к выявлению механизма, объясняющего изменения кинетических параметров поглощения нитрата. Основная причина – отсутствие полной аналогии между кинетикой ферментативных реакций, описываемой уравнением Михаэлиса–Ментен, и поглощением ионов.

Нетто-поглощение NO_3^- представляет сумму двух противоположно направленных процессов: притока NO_3^- в клетки корня и оттока ионов в окружающий раствор [20–23]. Вклад оттока может быть значительным. Например, в работе [24] отток составил 40% от притока NO_3^- . Показано, что отток нитрата, как и приток, является субстрат-индуцибельным процессом, зависящим от синтеза РНК в клетках корня [23]. Между тем, уравнение Михаэлиса–Ментен, традиционно используемое для анализа нетто-поглощения нитрата, не позволяет описать отток NO_3^- из-за необратимой второй ступени реакции (рис. 1а).

Исследования кинетики поглощения нитрата в диапазоне $>1 \text{ mM NO}_3^-$ показали, что поглощение

NO_3^- может отклоняться от модели Михаэлиса–Ментен. Описаны две кинетические фазы поглощения (кинетика с насыщением + линейный компонент или две фазы с насыщением), которые объясняют параллельным функционированием двух переносчиков с высоким и низким сродством к NO_3^- [6, 15, 18]. В нескольких исследованиях обнаружена многофазная кинетика поглощения NO_3^- , состоящая из 3–4-х фаз с насыщением, каждая из которых может быть описана уравнением Михаэлиса–Ментен [25–26]. Многофазную кинетику объясняют функционированием фермента с одним центром связывания, претерпевающим конформационные изменения в зависимости от концентрации NO_3^- в среде [27, 28].

Приведенные выше данные свидетельствуют о том, что поглощение NO_3^- не всегда описывается моделью Михаэлиса–Ментен и что эта модель не объясняет механизм кинетической регуляции поглощения NO_3^- . Целью данной работы стало изучение причин отклонения поглощения NO_3^- от модели Михаэлиса–Ментен и разработка модели для кинетического анализа поглощения нитрата.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

Объектом исследования были 9-дневные проростки кукурузы (*Zea mays* L.) гибрида Молдавский 270. Проростки выращивали в течение 7 сут в климатической камере, как описано в работе [29].

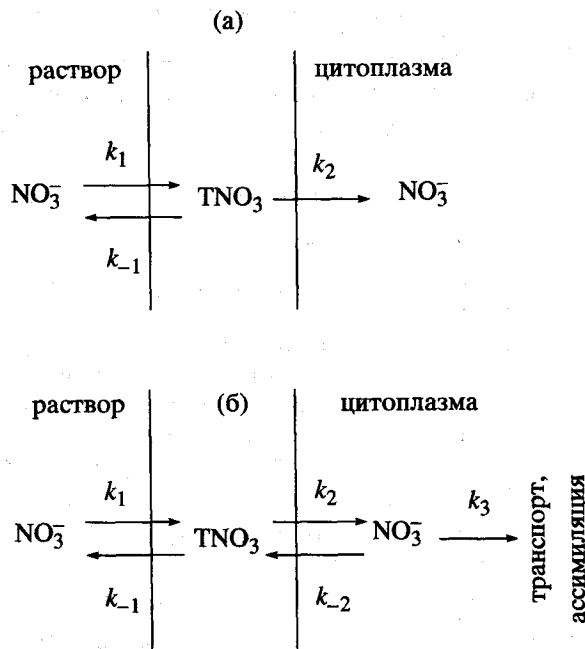


Рис. 1. Кинетические схемы модели Михаэлиса–Ментен (а) и модели с участием переносчика (б).

На 8-е сут проростки переносили на 6 ч в раствор, содержащий 1 mM CaSO_4 и 0.01 mM KNO_3 для индукции переносчиков нитрата [29].

Эксперимент 1. Проростки предобрабатывали 24 ч в растворах, содержащих 0.01, 0.1, 1 и 10 mM NO_3^- . Для предобработки использовали растворы следующего состава: 1 mM CaSO_4 , 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane phosphate (pH 5.5) и 0.01 (0.1, 1.0, 10) mM KNO_3 . Растворы с 0.01 и 0.1 mM KNO_3 также содержали 0.5 mM K_2SO_4 . Поглощение

NO_3^- измеряли из раствора, содержащего 1 mM KNO_3 , 1 mM CaSO_4 , 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane phosphate (pH 5.5). Перед измерением проростки переносили на 10 мин в раствор того же состава, который использовали для измерений.

Эксперимент 2. Проростки предобрабатывали в течение 24 ч в растворе, содержащем 0.01 mM KNO_3 , 1 mM CaSO_4 и 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane phosphate (pH 5.5). Затем проростки переносили для измерений в растворы того же состава, но с разными значениями pH (5.0, 6.0, 7.0, 8.0). pH раствора доводили с помощью 25 mM Tris/Mes (pH 7.0–8.0) и Tris/ H_3PO_4 (pH 5.0–6.0) буферов.

Эксперимент 3. Проростки предобрабатывали в течение 4, 8 и 12 ч в растворе, содержащем 1 mM KNO_3 , 1 mM CaSO_4 , и 25 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane phosphate (pH 5.5). Затем измеряли поглощение NO_3^- из раствора, содержащего 0.01 mM KNO_3 , 1 mM CaSO_4 и 25 mM Tris(hy-

droxymethyl)aminomethane phosphate (pH 5.5). За 0 ч предобработки принимали поглощение NO_3^- проростками, индуцированными 6 ч в растворе, содержащем 0.01 мМ NO_3^- .

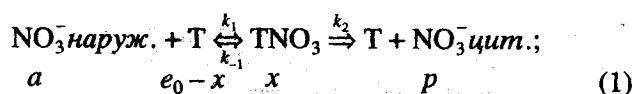
Поглощение NO_3^- измеряли по убыванию из раствора с помощью NO_3^- -селективных электродов и установки, автоматизированной на базе ЭВМ. Описание установки, процедуры измерений и обработки данных приводится в работе [29]. Соотношение массы корня к объему раствора во время предобработки составило 1г/4дл, во время измерений 1г/20 мл. Измерения проводили в четырех повторностях, на рисунках показаны типичные данные.

Для анализа поглощения нитрата были использованы две модели:

1. Модель Михаэлиса–Ментен (рис. 1а).

2. Модель с участием переносчика (рис. 1б).

Модель Михаэлиса–Ментен была записана в форме Briggs–Haldane дифференциальных уравнений:



$$\text{T} + \text{TNO}_3 = \text{T}_{\text{max}},$$

$$\frac{da}{dt} = k_1 x - k_1 (e_0 - x) a, \quad (2)$$

$$\frac{dx}{dt} = k_1 a (e_0 - x) - (k_{-1} + k_2) x. \quad (3)$$

В условиях steady-state модель Михаэлиса–Ментен принимала форму:

$$v = \frac{da}{dt} = \frac{V_{\text{max}}}{1 + K_m/a}, \quad (4)$$

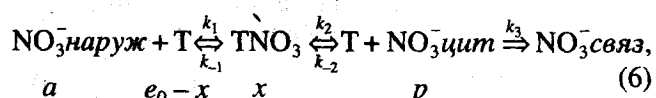
где $V_{\text{max}} = k_2[\text{T}_{\text{max}}]$ и $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$.

Модельные кривые были рассчитаны путем решения системы дифференциальных уравнений для нетто-поглощения и скорости поглощения NO_3^- . Параметры модели были подобраны с целью минимизации остаточного отклонения (*RD*, residual deviation):

$$RD = \sqrt{\left(\sum_{i=1}^n (\text{экспер}[i] - \text{теор}[i])^2 / n - 1 \right)}. \quad (5)$$

Модель с участием переносчика (рис. 1б) включала уравнение Михаэлиса–Ментен для обратимых реакций с дополнительной третьей ступенью,

связывающей цитоплазматический нитрат ($\text{NO}_3^-_{\text{цит}} \rightarrow \text{NO}_3^-_{\text{связ}}$), что предполагает ассимиляцию и транспорт NO_3^- в побег и вакуоль.



где $[\text{T}]_{\text{max}} = [\text{TNO}_3] + [\text{T}]$.

Модель с участием переносчика описывалась следующими дифференциальными уравнениями:

$$\frac{da}{dt} = k_1 x - k_1 (e_0 - x) a, \quad (7)$$

$$\frac{dx}{dt} = (k_1 a + k_{-2} p) (e_0 - x) - (k_{-1} + k_2) x, \quad (8)$$

$$\frac{dp}{dt} = k_2 x - (k_{-2} (e_0 - x) + k_3) p. \quad (9)$$

Приведенные выше дифференциальные уравнения были аппроксимированы со ступенью 1/16 мин с помощью программы MatLab (версия 5.2, MathWorks, Inc). Параметры модели, продуцирующие наименьшее остаточное отклонение (*RD*) от экспериментальных данных были использованы для кинетического анализа поглощения NO_3^- .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетику поглощения NO_3^- проростками кукурузы изучали двумя способами: 1) анализируя концентрационную зависимость скорости поглощения и 2) убывание NO_3^- из раствора во времени.

Скорость поглощения NO_3^- (мкмоль/г ч) и убывание NO_3^- из раствора (мкмоль/г) являются производными одних и тех же данных – изменения концентрации NO_3^- в растворе. Анализ концентрационной зависимости поглощения NO_3^- с помощью уравнения Михаэлиса–Ментен показал, что кинетические параметры V_{max} и K_m , рассчитанные для скорости поглощения, не позволяют удовлетворительно описать убывание NO_3^- из раствора (рис. 2а), и, наоборот, использование параметров, рассчитанных для убывания NO_3^- из раствора, приводило к существенному отклонению модели от реальной скорости поглощения (рис. 2б). Значения *RD*, показанные на рис. 2, дают информацию о степени соответствия модели экспериментальным данным.

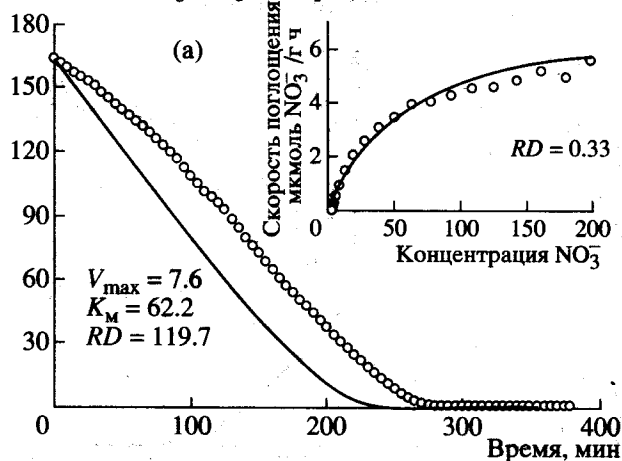
Поскольку измерения поглощения нитрата по убыванию из раствора представляют типичные

non-steady-state условия, полученные данные были анализированы с помощью Briggs-Haldane дифференциальных уравнений. Однако это не привело к улучшению соответствия модели (данные не показаны). Поскольку нетто-поглощение представляет результат притока NO_3^- в клетки корня и оттока в окружающий раствор, рассматривалась возможность использования уравнения Михаэлиса–Ментен для обратимых реакций. Это уравнение предсказывало установление равновесия между цитоплазмой и окружающим раствором, что не наблюдалось *in vivo*, по-видимому, вследствие ассимиляции NO_3^- , транспорта в побег и вакуоль. Дополнительная ступень, связывающая цитоплазматический NO_3^- , была добавлена к уравнению Михаэлиса–Ментен (рис. 1б), что позволило значительно улучшить качество подгонки модели, а также одновременно описать концентрационную зависимость скорости поглощения и убывание NO_3^- из раствора (рис. 3).

Работу модели изучали, изменяя ее параметры: количество переносчиков [Т], константы скоростей $k_1 \dots k_3$ и цитоплазматическую концентрацию $[\text{NO}_3^-]_{\text{цит}}$. На рис. 4 смоделировано убывание NO_3^- из раствора 1 мМ NO_3^- при изменении [Т], k_1 и $[\text{NO}_3^-]_{\text{цит}}$. Анализ экспериментальных данных показал, что модель удовлетворительно описывает поглощение NO_3^- в различных условиях при изменении трех перечисленных выше параметров. Примеры анализа приведены на рис. 5. Проростки, предобработанные возрастающими концентрациями нитрата (эксперимент 1), характеризовались последующим снижением скорости поглощения NO_3^- . Анализ данных с помощью предложенной модели показал снижение количества переносчиков [Т] по мере увеличения концентрации NO_3^- во время предобработки (рис. 5а).

Снижение скорости поглощения NO_3^- также отмечалось при повышении pH раствора (эксперимент 2). Модель позволила описать влияние pH на поглощение NO_3^- за счет уменьшения константы скорости k_1 (рис. 5б). Увеличение длительности предобработки проростков в растворе 1 мМ NO_3^- (эксперимент 3) приводило к последующему снижению скорости поглощения и усилению оттока NO_3^- из клеток корня в раствор (рис. 5в). Соответствие модели экспериментальным данным было достигнуто путем увеличения цитоплазматической концентрации NO_3^- . Необходимо отме-

Убывание NO_3^- из раствора, мкмоль/г



Убывание NO_3^- из раствора, мкмоль/г

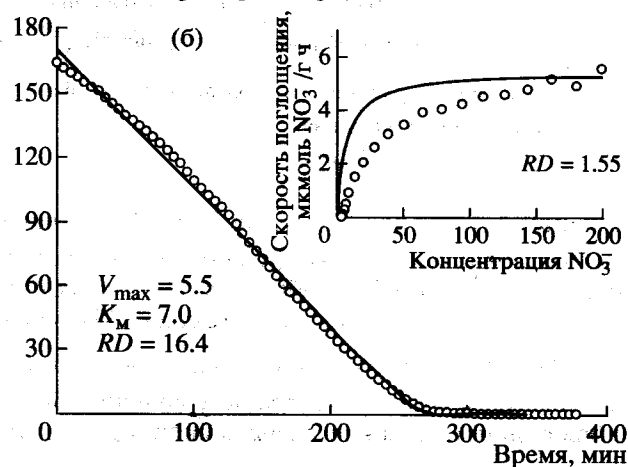


Рис. 2. Анализ поглощения NO_3^- с помощью модели Михаэлиса–Ментен (эксперимент 1). Кинетические параметры V_{\max} (мкмоль/г ч) и K_M (μМ) рассчитаны для концентрационной зависимости скорости поглощения NO_3^- методом наименьших квадратов (а), V_{\max} и K_M рассчитаны для убывания NO_3^- из раствора (б).

тить, что значения $[\text{NO}_3^-]_{\text{цит}}$, приведенные на рис. 3, 4 и 5в, представляют модельные параметры, а не абсолютные значения концентраций.

В большинстве предыдущих работ кинетический анализ поглощения NO_3^- сводился к описанию концентрационной зависимости с помощью алгебраического уравнения Михаэлиса–Ментен (уравнение 4). V_{\max} и K_M рассчитывались методом наименьших квадратов [14, 16, 19, 30] или путем линеаризации уравнения Михаэлиса–Ментен [14, 17, 31]. Преимущества и недостатки этих методов рассмотрены в работе [32]. V_{\max} и K_M также могут

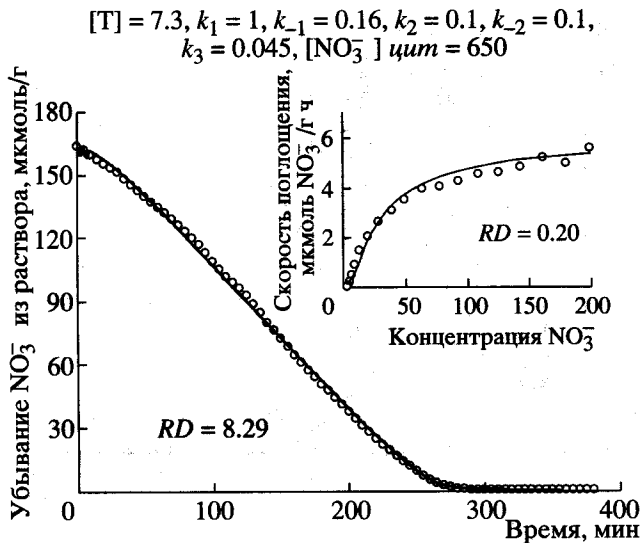


Рис. 3. Модель с участием переносчика, позволяющая одновременно описать скорость поглощения NO_3^- и убывание NO_3^- из раствора. Вверху приведены параметры модели и их значения.

быть рассчитаны для убывания NO_3^- из раствора с использованием интегрированного уравнения Михаэлиса–Ментен, преобразованного в форму Hanes–Wolf [33]. В работе Laine с соавт. [34] убывание NO_3^- из раствора было описано полиномом 5-й степени, и соответствующие уравнения были дифференцированы для расчета скорости поглощения NO_3^- . Для рассчитанных скоростей V_{max} и K_m были определены с использованием линейного графика Hanes–Wolf [34]. Такой подход к анализу данных содержит серьезное противоречие: концентрационная зависимость скорости поглощения и убывание NO_3^- из раствора не могут быть описаны одной и той же моделью, поскольку модель Михаэлиса–Ментен не описывается полиномом 5-й степени. Что может быть причиной такого противоречия? В качестве возможной причины рассматривалось отклонение условий эксперимента от steady-state. Как известно, использование алгебраической формы уравнения Михаэлиса–Ментен справедливо в условиях steady-state [32], когда концентрация NO_3^- в растворе не изменяется в течение измерения (например, в кратковременных экспериментах с изотопами $^{13}\text{NO}_3^-$ и $^{15}\text{NO}_3^-$). В случае измерения поглощения NO_3^- по убыванию из раствора (non-steady-state) V_{max} и K_m должны быть рассчитаны путем решения дифференциальных уравнений (уравне-

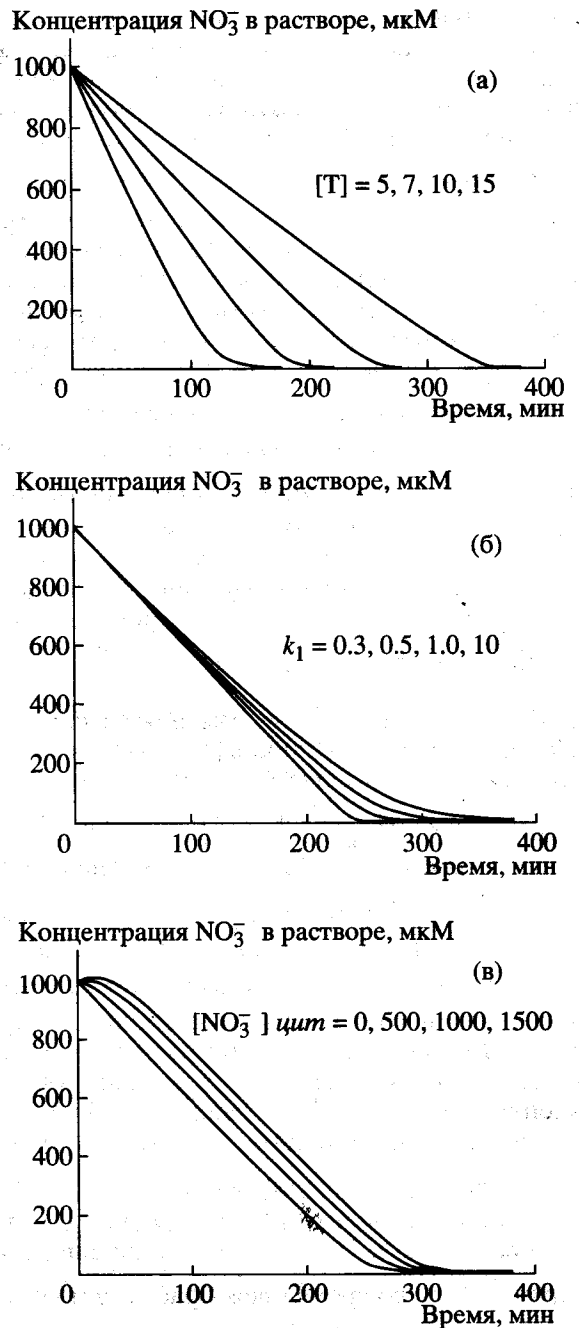


Рис. 4. Чувствительность предложенной модели к изменению параметров: (а) количества переносчиков [T]; (б) константы скорости связывания k_1 ; (в) цитоплазматической концентрации нитрата $[\text{NO}_3^-]_{\text{цит}}$.

ния 1–3). Дифференцирование уравнения Михаэлиса–Ментен, однако, не позволило удовлетворительно описать скорость поглощения и убывание NO_3^- из раствора. Поскольку модельные кривые принципиально не отличались от показанных на рис. 5а, результаты анализа для non-steady-state в работе не приводятся.

В качестве другой причины отклонения экспериментальных данных от модели Михаэлиса-Ментен рассматривался отток NO_3^- из клеток корня. Показано, что отток индуцируется в присутствии NO_3^- в среде [23] и увеличивается при повышении внутриклеточной концентрации NO_3^- [24]. Отток NO_3^- из клеток корня происходит по электрохимическому градиенту, однако участие в этом процессе ионных каналов не было экспериментально показано. Теоретически отток NO_3^- из клетки в окружающий раствор может обеспечиваться тем же переносчиком, что и приток. Модель Михаэлиса-Ментен для обратимых реакций была рассмотрена в качестве возможного механизма притока и оттока. Этот механизм предсказывал установление равновесия между $[\text{NO}_3^-]_{\text{наруж}}$ и $[\text{NO}_3^-]_{\text{цит}}$ по мере аккумуляции нитрата в клетке. При таком равновесии приток NO_3^- равен оттоку, а нетто-поглощение – нулю. Это не наблюдалось в экспериментальных условиях, поскольку NO_3^- , поступивший в клетки корня, подвергался восстановлению, аккумуляции в вакуоли, а также транспорту в побег. После того, как к модели была добавлена дополнительная ступень, связывающая цитоплазматический NO_3^- , стало возможным описать концентрационную зависимость скорости поглощения и убывание NO_3^- из раствора с помощью одной модели (рис. 3).

Дальнейшие исследования показали, что модель с участием переносчика, транспортирующего NO_3^- в двух направлениях, позволяет успешно анализировать механизм регуляции поглощения NO_3^- в разных экспериментальных условиях. Известно, что обработка проростков в растворах с высокой концентрацией NO_3^- приводит к снижению синтеза переносчиков нитрата [7]. Анализ поглощения NO_3^- проростками, предобработанными возрастающими концентрациями NO_3^- (рис. 5а), обнаружил изменение количества переносчиков в зависимости от условий предобработки. В ряде работ было показано снижение скорости поглощения NO_3^- вследствие повышения pH раствора [35–37]. Эффект pH, наблюдаемый в данном исследовании, удовлетворительно описывался предложенной моделью при изменении констант скоростей, k_1 или k_2 (рис. 5б). С точки зрения механизма, изменение k_1/k_2 может быть результатом

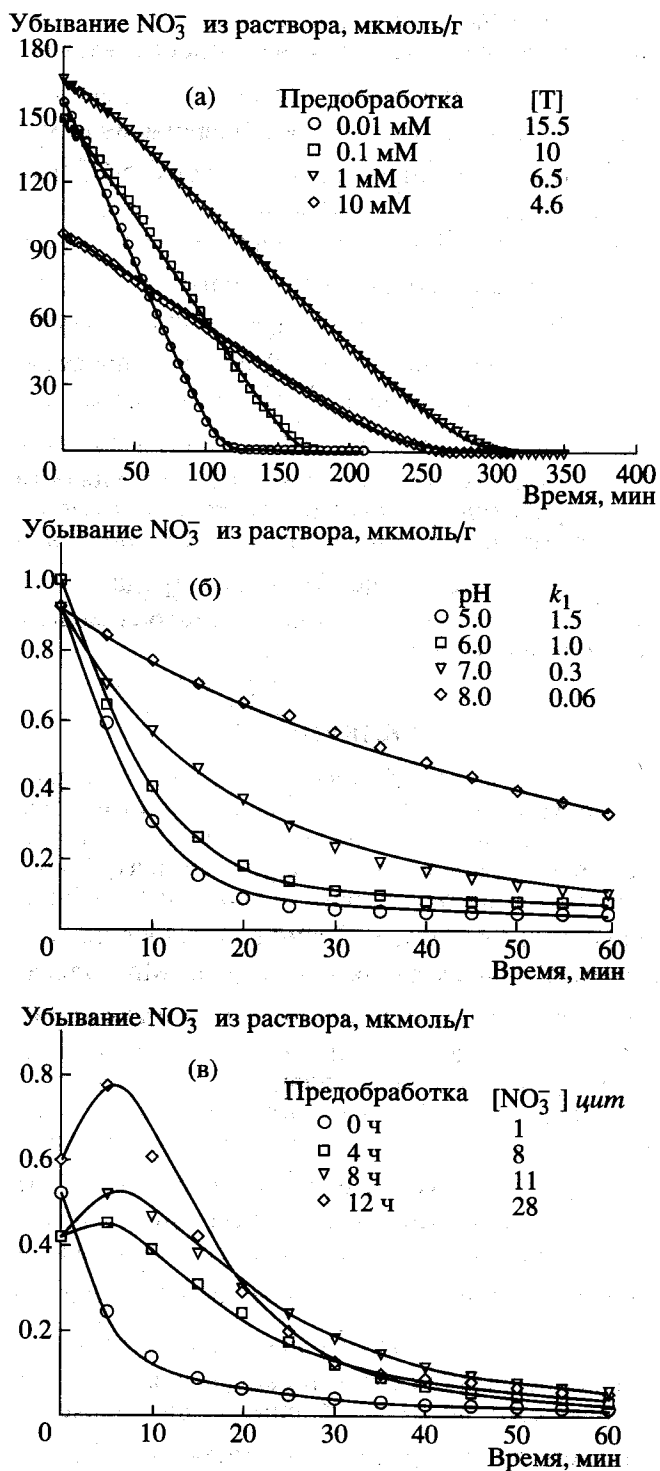


Рис. 5. Использование модели с участием переносчика для анализа убывания NO_3^- из раствора: (а) с начальной концентрацией 1 мМ NO_3^- ; предобработка в течение 24 ч в растворах, содержащих 0.01, 0.1, 1 и 10 мМ NO_3^- (эксперимент 1); (б) содержащего 0.01 мМ NO_3^- , pH 5.0, 6.0, 7.0 и 8.0 (эксперимент 2); (в) содержащего 0.01 мМ NO_3^- , pH 5.0, предобработка в растворе 1 мМ NO_3^- , pH 5.0 в течение 0, 4, 8 и 12 ч (эксперимент 3).

протонирования/депротонирования переносчика, что, в свою очередь, влияет на скорость связывания NO_3^- с переносчиком. Количество переносчиков при этом не изменяется. Предложенная модель позволяет также описать отток NO_3^- как функцию цитоплазматической концентрации нитрата (рис. 5в). Обработка проростков в растворе с высокой концентрацией NO_3^- приводила к оттоку ионов после перенесения растений в раствор с низкой концентрацией NO_3^- . Исследование показало, что этот отток нельзя объяснить только выходом NO_3^- из апопласта, поскольку амплитуда оттока возрастала с увеличением длительности предобработки. Предложенная модель позволила описать полученные данные в условиях повышения цитоплазматической концентрации NO_3^- , тогда как изменения других параметров модели были незначительными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что уравнение Михаэлиса–Ментен, традиционно используемое для анализа кинетики поглощения ионов, не может одновременно описать концентрационную зависимость скорости поглощения и убывание NO_3^- из раствора. Причины отклонения экспериментальных данных от модели Михаэлиса–Ментен вызваны оттоком NO_3^- из клеток корня, а также связыванием цитоплазматического нитрата в процессе ассимиляции, аккумуляции и транспорта в побег. Предложена модель, основанная на функционировании переносчика, транспортирующего NO_3^- в двух направлениях. Работа переносчика может регулироваться эндогенными и экзогенными факторами за счет изменения количества переносчиков, их сродства к NO_3^- и цитоплазматической концентрации NO_3^- . Возможны также изменения скорости связывания цитоплазматического нитрата, например, при снижении дальнего транспорта или ассимиляции NO_3^- , однако, экспериментальные данные по этому вопросу пока не получены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соколов О.А., Семенов В.М., Агаев В.А. Нитраты в окружающей среде. Пущино, ОНТИ НЦБИ, 1990. 316 с.
2. Звягинцев Д.Г. Почва и микроорганизмы. М.: Изд-во МГУ, 1987. 256 с.
3. Andrews M. The partitioning of nitrate assimilation between root and shoot of higher plants // *Plant Cell Environ.* 1986. № 9. P. 511–519.
4. Clarkson D.T. Regulation of the absorption and release of nitrate by plant cells: A review of current ideas and methodology // *Fundamental, Ecological and Agricultural Aspects of Nitrogen Metabolism in Higher Plants.* Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, 1986. P. 3–27.
5. Larrson C.-M. Responses of the nitrate uptake system to external nitrate availability: a whole plant perspective // *A Whole Plant Perspective on Carbon–Nitrogen Interactions.* The Hague: SPB Academic Publishing, 1993. P. 1–15.
6. Glass A.D.M., Siddiqi M.Y. Nitrogen absorption by plant roots // *Nitrogen Nutrition in Higher Plants.* New Delhi: Associated Publishing Co., 1995. P. 21–56.
7. Crawford N.M., Glass A.D.M. Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants // *Trends Plant Sci.* 1998. V. 3. P. 389–395.
8. Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford N.M. The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter // *Cell.* 1993. V. 72. P. 705–713.
9. Wang R., Crawford N.M. Genetic identification of a gene involved in constitutive, high-affinity nitrate transport in higher plants // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 9279–9301.
10. Amarasinghe B.H.R.R., Bruxelles G.L., Braddon M. et al. Regulation of *GmNRT2* expression and nitrate transport activity in roots of soybean (*Glycine max*) // *Planta.* 1998. V. 206. P. 44–52.
11. Sanders D., Hopgood M., Jennings I.R. Kinetic response of H^+ -coupled transport to extracellular pH: Critical role of cytosolic pH as a regulator // *J. Membr. Biol.* 1989. V. 108. P. 253–261.
12. Meharg A.A., Blatt M.R. NO_3^- transport across the plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs: kinetic control by pH and membrane voltage // *J. Membr. Biol.* 1995. V. 145. P. 49–66.
13. Roblin G., Sakr S., Bonmort J., Delrot S. Regulation of a plant membrane sucrose transporter by phosphorylation // *FEBS Lett.* 1998. V. 424. P. 165–168.
14. Lee R.B., Drew M.C. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. II. Effect of plant N-status on the kinetic parameters of nitrate influx // *J. Exp. Bot.* 1986. V. 37. P. 1768–1779.
15. Siddiqi M.Y., Glass A.D.M., Ruth T.J., Ruffy T.W.Jr. Studies of the uptake of nitrate in barley. I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. P. 1426–1432.
16. Hole D.J., Emran A.M., Fares Y., Drew M.C. Induction of nitrate transport in maize roots and kinetics of influx, measured with nitrogen-13 // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. P. 642–647.
17. Aslam M., Travis R.L., Huffaker R.C. Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) seedlings // *Plant Physiol.* 1992. V. 99. P. 1124–1133.

18. Zhang N., MacKown C.T. Nitrate fluxes and nitrate reductase activity of suspension-cultured tobacco cells // *Plant Physiol.* 1993. V. 102. P. 851–857.
19. Ivashikina N.V., Sokolov O.A. Regulation of nitrate uptake and distribution in maize seedlings by nitrate, nitrite, ammonium and glutamate // *Plant Sci.* 1997. V. 123. P. 29–37.
20. Харитонашвили Е.В., Алехина Н.Д. Поступление нитрата: механизм вход/выход. Ионный транспорт и усвоение элементов минерального питания растениями. Киев: Наукова думка, 1991. С. 41.
21. Deane-Drummond C.E., Glass A.D.M. Short term studies of nitrate uptake into barley plants using ion-specific electrodes and $^{36}\text{ClO}_3^-$. I. Control of net uptake by NO_3^- efflux // *Plant Physiol.* 1983. V. 73. P. 100–104.
22. Teyker R.H., Jackson W.A., Volk R.J., Moll R.H. Exogenous $^{15}\text{NO}_3^-$ influx and endogenous $^{14}\text{NO}_3^-$ efflux by two maize (*Zea mays* L.) inbreds during nitrogen deprivation // *Plant Physiol.* 1998. V. 86. P. 778–781.
23. Aslam M., Travis R.L., Rains W. Evidence for substrate induction of a nitrate efflux system in barley roots // *Plant Physiol.* 1996. V. 112. P. 1167–1175.
24. Lee R.B., Clarkson D.T. Nitrogen-13 studies of nitrate fluxes in barley roots. I. Compartmental analysis from measurements of ^{13}N efflux // *J. Exp. Bot.* 1986. V. 37. P. 1753–1767.
25. Breteler H., Nissen P. Effect of exogenous and endogenous nitrate concentration on nitrate utilization by dwarf bean // *Plant Physiol.* 1982. V. 70. P. 754–779.
26. Cardenas-Navarro R., Adamowicz S., Gojon A., Robin P. Modelling nitrate influx in young tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plants // *J. Exp. Bot.* 1999. V. 50. P. 625–653.
27. Nissen P. Multiphasic uptake mechanisms in plants // *Int. Rev. Cytol.* 1991. V. 126. P. 89–134.
28. Nissen P., Martin-Nieto J. “Multimodal” kinetics: Cyanobacterial nitrate reductase and other enzyme, transport and binding systems // *Physiol. Plant.* 1998. V. 104. P. 503–511.
29. Егорова Н.Н., Ивашикина Н.В., Васильчиков В.В., Соколов О.А. Кинетический анализ поглощения нитрата проростками кукурузы // *Физиология растений.* 1995. Т. 42. № 4. С. 518–525.
30. Pace G.M., McClure P.R. Comparison of nitrate uptake kinetic parameters across maize inbred lines // *J. Plant Nutr.* 1986. V. 9. P. 1095–1111.
31. Warner R.L., Huffaker R.C. Nitrate transport is independent of NADH and NAD(P)H nitrate reductase in barley seedlings // *Plant. Physiol.* 1989. V. 91. P. 947–953.
32. Cornish-Bowden A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics.* London: Portland Press Ltd., 1995. P. 20–53.
33. Aguera E., de la Haba P., Fontes A.G., Maldonado J.M. Nitrate and nitrite uptake and reduction in intact sunflowers plants // *Planta* 1990. V. 182. P. 149–154.
34. Laine P., Ourry A., Macduff J., Boucaud J., Salette J. Kinetic parameters of nitrate uptake by different catch crop species: Effect of low temperatures or previous nitrate starvation // *Physiol. Plant.* 1993. V. 88. P. 85–92.
35. Rao K.P., Rains D.W. Nitrate absorption by barley. I. Kinetics and energetics // *Plant Physiol.* 1976. V. 57. P. 55–58.
36. Deane-Drummond C.E. Mechanism of nitrate uptake into *Chara corallina* cells: lack of evidence for obligatory coupling to proton pump and a new $\text{NO}_3^-/\text{NO}_3^-$ exchange model // *Plant Cell Environ.* 1984. № 7. P. 317–323.
37. McClure P.R., Kochian L.V., Spanswick R.M., Shaff J.E. Evidence for cotransport of nitrate and protons in maize roots. II. Measurement of NO_3^- and H^+ fluxes with ion-selective microelectrodes // *Plant Physiol.* 1990. V. 93. P. 290–294.