

AGNIESZKA GNIAZDOWSKA^{1, 2}

¹*Zakład Bioenergetyki Roślin*

*Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski
Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa*

²*Katedra Fizjologii Roślin*

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

e-mail: agniazdowska@alpha.sggw.waw.pl

ROLA TLENKU AZOTU W METABOLIZMIE KOMÓRKI ROŚLINNEJ

WSTĘP

W ostatnich latach chyba najbardziej intensywnie badaną cząsteczką sygnałną jest tlenek azotu (NO). Od 1998 r., gdy przyznano nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii za wkład w badania nad rolą tego związku w układzie naczyniowo-sercowym człowieka, wzrosło zainteresowanie znaczeniem NO także w organizmach roślinnych. Pomimo krótkiego czasu prowadzenia badań nad rolą NO w fizjologii roślin (pierwsza praca DURNERA i współaut. mówiąca o udziale tlenku azotu w odpowiedzi roślin na atak patogenu ukazała się w 1998 r.) możemy mówić o istotnym znaczeniu tego związku dla funkcjonowania komórki roślinnej. W latach 2003–2004 ukazały się prace dotyczące m.in. identyfikacji syntazy NO (NOS) w komórkach roślinnych, rzucające nowe światło na to zagadnienie i odpowiadające na szereg pytań o znaczenie NO w roślinach. Daleko jednak jeszcze do pełnego i kompleksowego opisu roli tej cząsteczki w metabolizmie roślin.

Tlenek azotu NO jest wolnym rodnikiem. W obecności tlenu NO jest nietrwały. W natlenionych roztworach wodnych okres półtrwania NO wynosi kilka sekund, gdyż w tych warunkach tlenek azotu reaguje z tlenem tworząc dwutlenek azotu, brązowy gaz będący wolnym rodnikiem. Dwutlenek azotu reaguje z organicznymi związkami nienasyconymi tworząc

wolne rodniki, z niesparowanym elektronem na atomie węgla. Dalsze reakcje, w których uczestniczą rodniki, prowadzą do powstawania rodników ponadtlenkowych ROO, alkoksyloowych RO i kolejnych cząsteczek dwutlenku azotu. Tlenek azotu łatwo reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym $O_2^{\cdot-}$, w wyniku czego powstaje nadtlendioazotyn $ONOO^-$. Nadtlendioazotyn jest nietrwały w zakresie fizjologicznego pH, lecz ze względu na stosunkowo długi okres półtrwania (ok. 1s) może dyfundować na znaczne odległości w komórce. Nadtlendioazotyn reaguje łatwo z grupami tiolowymi białek i wielonienasyconymi resztami kwasów tłuszczowych w lipidach wywołując poważne uszkodzenia struktur komórkowych (WENDEHENNE i współaut. 2001). Reakcją charakterystyczną dla nadtlendioazotynu jest nitrylowanie reszt tyrozylowych w białkach, katalizowane przez jony metali przejściowych (BARTOSZ 1995).

W komórkach ssaków NO jest produkowany przez enzym – syntazę tlenku azotu (NOS), występującą w kilku izoformach (NATHAN i XIE 1994). Substratem NOS jest tlen cząsteczkowy i L-arginina, produktami reakcji – cząsteczka NO i aminokwas L-cytrulina. Badania ostatnich lat wykazały, że rośliny posiadają enzym pełniący podobną funkcję jak NOS w komórkach zwierzęcych (katalizujący tworzenie NO

z L-argininy) (CUETO i współaut. 1996, BARROSO i współaut. 1999). Aktywność ta jest hamowana przez podanie specyficznych inhibitorów zwierzęcych syntaz tlenku azotu (CUETO i współaut. 1996). U kukurydzy zidentyfikowano białko o masie 166 kDa, reagujące z przeciwciałami przeciwko króliczej neuronalnej izoformie NOS, jak i z przeciwciałami przeciwko mysiej indukowalnej izoformie NOS (RIBEIRO i współaut. 1999). Nie udało się jednak wyizolować białka ani genu wykazującego homologię do zwierzęcej NOS (DURNER i KLESSIG 1999). CHANDOK i współaut. (2003) zaobserwowali, że atak patogenu indukuje aktywność enzymu odpowiedzialnego za syntezę NO u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) i tytoniu (*Nicotiana tabacum*). Enzym ten wykazuje analogię do jednej z form białka P – dekarboksylazy glicyny. Okazuje się więc, że sekwencja roślinnych białek NOS jest całkowicie różna od sekwencji ich ssaczych odpowiedników (CHANDOK i współaut. 2003). GUO i współaut. (2003) wyizolowali gen *AtNOS1* kodujący enzym o aktywności syntazy tlenku azotu. Produkt genu *AtNOS1* rzodkiewnika był podobny do białka zaangażowanego w syntezę NO u ślimaka *Helix pomatia*. Nie wykazywał natomiast

homologii do ssaczej indukowanej NOS, chociaż jego funkcjonalna charakterystyka była zbliżona. Aktywność tego enzymu zależała od NADP (fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego) i tak jak w przypadku konstytutywnych izoform ssaczych NOS, od kalmoduliny i jonów Ca^{2+} (GUO i współaut. 2003). Nie zaobserwowano stymulacji aktywności enzymu w obecności specyficznych kofaktorów ssaczych NOS, takich jak: tetrahydrobiopteryna, hem, FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy), FMN (mononukleotyd flawinowy) (GUO i współaut. 2003).

Tlenek azotu powstaje nie tylko w reakcjach katalizowanych przez syntazę tlenku azotu. Alternatywnym źródłem NO jest reakcja redukcji jonów azotanowych zachodząca w komórkach bakterii, grzybów i roślin. NO jest też jednym z produktów asymilacji azotanów i oddychania. W warunkach fizjologicznych rośliny są ekspozowane na działanie NO produkowanego przez mikroorganizmy glebowe. Uwalnianie NO do atmosfery zachodzi w reakcjach nitryfikacji i denitryfikacji. Nitryfikacja NH_4^+ jest głównym źródłem N_2 emitowanego do atmosfery, gdzie ulega on utlenieniu do NO i NO_2 (WOJTASZEK 2000).

ROLA NO W REGULACJI METABOLIZMU KOMÓRKI ROŚLINNEJ

Tlenek azotu jest cząsteczką biorącą udział w regulacji różnorodnych procesów w komórkach roślinnych, takich jak: wzrost i rozwój, metabolizm oddechowy, reakcja na patogeny, procesy starzenia i dojrzewania oraz odpowiedź roślin na warunki stresowe (LAMATTINA i współaut. 2003) (Tabela 1). Cząsteczka NO pełni w tych procesach między innymi rolę sygnałową (DURNER i KLESSIG 1999, LAMATTINA i współaut. 2003). Transdukcja sygnału NO w komórkach roślinnych odbywa się, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, przez cGMP (cykliczny guanozynomonofosforan) i aktywację cyklazy guanylanowej (DURNER i współaut. 1998, DURNER i KLESSIG 1999, WENDEHENNE i współaut. 2001). Obszerny opis działania NO, z uwzględnieniem roli sygnałowej tej cząsteczki

znajdzie zainteresowany Czytelnik w pracy przeglądowej opublikowanej w Postęпах Biologii Komórki (MATKOWSKI 2002). Stężenia w jakich NO wykazuje funkcję fizjologiczną są dużo niższe niż optymalne stężenia mikro- i makroelementów oraz witamin i wahają się w granicach 10^{-10} – 10^{-6} M (BELIGNI i LAMATTINA 2001). Produkcja tlenku azotu oznaczona w nietraktowanych liściach rzodkiewnika, wyki (*Vicia faba*) i chińskiej róży (*Hibiskus rosa-sinensis*) wynosiła 1–18 $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ i wzrastała w obecności jonów azotanowych, sugerując zaangażowanie reduktazy azotanowej w syntezę NO (VANIN i współaut. 2004). Ten fizjologiczny (podstawowy) poziom NO w tkance był zawsze niższy niż stężenie NO obserwowane po ataku patogenu (VANIN i współaut. 2004).

DWA OBLICZA TLENKU AZOTU

Obecność niesparowanego elektronu w cząsteczce sprawia, że tlenek azotu wykazuje własności cytotoksyczne bądź pełni funkcję ochronną (BELIGNI i LAMATTINA 1999a, b, c).

Niszcząca rola NO w komórce wynika prawdopodobnie z faktu, że cząsteczka ta łatwo reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym tworząc nadtlenoazotyn, reagujący z

Tabela 1. Przykłady różnorodnej aktywności NO w roślinach.

Reakcja fizjologiczna	Tkanka	Roślina	Cytowana literatura
Zapobieganie chlorozom powstającym w odpowiedzi na podanie herbicydów (methylviologen), zapobieganie powstawaniu nekroz wywołanych infekcją patogenem	liście	Ziemniak (<i>Solanum tuberosum</i>)	BELIGNI i LAMATTINA 1999a, c
Indukcja programowanej śmierci komórkowej, fragmentacji DNA	liście, kallus zawieszina komórkowa	Cis (<i>Taxus brevifolia</i>), Rzodkiewnik (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	PEDROSO i współaut. 2000a, b CLARKE i współaut. 2002
Wzrost odporności na zasolenie i wysoką (50°C) temperaturę	siewki, liście	Ryż (<i>Oryza sativa</i>)	UCHIDA i współaut. 2002
Wzrost odporności na suszę, ruch aparatów szparkowych	liście	Pszenica (<i>Triticum aestivum</i>)	GARCIA-MATA i LAMATTINA 2001
Wzmoczona ekspresja genu kodującego PAL (amoniakolizaza L-fenylalaniny), wzrost poziomu cGMP (cykliczny guanyzomonofosforan), Regulacja aktywności akonitazy	liście, zawieszina komórkowa	Tytoń (<i>Nicotiana tabacum</i>)	DURNER i współaut. 1998, NAVARRE i współaut. 2000
Regulacja procesów dojrzewania owoców i starzenia tkanek	owoce	Awokado (<i>Persea americana</i>), banan (<i>Musa sapientum</i>), kiwi (<i>Actinidia chinensis</i>) Truskawka (<i>Fragaria ananassa</i>)	LESHEM i współaut. 1998 WILLS i współaut. 2000
Hamowanie aktywności drogi cytochromowej i fosforylacji oksydacyjnej	hypokotyle etiolowanych siewek	Fasolnik chiński (<i>Vigna radiata</i>)	YAMASAKI i współaut. 2001
Regulacja procesów oddechowych, wyrzut cytochromu c z mitochondriów, Indukcja transkrypcji genu <i>AOX1a</i> kodującego białko alternatywnej oksydazy (AOX)	zawieszina komórkowa	Marchew (<i>Daucus carota</i>) Rzodkiewnik (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	ZOTTINI i współaut. 2002 HUANG i współaut. 2002
Wzrost i różnicowanie komórek	liście, korzenie	Kukurydza (<i>Zea mays</i>)	RIBEIRO i współaut. 1999
Inicjacja tworzenia korzeni przybyszowych	hypokotyle	Ogórek (<i>Cucumis sativus</i>)	PAGNUSSAT i współaut. 2002
Fotomorfogeneza, stymulacja kiełkowania nasion, hamowanie wzrostu wydłużeniowego hypokotyli, de-etiolacja (synteza chlorofilu)	nasiona, hypokotyle, liście	Salata (<i>Lactuca sativa</i>), Rzodkiewnik (<i>Arabidopsis thaliana</i>), Pszenica (<i>Triticum aestivum</i>)	BELIGNI i LAMATTINA 2000
Ruchy aparatów szparkowych	liście	Groch (<i>Pisum sativum</i>)	NEILL i współaut. 2002a
Hamowanie fotofosforylacji	liście	Szpinak (<i>Spinacia oleracea</i>)	TAKAHASHI i YAMASAKI 2002

DNA, białkami i grupami tiolowymi, co jest bezpośrednią przyczyną hamowania aktywności enzymów i degradacji struktur komórkowych.

Jednak reakcje NO z reaktywnymi formami tlenu (RFT) mogą wywoływać nie tylko efekty destrukcyjne dla komórki, ale też zapobiegać rozprzestrzenianiu się uszkodzeń wywołanych przez inne wolne rodniki, w szczególności przez anionorodnik ponadtlenkowy (BELIGNI i LAMATTINA 1999b, BEERS i MCDOWELL 2001, NEILL i współaut. 2002b). Zależy to od stosunku stężenia NO do RFT. Udowodniono, że w warunkach uszkodzeń komórki wywołanych przez RFT, NO może przerywać łańcuch reakcji prowadzących do tworzenia kolejnych RFT i tym samym ograniczyć rozmiary wywołanych przez nie zmian. Funkcję ochronną NO wykazano w badaniach, w których reaktywne formy tlenu okazały się bardziej toksyczne niż NO i anion kwasu nadtlenuazotowego (WINK i współaut. 1993). W doświadczeniach prowadzonych na liściach ziemniaka (*Solanum tuberosum*) traktowanych NO obserwowano zahamowanie chlorozy spowodowanej przez RFT, powstałe po podaniu herbicydu. W przypadku infekcji liści ziemniaka przez patogen podanie NO spowodowało ograniczenie wycieku elektrolitów z komórki, fragmentacji DNA i w rezultacie zmniejszenie liczby komórek wchodzących na drogę apoptozy (BELIGNI i LAMATTINA 1999c). DELLEDONNE i współaut. (2002) zaproponowali model współdziałania NO i $O_2^{\cdot-}$ w reakcji nadwrażliwości roślin (ang. hypersensitive response, HR). Reakcja ta polega na gwałtownym zamieraniu komórek, które weszły w kontakt z patogenem lub znajdują się w jego bezpośrednim sąsiedztwie. Prowadzi to do pojawienia się nekroz, co uniemożliwia rozprzestrzenianie się patogenu do nie porażonych części rośliny. Wydaje się, że w przypadku komórek roślinnych program śmierci komórkowej jest aktywowany w sytuacji zbalansowanej równowagi pomiędzy stężeniami NO i H_2O_2 , a nie zależy bezpośrednio od stężenia $O_2^{\cdot-}$.

NO podany zewnątrzkomórkowo hamował produkcję H_2O_2 indukowaną stresem zranienia, a także obniżał ekspresję genu *IPO* indukowanego zranieniem w liściach batata (*Ipo-*

moea battatas) (JIH i współaut. 2003). Wydaje się, że NO może regulować nie tylko poziom H_2O_2 , ale także syntezę tej cząsteczki w warunkach stresu mechanicznego (JIH i współaut. 2003).

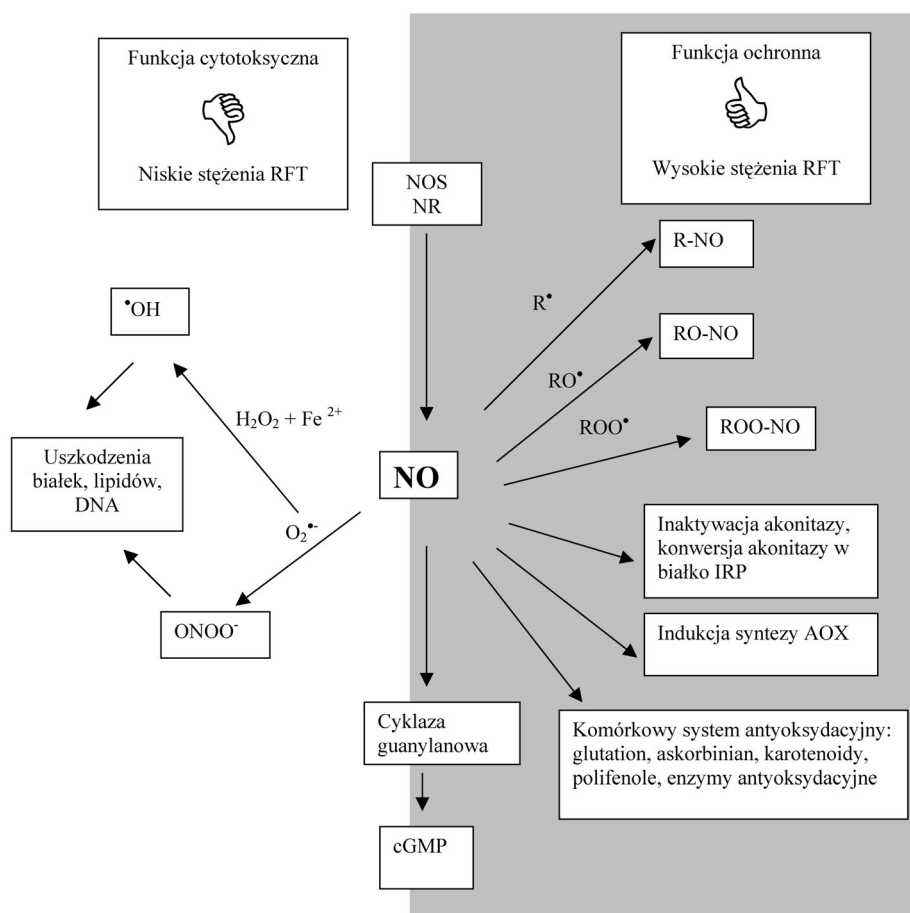
Wyniki badań wykonanych na nasionach i siewkach łubinu (*Lupinus luteus*) wskazują na ochronną rolę NO w warunkach stresu osmotycznego oraz w obecności metali ciężkich: cynku i kadmu (KOPYRA i GWÓŹDŹ 2003). Autorzy sugerują, że może być to związane ze zwiększeniem aktywności enzymów antyoksydacyjnych głównie dysmutazy ponadtlenkowej, w obecności donora NO. Podobne wyniki uzyskano na siewkach ryżu (*Oryza sativa*) traktowanych NO w niskim (1 M) stężeniu. Zaobserwowano prawie dwukrotne zwiększenie aktywności enzymów systemu antyoksydacyjnego: katalazy, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy glutationowej, dysmutazy ponadtlenkowej, co zapobiegało powstawaniu uszkodzeń wywołanych przez późniejsze umieszczenie roślin w warunkach stresu solnego i wysokiej temperatury (UCHIDA i współaut. 2002).

Hamowanie przez NO aktywności niektórych enzymów może być korzystne dla komórki. Dzieje się tak w przypadku akonitazy, której inaktywacja przez NO powoduje obniżenie napływu elektronów na łańcuch mitochondrialny i tym samym zapobiega stresowi oksydacyjnemu. Co więcej, NO aktywuje przekształcenie cytosolowej akonitazy w białko IRP (ang. iron regulatory protein) regulujące homeostazę jonów żelazowych w komórce (NAVARRE i współaut. 2000). Jony Fe katalizują reakcję Fentona, prowadzącą do wytwarzania rodników hydroksylowych, zatem ograniczenie dostępności Fe zapobiega stresowi oksydacyjnemu. Można powiedzieć, że chociaż jako wolny rodnik NO pod wieloma względami wykazuje działanie podobne do innych RFT, w pewnych warunkach może zapobiegać rozprzestrzenianiu się stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych (Ryc. 1). Dodatkowo potwierdzają to badania wykonane na chloroplastach poddawanych stresowi foto-oksydacyjnemu, w których wykazano antyoksydacyjne działanie NO polegające na wychwytywaniu RFT (BELIGNI i LAMATTINA 2002).

TLENEK AZOTU A REDUKTAZA AZOTANOWA

W warunkach stresu wywołanego przez infekcję mikroorganizmów NO jest syntetyzowany przy udziale syntazy tlenu azotu, której mechanizm działania i regulacja nie do końca jeszcze zostały poznane (CHANDOK i współaut. 2003, GUO i współaut. 2003). NO może być też wytwarzany na drodze nieenzymatycznej w re-

tezie NO w obecności jonów azotynowych na terenie apoplastu komórek warstwy aleuronowej ziarniaka jęczmienia (*Hordeum vulgare*) (BETHKE i współaut. 2004). Reakcja ta wymagała kwaśnego pH apoplastu i obecności jonów NO_2^- w mieszaninie inkubacyjnej. Autorzy sugerują, że w warunkach naturalnych NO po-



Ryc. 1. Podwójna natura działania tlenu azotu. Reakcje w których NO pełni rolę ochronną (prawa strona) i reakcje w których NO odgrywa rolę cytotoksyczną (lewa strona).

Oznaczenia: R – wolne rodniki, RO – rodnik alkoksylowy, ROO – rodnik ponadtlenowy, cGMP – cykliczny guanozynomonofosforan, AOX – białko oksydazy alternatywnej, NOS – syntaza NO, NR – reduktaza azotanowa, RFT – reaktywne formy tlenu (wg BELIGNIEGO i LAMATTINY 1999b, zmodyfikowana).

akcji chemicznej redukcji NO_2^- w kwaśnym pH lub w reakcji redukcji NO_2^- w obecności karotenoidów na świetle (WOJTASZEK 2000). W warunkach fizjologicznych droga wytwarzania tlenu azotu w reakcji redukcji azotynów w chloroplastach w obecności askorbinianu wydaje się mało prawdopodobna lub wręcz niemożliwa z uwagi na zasadowy odczyn stromy chloroplastów (YAMASAKI 2000). Pojawiło się natomiast doniesienie o nieenzymatycznej syn-

wstający tą drogą z jonów azotynowych obecnych w roztworze glebowym, może zapobiegać rozwojowi patogenów w czasie kiełkowania ziarniaka, co wielokrotnie jest przyczyną zahamowania wschodów.

Nie ma jednak obecnie wątpliwości, że w komórkach roślinnych NO jest syntetyzowany w reakcji katalizowanej przez syntazę tlenu azotu (NOS) lub/i reduktazę azotanową (NR). Reduktaza azotanowa jest enzymem odpowie-

działnym za konstytutywną syntezę NO w nieinfekowanych komórkach roślinnych (YAMASAKI i współaut. 1999, YAMASAKI i SAKIHAMA 2000, MOROT-GAUDRY-TALARMAIN i współaut. 2002). NR jest enzymem cytosolowym, katabolizującym reakcję redukcji azotanów do azotynów w obecności NAD(P)H (fosforan dinukleotydu nikotynoamido-adeninowy – forma zredukowana) jako donora elektronów (CRAWFORD i GLASS 1998). W normalnych warunkach powstające w tej reakcji jony azotynowe są transportowane do plastydów, gdzie przy udziale reduktazy azotynowej (NiR) następuje ich redukcja do jonów amonowych. Syntezę NO przy udziale NR udowodniono w liściach soi (*Glycine max*) (DEAN i HARPER 1988) i kukurydzy (*Zea mays*) (YAMASAKI i współaut. 1999). Wytwarzanie NO w obecności NR jest hamowane po podaniu azotku sodu (NaN_3) – inhibitora NR (YAMASAKI i SAKIHAMA 2000). Z uwagi na to, że NO pełni rolę cząsteczki sygnałowej w komórkach roślinnych istotne wydaje się oszacowanie w jakim stopniu NR uczestniczy w produkcji NO. KAISER i HUBER (2001) podają, że wytwarzanie NO przy udziale NR w obecności NADH (dinukleotyd nikotynoamido-adeninowy – forma zredukowana) i azotynów stanowi tylko około 1% całkowitej aktywności redukcyjnej enzymu. Należy jednak pamiętać, że NO natychmiast reaguje z anionorodnikiem ponadtlenkowym (powstającym w wielu reakcjach na terenie komórki), tworząc nadtlenoazotyn, co może zaniżać wartości oznaczanego stężenia NO. Uwzględniając ubytek NO związany z reakcją tej cząsteczki z anionorodnikiem ponadtlenkowym wykazano, że produkcja NO w liściach wyki, rzodkiewnika i chińskiej róży jest znacznie wyższa (około 20 krotnie) niż oznaczana do tej pory (VANIN i współaut. 2004). Produkcja NO przy udziale NR wymaga specyficznej regulacji aktywności NR i jest ściśle uzależniona od stężenia jonów azotynowych w komórce, co z kolei jest regulowane przez stosunek aktywności NR do NiR (reduktaza azotynowa). Yamasaki i jego grupa, na podstawie wyników badań na kukurydzy sugerują, że NO może być produkowany przy udziale NR w warunkach akumulacji jonów azotynowych w cytoplazmie. Translokacja jonów azotynowych z cytoplazmy do chloroplastu wymaga istnienia różnicy pH po obu stronach błony (ΔpH), a sama redukcja jonów azotynowych obecności zredukowanej ferredoksyny. Oba te warunki są spełnione wtedy, gdy następuje wytwarzanie siły reduk-

cyjnej NAD(P)H w fotosyntetycznym transporcie elektronów. Akumulacja jonów azotynowych i wysoka emisja NO w komórkach roślinnych następuje zatem wówczas, gdy zahamowany jest fotosyntetyczny transport elektronów, w ciemności lub w warunkach fotoinhibicji (YAMASAKI i SAKIHAMA 2000). VANIN i współaut. (2004) sugerują natomiast, że synteza NO katalizowana przez NR w kompleksowy sposób zależy od stosunku zawartości azotynów do azotanów i całkowitego stężenia obu jonów w układzie. Syntezę NO w obecności NR oznaczono również, gdy substratem były jony azotanowe, ale w tym przypadku obserwowano około 30 minutową fazę opóźnienia, wskazującą, że rzeczywistym substratem do syntezy NO katalizowanej przez NR są jony azotynowe (YAMASAKI i SAKIHAMA 2000). Potwierdziły to badania wykonane na komercyjnym enzymie NR kukurydzy (ROCKEL i współaut. 2002). Używając jonów azotanowych jako substratu zaobserwowano emisję NO po około 30 minutach, gdy stężenie azotynów było najwyższe. Aktywność NR oznaczana jako produkcja jonów azotynowych wynosiła 10 nmol min^{-1} , podczas gdy maksymalna produkcja NO jedynie $0,09 \text{ nmol min}^{-1}$. Synteza NO przy udziale roślinnej NR słonecznika (*Helianthus annuus*) oraz liści szpinaku (*Spinacia oleracea*) była niższa w ciemności niż na świetle i stanowiła tylko niewielki procent całkowitej aktywności tkankowej reduktazy azotanowej (ROCKEL i współaut. 2002). Redukcja jonów azotynowych do NO jest procesem jednoelektronowym o nieznanym podłożu molekularnym, nie wiadomo też dlaczego jest ograniczona do tak niskiego poziomu całkowitej aktywności enzymu (ROCKEL i współaut. 2002).

Potranslacyjna regulacja aktywności NR przez fosforylację i wiązanie białka 14-3-3, wpływa na katalizowaną przez NR syntezę NO. Ekstrakt enzymatyczny z pobranych na świetle liści szpinaku inkubowano z 5'-AMP (adenozynomonofosforan) i EDTA (kwas etylenodiaminotetraoctowy), co powodowało całkowitą aktywację białka NR w wyniku defosforylacji i odłączenia białka 14-3-3. Po dodaniu do mieszaniny reakcyjnej NADH i azotanów zaobserwowano emisję NO, która zanikała po około 10 min. Inkubacja ekstraktu z ATP (adenozynotrifosforan), Mg^{2+} oraz inhibitorem NR, inaktywującym enzym przez tworzenie nieaktywnego kompleksu ufosforylowane białko NR – białko 14-3-3 (P-NR-14-3-3), powodowała całkowite zahamowanie zależnej od jonów

azotynowych syntezy NO (ROCKEL i współaut. 2002).

BARBER i KAY (1996) wykazali, że NR może wykorzystywać tlen cząsteczkowy jako akceptor elektronów, w wyniku czego powstaje anionorodnik ponadtlenkowy $O_2^{\cdot-}$. Zatem jednoczesna synteza NO i $O_2^{\cdot-}$, katalizowana przez NR w obecności azotynów, prowadziła do powstawania nadtlenoazotynu $ONOO^-$. Doświadczenia *in vitro* z użyciem oczyszczonej NR kukurydzy wykazały, że NR w pewnych warunkach, gdy substratem reakcji są jony azotynowe, może być enzymem odpowiedzialnym za syntezę trzech typów toksycznych cząsteczek o charakterze wolnych rodników: NO, NO_2^- i $ONOO^-$ (YAMASAKI i SAKIHAMA 2000). Zwiększoną emisję NO i towarzyszącą mu syntezę $ONOO^-$ zaobserwowano w liściach transgenicznego tytoniu, zawierającego gen kodujący reduktazę azotynową w

orientacji antysensownej (MOROT-GOUDRY-TALARMAIN i współaut. 2002).

Wydaje się zatem, że synteza NO zależna od NR nie jest, jak początkowo przypuszczano, specyficzna jedynie dla roślin z rodzaju Leguminosae, posiadających konstytutywną NR, ale w określonych warunkach NO może być produktem reakcji katalizowanej przez reduktazy azotanowe występujące u innych roślin (YAMASAKI 2000).

Pojawiły się też doniesienia o istnieniu enzymu związanego z błoną plazmatyczną, reduktazy azotyny: NO (NI-NOR), zaangażowanej w syntezę NO w obecności azotynów w pH 6,1 (STÖHR i ULLRICH 2002). Synteza NO w obecności izolowanej frakcji plazmolemy była niezależna od tlenu i niewrażliwa na inhibitory NR. Dodatkowe obserwacje wykluczyły ponadto zaangażowanie błonowej NR w syntezę NO (STÖHR i współaut. 2001).

TLENEK AZOTU A MITOCHONDRIA ROŚLINNE

Tlenek azotu wpływa na intensywność oddychania w mitochondriach wątroby królika poprzez hamowanie aktywności oksydazy cytochromu c, na zasadzie współzawodnictwa o miejsce wiązania z cząsteczką tlenu (SHIVA i współaut. 2001). Podobnie, oksydaza cytochromu c (COX) w roślinnym łańcuchu oddechowym jest niezwykle wrażliwa na tlenek azotu. Transport elektronów drogą cytochromową w mitochondriach izolowanych z liścieni soi był hamowany prawie całkowicie w obecności NO, nie obserwowano natomiast hamowania aktywności drogi alternatywnej (MILLAR i DAY 1996). Indukując *in vitro* syntezę NO zależną od NR zbadano wpływ NO na oddychanie w mitochondriach izolowanych z hypokotyli fasolnika chińskiego (*Vigna radiata*) (YAMASAKI i współaut. 2001). Obecność izolowanego enzymu NR w mieszaninie inkubacyjnej zawierającej mitochondria nie powodowała żadnych zmian w intensywności pobierania tlenu w warunkach, gdy działały obie drogi transportu elektronów. Po dodaniu nPG (gallusan n-propylu), będącego inhibitorem alternatywnej drogi oddechowej, NR i azotany hamowały pobieranie tlenu na drodze cytochromowej. Z kolei, aktywność alternatywnej drogi oddechowej, mierzona przy zahamowanej drodze cytochromowej, nie wykazywała zmian w obecności NR. Autorzy sugerują, że ponieważ NR i kompleks I mitochondrialnego

łańcucha elektronów wykorzystują NADH jako donor elektronów, indukowane przez NR hamowanie drogi cytochromowej może być spowodowane ograniczoną dostępnością NADH. Jednak dodanie zewnętrznego NADH nie przywróciło pierwotnej aktywności drogi cytochromowej (YAMASAKI i współaut. 2001). Zbadano też wpływ NO na fosforylację oksydacyjną w mitochondriach roślinnych. Transportowi elektronów przy udziale drogi cytochromowej towarzyszy synteza trzech cząsteczek ATP. W przypadku transportu elektronów drogą alternatywną, gdy substratem jest NADH, tylko kompleks I (oksydoreduktaza NADH – ubichinon) jest zaangażowany w generowanie siły protonomotorycznej i tym samym syntezę ATP. W przypadku gdy donorem elektronów jest bursztynian, transportowi elektronów na drodze alternatywnej nie towarzyszy synteza ATP, z uwagi na ominięcie miejsca sprzężenia kompleks I-kompleks II (oksydoreduktaza NADH:ubichinon – oksydoreduktaza bursztynian:ubichinon) (MACKENZIE i MCINTOSH 1999). NO syntetyzowany po dodaniu NR do mitochondriów z hypokotyli fasolnika chińskiego hamował prawie całkowicie produkcję ATP (YAMASAKI i współaut. 2001). Zmierzono też wytwarzanie H_2O_2 w mitochondriach izolowanych z hypokotyli fasolnika chińskiego lub wątroby świni. NO spowodował wzrost syntezy H_2O_2 w mitochondriach

wątroby świni, w których nie występuje alternatywna droga oddechowa. Nie zaobserwowano jednak żadnego wpływu NO na poziom syntezy H_2O_2 w mitochondriach roślinnych. Wyniki te potwierdzają hipotezę wysuniętą przez MILLARA i DAYA (1996), że oddychanie drogą alternatywną może mieć na celu ograniczenie wytwarzania H_2O_2 w warunkach gdy, droga cytochromowa jest hamowana przez NO, tym bardziej, że wysoka emisja NO może zachodzić w różnych rejonach komórek roślinnych (YAMASAKI i współaut. 1999, CORPAS i współaut. 2001, STÖHR współaut. 2001). Na podstawie badań potencjału błony mitochondrialnej sugeruje się, że hamowanie syntezy ATP przez NO może być spowodowane przez spadek siły protonomotorycznej, której przyczyną jest wiązanie NO do białka oksydazy cytochromowej (COX) (YAMASAKI i współaut. 2001). Cząsteczka NO, z uwagi na łatwość z jaką penetruje błony biologiczne, może migrować do różnych organelli komórkowych, w tym do mitochondrium, gdzie może hamować aktywność COX. Powoduje to zwiększoną redukcję ubihinonu i nadprodukcję anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$). Reakcja pomiędzy $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 prowadzi do wytworzenia rodnika wodorotlenowego ($\cdot OH$). Powstające na tej drodze reaktywne formy tlenu wywołują uszkodzenia struktury błon mitochondrialnych i mitochondrialnego DNA (CADENAS i DAVIES 2000), które ulegają wzmocnieniu pod wpływem nadtlenoazotynu powstającego w reakcji NO i anionorodnika ponadtlenkowego. Uzyskane przez grupę Yamasaki rezultaty wskazują na niewrażliwość alternatywnej drogi oddechowej na NO i potwierdzają wcześniejsze sugestie, że skierowanie elektronów na tę drogę może obniżać wytwarzanie aktywnych form tlenu w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym w warunkach, gdy istnieje nadprodukcja tlenu azotu. Tym bardziej, że MAXWELL i współaut. (1999), badając kulturę komórkową transgenicznych roślin tytoniu, zaobserwowali, że w warunkach nadekspresji genu alternatywnej oksydazy (AOX) spada synteza reaktywnych form tlenu. Natomiast zahamowanie aktywności AOX przez wprowadzenie genu kodującego białko AOX w orientacji antysens spowodowało zwiększoną produkcję RFT. ZOTTINI i współaut. (2002) badali wpływ tlenu azotu na mitochondria komórek kultury zawiesinowej marchwi (*Daucus carota*). Jako donator NO stosowano nitroprusydek sodu (SNP). Inkubacja zawiesiny komór-

kowej marchwi z 1 mM SNP spowodowała 50% spadek oddychania całkowitego, przy czym było to związane z obniżeniem aktywności drogi cytochromowej. Analiza immunologiczna białek z przeciwciałami przeciwko AOX wykazała, że w obecności SNP dochodzi do zwiększenia syntezy białka oksydazy alternatywnej. Potencjał elektryczny błony mitochondrialnej spadał w warunkach traktowania zawiesiny komórkowej NO. Zaobserwowano też obniżenie zawartości cytochromu *c* w mitochondriach (ZOTTINI i współaut. 2002). Spadek potencjału elektrycznego błony mitochondrialnej oraz wyrzut cytochromu *c* z mitochondriów są sygnałem wejścia komórki na drogę apoptozy (JONES 2000). Indukcję genu *AOX1a* (kodującego białko AOX) zaobserwowano także w komórkach zawiesiny rzodkiewnika traktowanej związkiem uwalniającym NO – NOR-3 (E)-ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexene-amide (HUANG i współaut. 2002). Ekspresji genu *AOX1a* towarzyszyła wzmożona indukcja genów kodujących inne enzymy antyoksydacyjne, takie jak peroksydaza glutationowa i transferaza glutationowa. Natomiast, co było zaskakujące, nie obserwowano wzmożonej ekspresji genów katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej (HUANG i współaut. 2002). Indukcja ekspresji AOX w obecności NO potwierdza przypuszczenia, że synteza białka AOX może być indukowana w warunkach działania czynników abiotycznych lub biotycznych wywołujących stres oksydacyjny (MILLAR i DAY 1997). Ponadto stosunek stężenia RFT, powstających w mitochondriach, do stężenia NO może być istotnym czynnikiem regulującym realizację programu śmierci komórkowej, a NO-zależna indukcja genów antyoksydacyjnych i AOX może być podstawą odpowiedzi rośliny na stres oksydacyjny.

Zbadano także wpływ NO na aktywność akonitazy z liści tytoniu (NAVARRE i współaut. 2000). Akonitaza jest enzymem zawierającym wiązanie żelazowo-siarkowe i katalizuje izomerizację cytrynianu do izocytrynianu. Forma mitochondrialna akonitazy jest niezbędnym elementem cyklu Krebsa, dlatego też jej inaktywacja prowadzi do zakłócenia gospodarki energetycznej komórki. Akonitaza liści tytoniu była wrażliwa na NO, a jej aktywność spadała w obecności H_2O_2 o około 70%. Sugeruje to, że w warunkach wzmożonej syntezy NO lub reaktywnych form tlenu w komórce dochodzi do zahamowania aktywności akonitazy w wyniku wypierania żelaza z cząsteczki enzymu (NAVAR-

RE i współaut. 2000). Wzrost stężenia cytrynianu w komórce, związany z inaktywacją przez NO mitochondrialnej i cytosolowej akonitazy, może prowadzić do obniżenia syntezy ATP w mitochondriach, spowodowanego

indukcją przez cytrynian genu oksydazy alternatywnej (VANLERBERGHE i MCINTOSH 1996).

PODSUMOWANIE

Tlenek azotu w ciągu ostatnich paru lat znalazł się w centrum uwagi biologów, a szczególnie biochemików i fizjologów roślin. Podwójna natura działania związku, tzn. jego cytotoksyczna lub ochronna rola w komórce stwarza szerokie pole do dalszych badań. Nie do końca rozwiązana pozostaje nadal kwestia regulacji aktywności enzymu lub enzymów odpowiedzialnych za syntezę NO w komórkach roślinnych oraz oznaczenie *in vivo* poziomu endogennego NO w roślinach. Nie ma jednak wątpliwości, że tlenek azotu, podobnie jak reaktywne formy tlenu może odgrywać rolę regulatora wielu procesów metabolicznych zachodzących na terenie komórki roślinnej. Wydaje się ponadto, że odpowiedź na NO na po-

ziomie komórkowym jest kompleksowa i warunkuje późniejszą ewentualną odporność na różnego rodzaju stresy (NEILL i współaut. 2002b, LAMATTINA i współaut. 2003, GOULD i współaut. 2003). Chociaż NO nie jest regulatorem wzrostu i rozwoju, w wielu przypadkach wywołuje reakcje fizjologiczne charakterystyczne dla znanych hormonów roślinnych takich jak: auksyny, gibereliny czy etylen (LAMATTINA i współaut. 2003). Biorąc pod uwagę skomplikowany system transdukcji sygnałów i rolę NO, należy tę cząsteczkę traktować jako jedno z istotnych ogniw, być może, niezbędnych na drodze przekazywania informacji w komórkach roślinnych (NEILL i współaut. 2002b).

NITRIC OXIDE ACTION IN PLANT CELL METABOLISM

S u m m a r y

Nitric oxide (NO) is a bioactive molecule that exerts a number of diverse activities in plants.

NO in plant cells is produced by nitrate oxidase synthase (NOS) or nitrate reductase (NR). The relationship between NR activity and NO production is presented. NO coordinates and regulates the cellular function of mitochondria and reduces the total cell respiration due to strong inhibition of the cytochrome pathway. There are some reports demonstrating that NO increases the contribution of the alternative pathway to total respiration by inducing the expression of alternative oxidase (AOX). Owing to the presence of

an unpaired electron the NO molecule exhibits a dual mode of action. Depending on the circumstances, NO in combination with an other reactive oxygen species (ROS) may be either toxic or protective. It is able to scavenge other reactive intermediates and end chain-propagated reactions. The reaction between superoxide and NO leads to formation of peroxynitrite and it thus suggested to be a deleterious mechanism. In systems where the toxicity is due predominantly to peroxides, NO can act as a protective agent. The participation of NO in the antioxidant system in plant cells is also described.

LITERATURA

- BARBER M. J., KAY C. J., 1996. *Superoxide production during reduction of molecular oxygen by assimilatory nitrate reductase*. Arch. Biochem. Biophys. 326, 227–232.
- BARROSO J. B., CORPAS F. J., CARRERAS A., SANDALIO L. M., VALDERRAMA R., PALMA J. M., LUPÍÁÑEZ J. A., del RÍO L.A., 1999. *Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes*. J. Biol. Chem. 274, 36729–36733.
- BARTOSZ G., 1995. *Druga Twarz Tlenu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- BEERS E. P., McDOWELL J. M., 2001. *Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues*. Curr. Opin. Plant Biol. 4: 561–567.
- BELIGNI M.V., LAMATTINA L., 1999a. *Nitrate oxide interacts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues*. Planta 208, 337–344.
- BELIGNI M. V., LAMATTINA L., 1999b. *Is nitric oxide toxic or protective?* Trends Plant Sci. 4, 299–300.
- BELIGNI M. V., LAMATTINA L., 1999c. *Nitrate oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants*. Nitric oxide: Biol. Biochem. 3, 199–208.

- BELIGNI M. V., LAMATTINA L., 2000. *Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants*. *Planta* 210, 215–221.
- BELIGNI M. V., LAMATTINA L., 2001. *Nitric oxide: a non traditional regulator of plant growth*. *Trends Plant Sci.* 6, 508–509.
- BELIGNI M. V., LAMATTINA L., 2002. *Nitric oxide interferes with photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species*. *Plant Cell Environ.* 25, 737–748.
- BETHKE P. C., BADGER M. R., JONES R., 2004. *Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues*. *Plant Cell* 16, 332–341.
- CADENAS E., DAVIES K. J. A., 2000. *Mitochondrial free radical generation, oxidative stress and aging*. *Free Rad. Biol. Med.* 29, 222–230.
- CHANDOK M. R., YTTERBERG A. J., van WIJK K. J., KLESSIG D. F., 2003. *The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex*. *Cell* 113, 469–482.
- CLARKE A., DESIKAN R., HURST R. D., HANCOCK J. T., NEIL S. J., 2002. *NO way back: nitric oxide and programmed cell death in Arabidopsis thaliana suspension cultures*. *Plant J.* 24, 667–677.
- CORPAS F. J., BARROSO J. B., del RIO L. A., 2001. *Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells*. *Trends Plant Sci.* 6, 145–150.
- CRAWFORD N. M., GLASS A. D. M., 1998. *Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants*. *Trends Plant Sci.* 3, 381–395.
- CUETO M., HERMANDEZ-PERERA O., MARTIN R., BENTURA M. L., RODRIGO J., LAMAS S., GOLVANO M. P., 1996. *Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of Lupinus albus*. *FEBS Lett.* 398, 159–164.
- DEAN J. V., HARPER J. E. 1988. *The conversion of nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H- nitrate reductase enzyme from soybean*. *Plant. Physiol.* 88, 389–395.
- DELLEDONNE M., MURCIA I., EDERLE D., SBICERO P. F., BIONDANI A., POLVERARI A., LAMB C. 2002. *Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in plant hypersensitive disease-resistance response*. *Plant Physiol. Biochem.* 40, 605–610.
- DURNER J., KLESSIG D. F., 1999. *Nitric oxide as a signal in plants*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2, 369–374.
- DURNER J., WENDEHENNE D., KLESSIG D. F. 1998. *Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 10328–10333.
- GARCIA-MATA C., LAMATTINA L., 2001. *Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress*. *Plant Physiol.* 126, 1196–1204.
- GOULD K. S., LAMOTTE O., KLINGUER A., PUGIN A., WENDEHENNE D., 2003. *Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response?* *Plant, Cell Environ.* 26, 1851–1862.
- GUO F-Q., OKAMOTO M., CRAWFORD N. M., 2003. *Identification of plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling*. *Science* 302, 100–103.
- HUANG X., von RAD U., DURNER J., 2002. *Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in Arabidopsis suspension cells*. *Planta* 215, 914–923.
- JIH P-J., CHEN Y-C., JENG S-T., 2003. *Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in expression of the ipomoelin gene from sweet potato*. *Plant Physiol.* 132, 381–389.
- JONES A., 2000. *Does the plant mitochondrion integrate cellular stress and regulate programmed cell death?* *Trends Plant Sci.* 5, 225–230.
- KAISER W. M., HUBER S. C., 2001. *Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers*. *J. Exp. Bot.* 52, 1981–1989.
- KOPYRA M., GWÓZDZ E. A., 2003. *Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of Lupinus luteus*. *Plant Physiol. Biochem.* 41, 1011–1017.
- LAMATTINA L., GARCIA-MATA C., GRAZIANO M., PAGNUSSAT G., 2003. *Nitric Oxide: the versatility of an extensive signal molecule*. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54, 109–136.
- LESHEM Y. Y., WILLS R. B. H., KU V. V-V., 1998. *Evidence for function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants*. *Plant Physiol. Biochem.* 36, 825–833.
- MACKENZIE S., MCINTOSH L., 1999. *Higher plant mitochondria*. *Plant Cell* 11, 571–585.
- MATKOWSKI A., 2002. *Tlenek azotu u roślin*. *Post. Biol. Kom.* 29, 613–626.
- MAXWELL D. P., WANG Y. MCINTOSH L., 1999. *The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 8271–8276.
- MILLAR A. H., DAY D. A., 1996. *Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not alternative oxidase of plant mitochondria*. *FEBS Lett.* 398, 155–158.
- MILLAR A. H., DAY D. A., 1997. *Alternative solutions to radical problems*. *Trends Plant Sci.* 2, 289–290.
- MOROT-GAUDRY-TALARMAN Y., ROCKEL P., MOUREAUX T., QUILLERE I., LEYDECKER M. T., KAISER W. M., MOROT-GAUDRY J. F., 2002. *Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco*. *Planta* 215, 708–715.
- NATHAN C., XIE Q-W., 1994. *Nitric oxide synthetases: roles, tools and controls*. *Cell* 78, 915–918.
- NAVARRE D. A. WENDEHENNE D., DURNER J., NOAD R., KLESSIG D. F., 2000. *Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase*. *Plant Physiol.* 122, 573–582.
- NEILL S. J., DESIKAN R., CLARKE A., HANCOCK J. T., 2002a. *Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling stomatal guard cells*. *Plant. Physiol.* 128, 13–16.
- NEILL S. J., DESIKAN R., CLARKE A., HURST R. D., HANCOCK J. T., 2002b. *Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants*. *J. Exp. Bot.* 53, 1237–1247.

- PAGNUSSAT G. C., SIMONTACCHI M., PANTARULO S., LAMATTINA L., 2002. *Nitric oxide is required for root organogenesis*. Plant Physiol. 129, 954–956.
- PEDROSO M. C., MAGALHAES J. R., DURZAN D., 2000a. *Nitric oxide induces cell death in Taxus cells*. Plant Sci. 157, 173–180.
- PEDROSO M. C., MAGALHAES J. R., DURZAN D., 2000b. *A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues*. J. Exp. Bot. 51, 1027–1036.
- RIBEIRO JR. E. A., CUNHA F. Q., TAMASHIRO W. M. S. C., MARTINS I. S., 1999. *Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells*. FEBS Lett. 445, 283–286.
- ROCKEL P., STRUBE F., ROCKEL A., WILDT J., KAISER W. M., 2002. *Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro*. J. Exp. Bot. 53, 103–110.
- SHIVA S., BROOKES P. S., PATEL R. P., ANDERSON P. G., DARLEY-USMAR V. M., 2001. *Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 7212–7217.
- STÖHR C., STRUBE F., MARX G., ULLRICH W. R., ROCKEL P., 2001. *A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite*. Planta 212, 835–841.
- STÖHR C., ULLRICH W. R., 2002. *Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space*. J. Exp. Bot. 53, 2293–2303.
- TAKAHASHI S., YAMASAKI H., 2002. *Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplast by nitric oxide*. FEBS Lett. 512, 145–148.
- UCHIDA A., JAGENDORF A. T., HIBINO T., TAKABE T., TAKABE T., 2002. *Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice*. Plant Sci. 163: 515–523.
- VANIN A. F., SVISTUNENKO D. A., MIKOYAN V. D., SEREZHENKOV V. A., FRYER M. J., BAKER N. R., COOPER C. E., 2004. *Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves*. J. Biol. Chem. 279, 24100–24107.
- VANLERBERGHE G. C., MCINTOSH L., 1996. *Signals regulating the expression of the nuclear gene encoding alternative oxidase of plant mitochondria*. Plant Physiol. 111, 589–595.
- WENDEHENNE D., PUGIN A., KLESSIG D. F., DURNER J., 2001. *Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells*. Trends Plant Sci. 6, 177–183.
- WILLS R. B. H., KU V. V., LESHEM Y. Y., 2000. *Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries*. Postharvest Biol. Tech. 18, 75–79.
- WINK D. A., HANBAUER I., KRISHNA M. C., DE GRAFF W., GAMSON J., MITCHEL J. B., 1993. *Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 9813–9817.
- WOJTASZEK P., 2000. *Nitric oxide in plants. To No or not to NO*. Phytochemistry 54, 1–4.
- YAMASAKI H., 2000. *Nitric oxide produced by nitrate reductase: Implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 355, 1477–1488.
- YAMASAKI H., SAKIHAMA Y., 2000. *Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: In vivo evidence for NR-dependent formation of active nitrogen species*. FEBS Lett. 468, 89–92.
- YAMASAKI H., SAKIHAMA Y., TAKAHASHI S., 1999. *An alternative pathway for nitric oxide production in plants: New featured of an old enzyme*. Trends Plant Sci. 4, 128–129.
- YAMASAKI H., SHIMOJI H., OSHIHIRO Y., SAKIHAMA Y., 2001. *Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria*. Nitric Oxide: Biol. Chem. 5, 261–270.
- ZOTTINI M., FORMENTIN E., SCATOLIN M., CARIMI F., LO SCHIAVO F., TERZI M., 2002. *Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo*. FEBS Lett. 515, 75–78.