

专题介绍

植物一氧化氮生物学的研究进展

¹ 程红焱 ² 宋松泉

¹ (中国科学院植物研究所 北京 100093) ² (中国科学院西双版纳热带植物园 云南勐腊 666303)

摘要 一氧化氮(NO)是植物中的一种关键的信号分子。在植物中,NO的潜在来源包括一氧化氮合成酶、硝酸还原酶、黄嘌呤氧化还原酶和非酶促途径。NO能促进植物生长,延缓叶片、花和果实衰老,促进休眠和需光种子的萌发,能与植物激素相互作用调节气孔运动,诱导程序性细胞死亡和防御相关基因的表达,并在逆境中作为一种抗氧化剂起作用。NO的细胞内信号反应包括环鸟苷酸、环腺苷二磷酸核糖的产生和细胞质Ca²⁺浓度的增加,其信号转导途径及其生物化学和细胞学本质还不十分清楚。

关键词 一氧化氮,生物合成,生长与发育,植物激素,程序性细胞死亡,胁迫,信号转导

Advances in Nitric Oxide Biology of Plants

¹CHENG Hong-Yan ²SONG Song-Quan

¹ (Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093)

² (Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Mengla, Yunnan 666303)

Abstract Nitric oxide (NO) is a key signaling molecule in plants. The potential sources of NO in plants include nitric oxide synthase, nitrate reductase, xanthine oxidoreductase and the non-enzymatic pathway. NO can enhance plant growth; delay senescence of leaves, flowers and fruits; stimulate germination of seeds that are dormancy and/or light-requiring seeds for germination; and interact with phytohormones to mediate stomatal movement. Programmed cell death and expression of defence-related genes can also be induced by NO. NO can serve an antioxidant function during various stresses. Intracellular signaling responses to NO involve generation of cyclic guanosine monophosphate, cyclic ADP-ribose and elevation of cytosolic calcium, but the knowledge of the NO signal transduction pathway and its biochemical and cellular nature is yet to be revealed.

Key words Nitric oxide, Nitric oxide biosynthesis, Growth and development, Phytohormone, Programmed cell death, Stress, Signaling transduction

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种具有水溶性 and 脂溶性的气体小分子,近年来被认为是 一种在植物中普遍存在的关键信号分子 (Durner and Klessig, 1999; Wendehenne et al.,

中国科学院知识创新工程重要方向性项目(KSCX2-SW-117)、国家自然科学基金(30470183)、中国科学院“百人计划”和科技部国家科技基础条件平台项目(2004DKA30430)资助。

通讯作者。Author for correspondence. E-mail: sqsong@xtbg.org.cn

收稿日期: 2005-01-07 接受日期: 2005-07-12 责任编辑: 孙冬花

2004)。早在1979年就发现植物能释放NO, 并影响其生长 (Anderson and Mansfield, 1979), 但此后关于NO对植物生长发育影响的研究仅局限在少数的几个实验室 (Leshem and Haramaty, 1996; Laxalt et al., 1997)。直到1998年, 两篇具有里程碑作用的论文 (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998) 提出NO是植物的防御信号后, NO的植物生物学研究才迅速展开。

关于植物NO的信号分子作用已经有很好的综述 (Durner and Klessig, 1999; Beligni and Lamattina, 2001; Wendehenne et al., 2001; Neill et al., 2002b, 2003)。本文主要综述NO的生物合成, NO对植物生长发育的作用, NO与环境胁迫和程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 的关系。

1 NO的生物合成

NO是一种气体自由基, 在 π_2 轨道上具有未配对电子, 但能保持电荷中性。由于它的自由基性质, 容易得到或失去一个电子, 因而能以一氧化氮自由基 ($\text{NO}\cdot$)、亚硝酸正离子 (nitrosonium cation, NO^+) 和硝酰自由基 (nitroxyl radical, NO^-) 3种形式存在 (Wojtaszek, 2000)。NO微溶于水 ($0.047 \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-3} \text{ H}_2\text{O}$, 20°C , 1 atm), 铁盐能增强其水溶性, 无论是在细胞的水溶性的原生质还是在脂溶性的膜系统, 都能扩散移动 (Anderson and Mansfield, 1979)。因此, NO一旦产生, 就容易在细胞内和细胞间扩散。但是, 作为一种活性自由基, NO的半衰期只有几秒钟。NO能与 O_2 快速反应生成 NO_2 , 然后快速降解为硝酸根离子和亚硝酸根离子。NO的作用范围主要是产生NO的细胞和邻近的细胞 (Neill et al., 2003)。

在植物中有几条潜在的产生NO的途径 (图1), 包括一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS)、硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR)、黄嘌呤氧化还原酶 (xanthine

oxidoreductase, XOR) 和非酶促反应途径。这些途径对NO产生的贡献取决于物种、细胞/组织、植株的生长条件以及在专一条件下信号途径的活性。表1总结了植物体内NO的来源以及对专一条件的反应。

1.1 一氧化氮合成酶

在哺乳动物中, 有3个基因编码NOS, 其中在各种细胞中存在的内皮NOS (endothelial NOS, eNOS) 和最初从神经组织中鉴定的 nNOS (neuronal NOS) 均为组成型表达; 而iNOS (inducible NOS, 也称为mNOS) 是一种诱导酶, 在脂多糖和干扰素存在时增量表达。nNOS的分子量较大, 约为160 kD; 其次为eNOS, 约为135 kD; iNOS的分子量较小, 约为130 kD (Furchgott, 1995)。

在体内, 所有NOS似乎都以同型二聚体的形式存在, 每个亚基含有3个明显不同的结构域, 即氧化酶结构域、还原酶结构域和钙调素 (calmodulin, CaM) 结合位点。氧化酶结构域含有血红素 (haem) 和四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin) 的结合位点。还原酶结构域含有FAD和NADPH的结合位点。CaM结合位点位于氧化酶和还原酶结构域之间。iNOS不依赖于 Ca^{2+} , 并持久地与CaM结合; 而nNOS和eNOS依赖于 Ca^{2+} , CaM作为调节组件。NOS催化L-精氨酸 (L-arginine) 生成L-瓜氨酸 (L-citrulline) 和NO, 在此反应中NADPH和分子氧是必须的, 精氨酸首先被转变成成为羟基精氨酸 (hydroxyarginine), 一种非释放的中间产物, 然后生成瓜氨酸和NO (Furchgott, 1995)。

Ninnemann和Maier (1996) 利用精氨酸类似物 N^ω -硝基-L-精氨酸 (N^ω -nitro-L-arginine, L-NAA) 和 N^ω -硝基-L-精氨酸甲基酯 (N^ω -nitro-L-arginine methylester, L-NAME) 的抑制作用和放射性标记的瓜氨酸的生成作为证据, 首次证明在高等植物中存在NOS活性。Ribeiro等 (1999) 利用老鼠iNOS抗体和兔

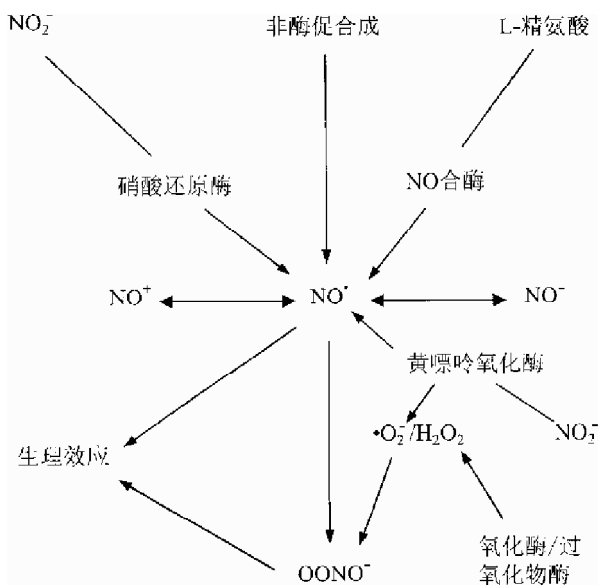


图1 植物体内一氧化氮的产生

在植物中有几条潜在的NO来源, 包括一氧化氮合酶(NOS)、硝酸还原酶(NR)、黄嘌呤氧化还原酶和非酶促来源。NO一旦产生就能够诱导各种反应, 或者与活性氧反应产生过亚硝酸。值得注意的是, NO可能以3种形式存在, 虽然此图仅表明NO自由基具有生物学活性, 但NO⁺和NO⁻也具有生物学活性

Fig. 1 The production of nitric oxide in plant

There is evidence for several potential sources of NO in plants, including nitric oxide synthase (NOS), nitrate reductase (NR), xanthine oxidoreductase or nonenzymatic sources. Once generated, NO can induce various effects, or react with reactive oxygen species to generate peroxynitrite. It should be noted that NO can exist in three forms, and although it is implied here that only the radical is biologically active, both the NO⁺ and NO⁻ may have biological effects (Neill et al., 2003)

nNOS抗体进行免疫印迹实验, 发现玉米(Zea mays)根和幼叶的可溶性部分含有166 kD的蛋白带; 此外, NOS酶提取液可以将¹⁴C-精氨酸转变为¹⁴C-瓜氨酸。这些证据表明在玉米中存在NOS。

抗体杂交试验表明, NOS蛋白定位在细胞质, 但能转移至细胞核, 这种转移取决于细胞的生长期(Ribeiro et al., 1999)。利用精氨酸-瓜氨酸分析(arginine-citrulline assay), 发现一种依赖于Ca²⁺的NOS活性存在于豌豆(Pisum sativum)叶的过氧化物中, 而且被NOS抑制剂氨基胍(aminoguanidine)抑制(Barroso et al., 1999)。

在大豆(Glycine max)细胞悬浮培养物中, 细菌侵染迅速诱导NO的产生, NOS的抑制剂L-NNA能够减少细菌诱导的NO生成(Deledonne et al., 1998)。用烟草花叶病毒(tobacco mosaic virus, TMV)感染烟草(Nicotiana tabacum)植株也导致NOS产生的增加, 此效应被NOS抑制剂抑制(Durner et al., 1998)。在白羽扇豆(Lupinus albus)的根和根瘤中已检测到NOS的活性, 但这种活性被NOS抑制剂N^G-甲基-L-精氨酸(N^G-monomethyl-L-arginine, L-NMMA)抑制(Cueto et al., 1996)。在拟南芥(Arabidopsis thaliana)中, 机械刺激诱导NO的产生, 以及被L-NMMA抑制

表1 植物一氧化氮的来源

Table 1 Sources of nitric oxide in various plants (Neill et al., 2003)

NO 的来源	证据	物种	评论
一氧化氮合酶 (NOS)	在提取物中存在活性	豌豆; 玉米; 烟草; 大豆; 白羽扇豆; Mucuna hassjoo	在豌豆中 ABA 诱导的 NO 合成和气孔关闭被 NOS 抑制剂抑制; 在拟南芥中机械胁迫诱导 NO 的产生; 在植物中还未证实类 NOS 序列, 且在植物中 NOS 的定位是不清楚的
	NOS 活性被哺乳动物 NOS 抑制剂抑制	烟草; 大豆; 豌豆; 白羽扇豆	
	NO 的释放被 NOS 抑制剂减少	大豆; 烟草; 豌豆; 拟南芥	
	抗 -NOS 的抗体被用来鉴定植物蛋白	豌豆; 小麦; 玉米	
	抗 -NOS 的抗体抑制此酶的活性	豌豆	
	NO 的释放不被 NOS 抑制剂抑制	拟南芥; 向日葵; 雷氏衣藻; 斜生栅藻	
	NR 催化 NO 的体外产生	玉米	在拟南芥中, ABA- 诱导的气孔关闭需要 NR - 调节的 NO 合成
	NR 催化 NO 的体内产生	向日葵; 菠菜; 拟南芥	对决定细胞内亚硝酸和硝酸浓度是重要的; NR 的亚细胞定位需要被确定; 需要测定处理后 NR 活性的变化
硝酸还原酶 (NR)	与野生型植株相比, NR 缺乏的突变体减少 NO 的产生	大豆; 拟南芥; 雷氏衣藻	
黄嘌呤氧化还原酶 (XOR)	在体外低氧分压下, 哺乳动物的 XOR 产生 NO		尽管许多植物组织在厌氧条件下具有此酶的活性, 但在植物中没有 XOR 产生 NO 的报道
亚硝酸: NO-还原酶	亚硝酸还原活性导致 NO 的产生	烟草	一种需要进一步鉴定的潜在重要酶
非酶促来源	类胡萝卜素转化 NO ₂ 成为 NO		需要低 pH 和一种还原剂, 例如抗坏血酸
	亚硝酸转化成 NO; NO ₂ 转化成为 NO	大麦糊粉层非原生质体	

(Garó et al., 2001)。

最近, 已经从植物中鉴定了两组类 NOS, 一组是来自拟南芥和烟草由病原菌诱导的 NOS (iNOS, Chandok et al., 2003), 另一组是来自拟南芥由激素活化的 NOS (AtNOS1, Guo et al., 2003)。病原菌诱导的 NOS 是一组不同的甘氨酸脱羧酶复合体 (glycine decarboxylase complex) 的 P 蛋白 (P protein) (Chandok et al., 2003); 它表现出典型的 NOS 活性, 需要类似于哺乳动物 NOS 的辅因子。根据蜗牛 (Helix

pomatia) 中与 NO 合成有关的蛋白质的序列同源性, 已经克隆了激素活化的 NOS (Guo et al., 2003)。AtNOS1 与哺乳动物的 NOS 和植物的 iNOS 不具有序列同源性, 但 AtNOS1 显示出黄素、亚铁血红素和不依赖于四氢生物蝶呤的 NOS 活性 (Wendehenne et al., 2004)。在对 ABA 的反应中, AtNOS1 涉及 NO 的产生 (Guo et al., 2003)。

尽管越来越多的证据表明在植物中存在 NOS, 但也有相反的报道。例如, NOS 抑制剂

对叶片提取物和完整组织中的NO合成没有影响 (Rockel et al., 2002)。在被细菌感染的拟南芥细胞中, NOS的抑制剂对NO的释放没有作用 (Clarke et al., 2000)。在雷氏衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 中, NOS抑制剂不影响依赖亚硝酸的NO产生, L-精氨酸 (已知的 NOS 底物) 的添加不诱导酶的活性 (Sakihama et al., 2002)。这些结果说明植物中还存在其他的 NO 合成途径。

1.2 硝酸还原酶

硝酸还原酶 (nitrate reductase, NR) 也是植物产生 NO 的来源 (表 1)。NR 是高等植物中同化硝酸盐的关键酶, 其催化的反应为限速反应 (Lea, 1999)。NR 利用 NAD(P)H 作为电子供体, 催化硝酸盐转变为亚硝酸盐 (Lea, 1999), 在体外 (Yamasaki and Sakihama, 2000) 和体内 (Rockel et al., 2002) 都能产生 NO, 并利用钼辅因子 (molybdenum cofactor, MoCo) 作为催化位点 (Harrison, 2002)。

钨酸盐作为一种钼的类似物, 预处理细胞能降低 NR 的活性。植物中 NR 活性的降低是由于失活的钨蛋白 (tungstoptein) 的形成引起的 (Neill et al., 2003)。在拟南芥保卫细胞中 ABA 诱导的 NO 合成, 以及伴随的 ABA 诱导的气孔关闭被钨酸盐抑制, 但这些 ABA 的效应不被 NOS 抑制剂 L-NAME 抑制。在拟南芥中, 钨酸盐不抑制由 NO、H₂O₂ 或者黑暗诱导的气孔关闭, 表明钨酸盐的作用是对 NO 合成专一的。

大豆的 NR 缺陷型突变体不能像野生型植株一样释放 NO, 表明 NR 是一种潜在的产生 NO 的酶 (表 1)。大豆 NR 的活性依赖于 NAD(P)H, 最适 pH 为 6.75, 对氰化物敏感。在拟南芥 NR 缺陷型和 NR 突变体 (*nia1* 和 *nia2*) 中都证明了 NR 在 ABA 诱导 NO 形成过程中所起的作用 (Neill et al., 2003)。Sakihama 等 (2002) 用雷氏衣藻为材料, 也发现 NR 是 NO 的来源。

1.3 NO 的其他酶促来源

表 1 还描述了 NO 的其他酶促来源。例如, Stohr 等 (2001) 发现烟草根具有亚硝酸还原活性, 能导致 NO 的产生。Harrison (2002) 发现 XOR 具有产生 NO 的能力。与 NR 一样, XOR 也是一个以钼为辅因子的氧化还原酶; 在低氧张力下, XOR 将亚硝酸转变为 NO; 在有氧存在时, 会形成超氧化物; 超氧化物随后与 NO 反应形成过亚硝酸 (peroxynitrite) (Godber et al., 2000a, 2000b)。因此, XOR 具有产生 2 种信号分子的能力, 当氧张力高时, 产生超氧化物 (超氧化物可以歧化为 H₂O₂) 和活性氧 (ROS); 当氧张力低时, 产生 NO。当植物组织如根暂时处于缺氧状态时, 氧分子的可利用性则成为 XOR 产生信号分子的调节因子。已经在植物过氧化物体中发现了 XOR 的活性 (Corpas et al., 2001)。迄今为止, XOR 在植物信号转导中的作用研究还很少。

1.4 NO 的非酶促合成途径

在酸性或者还原条件下, 亚硝酸的还原将产生 NO。亚硝酸能够与抗坏血酸反应形成脱氢抗坏血酸 (dehydroascorbic acid) 和 NO (Weitzberg and Lundberg, 1998)。在培养介质中添加亚硝酸盐时, 大麦糊粉层细胞能迅速产生 NO。NO 的产生需要酸性的质外体环境, 介质中的酚类化合物能够提高 NO 的产生速率 (Bethke et al., 2004)。此外, 赤霉素和 ABA 处理后可观察到质外体的非酶促 NO 合成, 这两种激素能迅速地酸化质外体介质 (Wendehenne et al., 2004)。目前, 这种非酶促 NO 产生的生理意义还不清楚。

1.5 NO 的测定

NO 的测定可以采用气相色谱 (gas chromatography) 和质谱 (mass spectrometry) 法 (Magalhaes et al., 2000)、化学发光法 (chemiluminescence) (Wildt et al., 1997) 以及激光光-声波谱仪法 (laser photo-acoustic spectroscopy) (Leshem and Pinchasov,

2000)。溶液中的NO可用NO电极、也可以通过NO与血红蛋白反应来测定(Murphy and Noack, 1994),但血红蛋白还能与活性氧发生反应。荧光染料DAF-2DA (4,5-diaminofluoresceindiacetate)可以渗透进入细胞,只有与NO发生反应后才呈现荧光,因而可利用荧光显微镜(fluorescence microscopy)和激光共聚焦显微镜(laser confocal microscopy)监测细胞内NO的含量(Kojima et al., 1998),而且DAF-2DA不与活性氧发生反应(Foissner et al., 2000)。电子自旋共振(electron spin resonance, EPR)也可以用于测定植物细胞内NO的含量(Pagnussat et al., 2002)。

2 NO对植物生长发育的作用

在研究中常用的NO供体是硝普钠(sodium nitroprusside, SNP),在进入细胞后产生NO⁺;其他的NO供体包括S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione, GSNO), S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP) (Durner et al., 1998; Hogg, 2000)等。常用的NO清除剂有PTIO (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)和cPTIO (carboxy PTIO) (Neill et al., 2003)。

2.1 NO与植物生长

植物在正常生长条件下会释放NO。野生豌豆叶片中NO的含量为160 nmol·g⁻¹ FW (Leshem and Haramaty, 1996)。野生型拟南芥的NO释放量为500 nL·g⁻¹ FW (Magalhaes et al., 2000)。在病原体侵染后,拟南芥细胞的NO释放速率为180 nmol·g⁻¹ FW·h⁻¹ (Clarke et al., 2000)。生长素处理后黄瓜(Cucumis sativus)根部的内源NO含量为55 nmol·g⁻¹ FW (Pagnussat et al., 2002)。

NO对植物生长的影响与其浓度有关。高浓度的NO (400~800 nL·L⁻¹)抑制番茄(Lycopersicon esculentum)的生长,低浓度(0~200 nL·L⁻¹)时促进生长(Anderson and

Mansfield, 1979);对莴苣(Lactuca sativa) (Hufton et al., 1996)和豌豆(Leshem and Haramaty, 1996)生长的影响也表现出类似的结果。Takahashi和Yamasaki (2002)证明在叶绿体内NO能够可逆地抑制电子传递和ATP的合成。

NO供体能抑制马铃薯(Solanum tuberosum)、莴苣和拟南芥下胚轴的生长,促进去黄化和提高叶绿素的含量(Beligni and Lamattina, 2000)。Pagnussat等(2002)也发现施加NO供体SNP和SNAP可以促进黄瓜不定根的发育。生长素诱导的根的生长和侧根的形成能够被NO的清除剂cPTIO阻断(Pagnussat et al., 2002)。

2.2 NO延缓植物衰老

NO能增加豌豆叶片、尤其是保卫细胞中叶绿素的含量(Leshem et al., 1997);延缓Phytophthora infestants侵染的马铃薯叶片中叶绿素的降解(Laxalt et al., 1997)。Graziano等(2002)表明NO能改善铁的可利用性。缺铁引起的缺绿是由于叶绿体的发育受到抑制;NO处理抑制玉米缺绿,施加NO能逆转玉米黄条纹(yellow stripe)突变体的铁缺乏。0.05, 0.1和0.2 mmol·L⁻¹ SNP处理能降低小麦叶片中H₂O₂和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,而0.5 mmol·L⁻¹ SNP处理则增加其含量(Tu et al., 2003)。

NO具有抗衰老作用。Leshem和Haramaty (1996)发现在促进衰老的条件下,施加NO供体可以降低豌豆叶片中乙烯的产生;随后的研究发现NO抑制乙烯的生物合成(Leshem, 2001)。Leshem (2001)还发现NO供体能够延长几种切花的寿命。在香蕉(Musa nana)和草莓(Fragaria ananassa)果实的成熟过程中乙烯含量增加,同时NO的释放量减少。对蔬菜和水果施加NO同样可以延缓其衰老,延长其采后寿命(Leshem and Pinchasov, 2000; Leshem, 2001)。

2.3 NO促进种子萌发

NO能够促进许多植物种子的萌发,特别是光敏感种子的萌发(Giba et al., 2003)。外源NO供体能够打破莢苳种子的暗休眠,但能被NO的清除剂PTIO逆转(Beligni and Lamattina, 2000)。这种效应能够解释由含有NO的烟诱导的加州小懈树(*Emmenanthe penduliflora*)休眠种子的萌发(Keeley and Fotheringham, 1997)。Giba等(1998)利用各种NO供体和相应的失活化合物,证明了光敏色素控制的皇后树(empress tree)种子的萌发受NO的调节。在低pH条件下,亚硝酸转变为NO(Giba et al., 1998)。因此,一些由亚硝酸促进种子萌发的早期报道能够用NO的作用来解释。

山红树(*Pellacalyx yunnanensis*)是云南的特有种,已被列为国家三级重点保护植物。在黑暗条件下,无论是恒温(15、20、25、30、35和40 °C)还是变温(15 °C/10 °C、20 °C/10 °C、25 °C/10 °C、30 °C/10 °C、35 °C/10 °C和40 °C/10 °C),种子吸胀44天时,萌发率几乎为零;变光(14小时光照/10小时黑暗)显著地增加种子的萌发率和萌发速率;有趣的是0.01~0.1 mmol·L⁻¹ SNP能代替光照,明显地增加种子的萌发率和萌发速率(Cheng et al., 2006)。硝酸和亚硝酸处理也能代替光照促进山红树种子的萌发(待发表资料)。

2.4 NO与植物激素

细胞分裂素可以诱导烟草和拟南芥细胞培养物的NO合成(Tun et al., 2001)。一些细胞分裂素的效应能够被NO模拟,NO供体诱导莢幼苗中betalaine的积累,细胞分裂素诱导的betalaine的积累被NOS抑制剂抑制(Scherer and Holk, 2000)。这些结果表明NO可能具有调节细胞分裂素的作用。

在豌豆保卫细胞和其他表皮细胞中ABA诱导NO的迅速合成(Neill et al., 2002a)。在拟南芥(Desikan et al., 2002)和蚕豆(Garcia-

Mata and Lamattina, 2002)中也发现了同样的现象。在拟南芥悬浮培养物中,ABA不能诱导NO的合成(Tun et al., 2001),说明ABA诱导的NO合成具有组织特异性。在豌豆中,ABA诱导的保卫细胞NO的合成是气孔关闭所需要的,当用清除剂PTIO去除NO时,ABA诱导的气孔关闭则被显著地抑制。药理学证据表明NOS作为一种NO的来源,ABA诱导的气孔关闭和NO的合成都被L-NAME抑制,但不被钨酸盐抑制(Neill et al., 2002a)。

Pagnussat等(2002)报道生长素能够诱导黄瓜根合成NO,虽然NO的合成途径还没有确定,但黄瓜根的生长和侧根的形成需要NO。

2.5 NO延期植物开花

外源SNP处理拟南芥植株促进其营养生长,延期开花的效应与处理剂量有关(He et al., 2004)。nox1突变体(表现出内源NO水平增加)比野生型植株开花晚(He et al., 2004),而atnos1突变体(NOS mutant)具有较低的NO水平,在密闭系统中开花较早(Crawford and Guo, 2005)。

3 NO与环境胁迫

3.1 NO在非生物胁迫中的作用

干旱、低温和高温、紫外线和臭氧等逆境诱导ROS的形成(Neill et al., 2002b; Vranova et al., 2002)。ROS引起氧化伤害,同时也触发不同的信号途径(Neill et al., 2002b; Vranova et al., 2002)。NO以不同的方式与ROS相互作用,在不同的胁迫中可能作为一种抗氧化剂起作用(Beligni and Lamattina, 1999)。NO调节超氧化物的形成(Caro and Puntarulo, 1998)和抑制脂质过氧化(Boveris et al., 2000)也说明其潜在的抗氧化作用。此外,过量的NO会导致亚硝化胁迫(nitrosative stress),因此,ROS/NO的平衡是非常重要的。

Mata和Lamattina(2001)的研究表明,在

干旱2和3小时后,用 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ SNP预处理的离体小麦叶片的水分保持能力比用水或者 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 预处理的高15%。在受到干旱胁迫7天后的小麦幼苗中也观察到SNP处理提高保水能力的效应。这些结果与SNP处理的离体小麦叶片中蒸腾速率降低20%相一致。 NO 也能诱导紫露草 (*Tradescantia* sp.)、*Salpichroa organifolia*和蚕豆的气孔分别关闭35%、30%和65% (Mata and Lamattina, 2001)。膨压丧失后,ABA被诱导合成以及ABA刺激保卫细胞 NO 的合成,但脱水对 NO 产生的影响还不清楚。Leshem和Haramaty (1996)报道萎蔫增加豌豆植株的 NO 释放量,但对拟南芥却相反 (Magalhaes et al., 2000)。这可能是由于种间差异,也可能是由于水分胁迫的强度不同。然而,施加 NO 供体确实能使几种植物气孔的孔径减小,从而降低植物的蒸腾。有证据表明 NO 与ROS相互作用,诱导ABA的生物合成。在小麦 (*Triticum aestivum*) 幼苗对于干旱胁迫的反应中,类NOS活性增加,ABA的积累被NOS抑制剂所抑制 (Zhao et al., 2001)。已经提出 NO 也是ABA诱导的气孔关闭的一种信号组分; NO 的合成对于ABA诱导的气孔关闭是需要的,此外,ABA促进保卫细胞中 NO 的合成 (Neill et al., 2002a; Mata and Lamattina, 2003)。

短期热胁迫引起苜蓿 (*Medicago sativa*) NO 产生的增加 (Leshem, 2001)。施加 NO 可调节番茄、小麦和玉米的冷耐性 (Lamattina et al., 2001)。这些效应可能与 NO 的抗氧化性质有关,在经历冷和热胁迫后, NO 抑制ROS积累到较高的水平 (Neill et al., 2002b)。

Zhao等 (2004) 的研究表明,在两种生态类型的芦苇 (*Phragmites communis*) 愈伤组织中,外源SNP降低Na的程度与SNP的浓度有关,并增加Ca和K/Na比例; N^ω -硝基-L-精氨酸 (N^ω -nitro-L-arginine, NOS的抑制剂) 和1-羟氧基-2-苯基-3-氧-4,4,5,5-四甲基-咪唑啉

(2-phenyl-4,4,5,5-tetramethyl-imidazole-1-oxyl-3-oxide, 专一的 NO 清除剂) 能拮抗 NO 的效应,增加Na含量,降低Ca含量和K/Na比例。 NO 通过促进质膜 H^+ -ATPase活性的表达和增加K/Na比例诱导盐耐性 (Zhao et al., 2004)。

Mackerness等 (2001) 利用 NO 供体和NOS抑制剂,表明UV-B诱导的查耳酮合酶 (chalcone synthase, CHS) 的基因表达是通过一种类NOS起作用。在UV-B辐射前,用 NO 供体处理马铃薯块茎,健康叶片的数量比未用 NO 预处理的植株高50% (Lamattina et al., 2001)。

与 NO 相互作用的大气污染物可能是臭氧。在拟南芥植株中,臭氧处理在水杨酸 (salicylic acid, SA) 积累和细胞死亡之前诱导NOS活性 (Rao and Davis, 2001)。 NO 诱导烟草合成SA (Durner et al., 1998)。 NO 处理增加臭氧诱导的乙烯产生量和增加叶片的伤害 (Rao and Davis, 2001)。

3.2 NO 与生物相互作用

用无毒的 *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* 处理大豆培养物诱导 NO 的迅速合成,类似于 H_2O_2 产生的动力学 (Delledonne et al., 1998)。此外, NO 供体诱导细胞的死亡,以及苯丙氨酸解氨酶 (phenylalanine ammonia-lyase, PAL) 和CHS基因的表达。细菌诱导的细胞死亡和PAL基因的表达被NOS的抑制剂阻断,以及在大豆的细胞质中鉴定出组成性NOS的活性。在拟南芥叶片中,由*P. syringae* pv *glycinea* 诱导的超敏反应 (hypersensitive response, HR) 被NOS抑制剂降低。这些结果表明病原体诱导的经NOS产生的 NO 与 H_2O_2 相互作用,调节HR。

Durner等 (1998) 也提供了令人信服的证据,表明 NO 在植物防御反应中的作用。用具有诱导HR的TMV品种感染烟草植株诱导NOS活性,但这种诱导的NOS活性被NOS抑

制剂抑制。NO 也诱导 SA 的合成和防御相关基因 PR-1 的表达。SA 是一种防御信号分子,与系统性获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR) 有关 (Draper, 1997)。SA 处理导致 NO 产生的增加,在 HR 和 SAR 过程中, H_2O_2 、NO 与 SA 之间存在着复杂的信号关系 (Song and Goodman, 2001)。

在病原体侵染的过程中,植物抗毒素 (phytoalexin) 的积累是另一个与 HR 有关的现象。用 NO 供体处理马铃薯块茎增加植物抗毒素的积累 (Noritake et al., 1996)。NO 的这种调节效应被 NO 清除剂 PTIO 所抑制。NO 处理大豆子叶触发植物抗毒素的生物合成 (Modolo et al., 2002)。此外,诱导物 (elicitor) 引起的植物抗毒素的形成被 NOS 抑制剂抑制,暗示 NOS 在这个途径中作为 NO 的来源。

NO 也在细菌与豆科植物的共生过程中起作用。Mathieu 等 (1998) 用 EPR 发现了大豆根瘤中存在 NO, Herouart 等 (2002) 用激光共聚焦显微镜也发现了苜蓿根瘤中存在 NO。已经在羽扇豆属的根瘤中检测到了 NOS 的免疫活性 (Cueto et al., 1996)。然而,NO 在共生过程中的确切功能还很明白了。

4 NO 与程序性细胞死亡

PCD 是一种由遗传决定的且受代谢指导的细胞自杀性事件。NO 诱导的细胞死亡也具有 PCD 的特征,如染色质浓缩,需要基因表达和类 caspase 级联的活化。在拟南芥细胞中,半胱氨酸蛋白酶 (cysteine protease) 的过量表达抑制病原菌和 NO 诱导的细胞死亡。

Deledonne 等 (2001) 证明 NO 和 ROS 之间的相互作用决定 PCD 是否发生;NO 本身不能引起大豆细胞培养物发生 PCD,但 NO 与超氧化物比值可能决定 PCD;当超氧化物的水平高于 NO 时,NO 与超氧化物反应生成过亚硝酸,过亚硝酸不引起 PCD;当 NO 的量大于超氧化物时,NO 与超氧化物歧化作用生成的

H_2O_2 反应,引起细胞死亡。de Pinto 等 (2002) 证明了 H_2O_2 和 NO 与抗氧化剂含量之间的相互作用。在烟草 BY-2 细胞中,低浓度的 NO 或 H_2O_2 单独作用不能引起 PCD,对 PAL 活性也没有影响;但 H_2O_2 和 NO 共同处理诱导大量增加具有 PCD 特征的细胞死亡以及 PAL 活性。此外, H_2O_2 和 NO 共同处理也增加还原抗坏血酸和谷胱甘肽的酶活性。

在大麦糊粉层细胞中,GA 诱导的 PCD 被 NO 延迟,这种现象与过氧化氢酶 (catalase) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase) 活性丧失被延迟有关 (Beligni et al., 2002)。然而,NO 不抑制 GA 诱导的 α -淀粉酶的表达及其活性,这说明 NO 对细胞代谢不具有普遍的作用,而是作为 PCD 的一种专一的内源调节分子起作用 (Beligni et al., 2002)。

机械胁迫引起的 PCD 也可能涉及 NO。在大叶落地生根 (*Kalanchoe daigremontiana*) 中,叶片和愈伤组织离心诱导 NO 的产生以及随后的 DNA 断裂和细胞死亡 (Pedroso et al., 2000)。Garcês 等 (2001) 也表明拟南芥组织的机械胁迫也通过类 NOS 诱导 NO 的产生。

PCD 与线粒体功能的改变和 NO 的作用有关。在哺乳动物细胞中,短期暴露于 NO 通过复合物 (complex) 的可逆抑制来降低线粒体的呼吸作用。延长在 NO 中的暴露时间导致复合物的逐渐的和持续的抑制,同时降低了细胞内谷胱甘肽的浓度,最终导致细胞的死亡 (Clementi et al., 1998)。在植物细胞中,NO 通过抑制细胞色素氧化酶的活性抑制线粒体的 ATP 的合成 (Yamasaki et al., 2001)。线粒体活性的改变促进植物细胞的 PCD。在拟南芥细胞中,NO 通过呼吸作用的抑制和线粒体细胞色素 c 的释放诱导 PCD 的发生 (Zottini et al., 2002)。用 NO 处理甜橙 (*Citrus sinensis*) 培养物诱导具有 PCD 特征的细胞死亡 (Saviani et al., 2002)。环孢霉素 A (cyclosporine A) 是一种线粒体渗透转变孔 (permeability tran-

sition pore, PTP) 形成的抑制剂, 抑制NO诱导的PCD以及线粒体的膜电势 (Saviani et al., 2002)。

5 NO的信号转导

作为有效的信号分子, 当需要时它必须迅速和高效率地产生, 在细胞内诱导特定的反应; 当不再需要时, 迅速和高效率地消除。NO具有典型的信号分子作用。例如, 持续的NO合成是其他信号途径运转所必须的, 清除NO将抑制一些信号途径。另一种可能的潜在效应是组成型产生的NO抑制某些专一的细胞过程。

NO也能与其他的潜在的信号分子起作

用, 例如超氧化物阴离子自由基 ($\cdot O_2^-$) (Pryor and Squadrito, 1995)。在植物中, 超氧化物的来源包括线粒体和叶绿体的电子漏, 以及NADPH氧化酶 (Neill et al., 2002b, 2002c)。实际上, 如果超氧化物一旦产生, H_2O_2 的存在是不可避免的。在植物中, 超氧化物和 H_2O_2 被认为是信号分子 (Neill et al., 2002b)。如果NO与超氧化物或者 H_2O_2 起反应, 这可能潜在地清除超氧化物或者 H_2O_2 信号。超氧化物和NO自由基, 或者 H_2O_2 和 NO^+ 之间的反应产物是过氧化亚硝酸离子, 本身是一种具有活性的破坏性化合物。NO也能与蛋白质, 特别是巯基起反应 (Neill et al., 2003)。

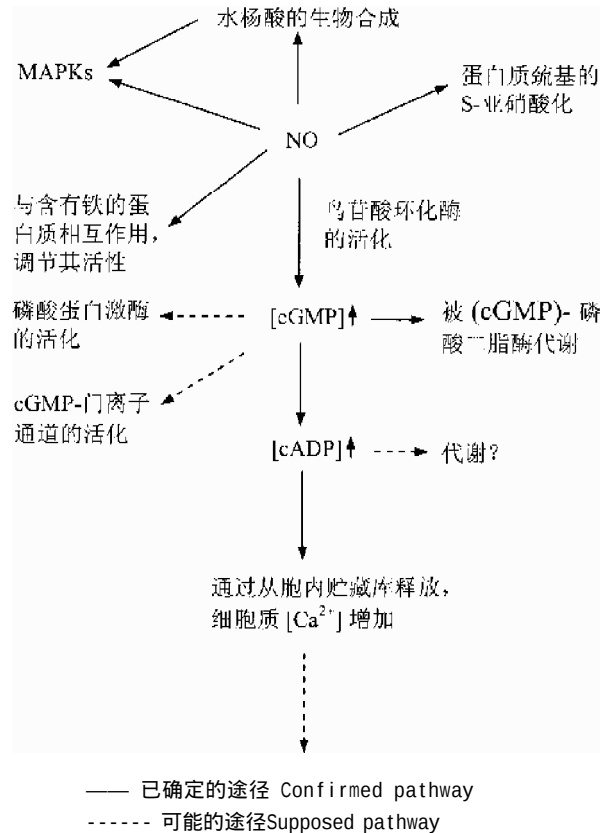


图2 NO的信号转导

MAPKs. 分裂素活化的蛋白激酶

Fig. 2 NO signaling transduction

MAPKs. Mitogen activated protein kinase (Neill et al., 2003)

NO是一种可扩散的简单小分子,因此,不可能存在NO的专一性受体。然而,植物细胞确实能感受NO,且许多细胞活性被NO调节。已知NO具备与多种靶分子反应的能力,所以可能有几种细胞内“NO感受器”。到目前为止,有关植物NO信号转导途径的知识还知之甚少,动物细胞NO信号的研究进展已大大促进了该领域的研究。Wendehenne等(2001)比较研究了哺乳动物和植物系统中的NO信号,尽管在哺乳动物细胞中有不依赖环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的途径,但NO的细胞内信号包括cGMP和环腺苷二磷酸核糖(cyclic ADP-ribose)的产生以及细胞质Ca²⁺浓度的增加。图2描述了植物细胞中可能的NO信号转导途径。

6 结语

NO作为一种信号分子,调节植物生长发育的各个方面。近年来,关于NO在植物中的作用和信号转导机制的研究迅速增加,已经确认NO是内源代谢物,但NO的生物合成还不完全清楚。NO可以通过NR从亚硝酸盐合成,

也可以通过NOS、XOR和非酶促途径合成,但类似于哺乳动物的NOS至今还没有在植物中证实;这些途径在NO合成中的份额,以及对不同逆境因子的响应也不清楚。因此,NO生物合成酶及其编码基因的鉴定和随后的转基因操作应作为研究重点。

在植物中,NO能够诱导PCD、气孔关闭、种子萌发和根的生长等不同的生理过程。在细胞内NO以几种不同的氧化还原形式存在,每种形式都能激活专一的细胞事件,以及不同的NO供体产生不同形式的NO。利用不同的NO供体,确定不同形式的NO及其所激活的专一细胞事件也是非常重要的。

细胞内对NO反应的信号包括cGMP、cADPR和细胞质Ca²⁺浓度的增加,但在许多情况下,这些反应的精确的生物化学和细胞生物学本质还不清楚(Neill et al., 2003)。需要鉴定和定量植物细胞中的cGMP和cADPR,克隆合成或降解cGMP和cADPR需要的基因。同样,被NO活化或抑制的蛋白激酶和蛋白磷酸酶、转录因子、离子通道以及其他信号蛋白也需要鉴定和描述。

参 考 文 献

- Anderson L, Mansfield TA (1979) The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environmental Pollution*, 20: 113-121
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderama R, Palma JM, Lupianez JA, del Rio LA (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36729-36733
- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002) Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley abewone layers. *Plant Physiology*, 129: 1642-1650
- Beligni MV, Lamattina L (1999) Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Science*, 4: 299-299
- Beligni MV, 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 MV, Lamattina L (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment*, 24: 267-278
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell*, 16: 332-341
- Boveris AD, Galatro A, Puntarulo S (2000) Effect of nitric oxide and plant antioxidants on microsomal content of lipid radicals. *Biology Research*, 33: 159-165
- Caro A, Puntarulo S (1998) Nitric oxide decreases

- superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiologia Plantarum*, 104: 357-364
- Chandok MR, Ytterberg AJ, van Wijk KJ, Klessig DF (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 113: 469-482
- Cheng HY, He HY, Soug SQ (2006) The studies on germination characteristics of *Pellacalyx yumanensis* seeds. *Seed Science and Technology*. (in press)
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000) NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *The Plant Journal*, 24: 667-677
- Clementi E, Brown GC, Feelisch M, Moncada S (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 7631-7636
- Corpas FJ, Barroso JB, Esteban FG, Romero-Puertas MC, Valderrama R, Carreras A, Quirós M, León AM, Palma M, Sandalio LM, del Río LA (2001) Peroxisomes as a source of nitric oxide in plant cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 33: 573-573
- Crawford NM, Guo FQ (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in Plant Science*, 10: 195-200
- Cueto M, Hernández-Perea O, Martín R, Bentura ML, Rodrigo J, Lama S, Golvano MP (1996) Presence of nitric oxide synthase in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters*, 398: 159-164
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394: 585-588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98: 13454-13459
- de Pinto MC, Tomassi F, de Gara L (2002) Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology*, 130: 698-708
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme nitrate reductase mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 99: 16314-16318
- Draper J (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends in Plant Science*, 2: 163-165
- Durner J, Gow AJ, Stamler JS, Glazebrook J (1999) Ancient origins of nitric oxide signaling in biological systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 96: 14206-14207
- Durner J, Klessig DF (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2: 369-374
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 95: 10328-10333
- Foissner I, Wendehenne D, Langebartels C, Durner J (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal*, 23: 817-824
- Furchgott RF (1995) Special topic: nitric oxide. *Annals Review of Physiology*, 57: 659-682
- Garcés H, Durzan D, Pedrosio MC (2001) Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany*, 87: 567-574
- García-Mata C, Lamattina L (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology*, 128: 790-792
- Giba Z, Grubisic D, Konjevic R (2003) Nitrogen oxides as environmental sensors for seeds. *Seed Science Research*, 13: 187-196
- Giba Z, Grubisic D, Todorovic S, Sajc J, Stojakovic D, Konjevic R (1998) Effect of nitric oxide-releasing

- compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seeds. *Plant Growth Regulation*, 26: 175-181
- Godber BLJ, Doel JJ, Durgan J, Eisenthal R, Harrison R (2000a) A new route to peroxynitrite: a role for xanthine oxidoreductase. *FEBS Letters*, 475: 93-96
- Godber BLJ, Doel JJ, Sapkota GP, Blake DR, Stevens CR, Eisenthal R, Harrison R (2000b) Reduction of nitrite to nitric oxide catalysed by xanthine oxidoreductase. *Journal of Biological Chemistry*, 275: 7757-7763
- Graziano M, Beligni MV, Lamattina L (2002) Nitric oxide improves iron availability in plants. *Plant Physiology*, 130: 1852-1859
- Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302: 100-103
- Harrison R (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radical Biology & Medicine*, 33: 774-797
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F (2004) Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science*, 305: 1968-1971
- Herouart D, Baudouin E, Frendo P, Harrison J, Santos R, Jamer A, van de Sype G, Tousti D, Puppo A (2002) Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-rhizobium symbiosis? *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 619-624
- Hogg N (2000) Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 1478-1486
- Hufton CA, Besford RT, Wellburn AR (1996) Effects of NO ($^{*}\text{NO}_2$) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glass-house lettuce grown hydroponically in winter CO₂ enrichment. *New Phytologist*, 133: 495-501
- Keeley JE, Fotheringham CJ (1997) Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science*, 276: 1248-1250
- Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, Nagoshi H, Hirata Y, Nagano T (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry*, 70: 2446-2453
- Lamattina L, Beligni MV, Garcia-Mata C, Laxalt AM (2001) Method of enhancing the metabolic function and the growing conditions of plants and seeds. US Patent. US 6242384 B1.
- Laxalt AM, Beligni MV, Lamattina L (1997) Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *European Journal of Plant Pathology*, 103: 643-651
- Lea PJ (1999) Nitrate assimilation. In: Lea PJ, Leegood RC eds. *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Wiley, London, pp. 163-192
- Leshem Y (2001) Nitric oxide in plants. Kluwer Academic Publishers. London, UK
- Leshem YY, Haramaty E (1996) The characterisation and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *Journal of Plant Physiology*, 148: 258-263
- Leshem YY, Haramaty E, Iluz D, Malik Z, Sofer Y, Roitman L, Leshem Y (1997) Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 35: 573-579
- Leshem YY, Pinchasov Y (2000) Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of Experimental Botany*, 51: 1471-1473
- Mackerness SAH, Jordan B, Thomas B (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Letters*, 489: 237-242
- Magalhaes JR, Monte DC, Durzan D (2000) Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of*

- Plants, 6: 117-127
- Mata CG, Lamattina L (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126: 1196-1204
- Mata CG, Lamattina L (2003) Absciscic acid, nitric oxide and stomatal closure—is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science*, 8: 20-26
- Mathieu C, Moreau S, Frendo P, Puppo DMJ (1998) Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghe moglobin complexes. *Free Radical Biology & Medicine*, 24: 1242-1249
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, Salgado I (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. meridionalis elicitor. *Plant Physiology*, 130: 1288-1297
- Murphy ME, Noack E (1994) Nitric oxide assay using haemoglobin method. *Methods in Enzymology*, 233: 240-250
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002a) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiology*, 128: 13-16
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT (2002b) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signaling molecules in plants. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1237-1247
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2002c) Hydrogen peroxide signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 388-395
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003) Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*, 159: 11-35
- Ninnemann H, Maier J (1996) Indication for the occurrence of nitric oxide synthase in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology*, 64: 393-398
- Noritake T, Kawakita K, Doke N (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology*, 37: 113-116
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology*, 129: 854-956
- Pedroso MC, Magalbaes JR, Durzan D (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany*, 51: 1027-1036
- Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *The American Journal of Physiology*, 268: L699-L700
- Rao MV, Davis KR (2001) The physiology of ozone induced cell death. *Planta*, 213: 682-690
- Ribeiro EA, Cunha FQ, Tamashiro WMS, Martins IS (1999) Growth phase- dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters*, 445: 283-286
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of Experimental Botany*, 53: 103-110
- Sakihama Y, Nakamura S, Yamasaki H (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthesis organisms. *Plant and Cell Physiology*, 43: 290-297
- Saviani EE, Orsi CH, Oliveira FP, Pinto-Maglio CAF, Salgado I (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Letters*, 510: 136-140
- Scherer GFE, Holk A (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amarantus caudatus*. *Plant Growth Regulation*, 32: 345-350
- Song F, Goodman RM (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14: 1458-1462
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P (2001) A plasma membrane-bound enzyme of to-

- bacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212: 835-841
- Takahashi S, Yamasaki H (2002) Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512: 145-148
- Tu J, Shen WB, Xu LL (2003) Regulation of nitric oxide on the aging process of wheat leaves. *Acta Botanica Sinica*, 45: 1055-1062
- Tun NN, Holk A, Scherer GFE (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, 509: 174-176
- Vranova E, Inze D, van Breusegem F (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1227-1236
- Weitzberg E, Lundberg JON (1998) Nonenzymatic nitric oxide production in humans. *Nitric oxide*, 2: 1-7
- Wendehenne D, Durner J, Klessig DF (2004) Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence response. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 449-455
- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science*, 6: 177-183
- Wildt J, Kley D, Rockel A, Rockel P, Segschneider HJ (1997) Emission of NO from several higher plant species. *Journal of Geophytology Research*, 102: 5919-5927
- Wojtaszek P (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not. *Phytochemistry*, 54: 1-4
- Yamasaki H, Sakiham Y (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation. *FEBS Letters*, 468: 89-92
- Yamasaki H, Shimoji H, Ohshiro Y, Sakiham Y (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Biological Chemistry*, 5: 261-270
- Zhao Z, Chen G, Zhang C (2001) Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology*, 28: 1050-1061
- Zhao L, Zhang F, Guo J, Yang Y, Li B, Zhang L (2004) Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology*, 134: 849-857
- Zottini M, Formentin E, Scattolin M, Carimi F, Io Schiavo F, Terzi M (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality in vivo. *FEBS Letters*, 515: 75-78