

REVIEW

**PHYSIOLOGICAL ROLE OF NITRIC OXIDE (NO) AT VEGETATIVE
ORGANISMS**

Glyan'ko A.K. , Mitanova N.B. , Stepanov A.V.

*Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Division, Russian Academy of Sciences.
Irkutsk, 664033, Russia.*

E-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Received July 08, 2009

In article the literary data on a physiological role nitric oxide (NO) at vegetative organisms are generalized. Multifunctionality NO at the various organisms, caused by high reactionism of this molecule, its ability to react with proteins and low-molecular substances is emphasized. Questions of participation NO in various physiological processes, possible mechanisms of synthesis NO at plants, interaction with others endogenous molecules, and also the mechanisms preventing toxic effect nitric oxide are considered.

ОБЗОР

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА (NO) У РАСТИТЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМОВ.

Глянко А.К., Митанова Н.Б., Степанов А.В.

*Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск*E-mail: akglyanko@sifibr.irk.ru

Поступила в редакцию 8 июля 2009 г

На основе знаний о функциях оксида азота (NO) в животных тканях обобщены литературные данные о физиологической роли NO у растительных организмов. Подчеркивается многофункциональность NO у различных организмов, обусловленная высокой реакционной способностью этой молекулы, ее способностью реагировать с белками и низкомолекулярными веществами. Рассмотрены вопросы участия NO в различных физиологических процессах, возможные механизмы синтеза NO у растений, взаимодействие с другими эндогенными молекулами, а также механизмы, предотвращающие токсический эффект NO.

Ключевые слова: оксид азота (NO)/ синтаза оксида азота (NOS)/ NOS-подобная реакция/ нитрозилирование, нитрование белков/ нитрозативный стресс.

Оксид азота (NO) газообразная, нейтральная двухатомная молекула (свободный радикал), легко проникающая через мембраны клеток организмов с периодом полураспада в биологических средах около 6 сек. Однако при низких концентрациях (меньше чем 1 мкМ) период ее полураспада увеличивается и может составлять минуты до часа (Stohr, Ullrich, 2002).

NO как радикал обладает широким спектром биологического действия, обуславливая активацию и ингибирование цепных свободнорадикальных реакций. Образует многочисленные низкомолекулярные N-

соединения с валентностью атома азота от -3 до +6 (Меньщикова и др., 2000).

30-40 лет назад NO и др. газообразные молекулы азота рассматривались как поллютанты – загрязнители атмосферы. Революция в отношении NO произошла в конце 80-х - начале 90-годов прошедшего столетия, когда было установлено, что фундаментальная роль оксида азота связана с его сигнальной функцией в клетках млекопитающих и регуляцией различных физиологических процессов (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987; Culotta, Koshland, 1992). В 1992 году журнал “Science” назвал NO –

молекулой года (Koshland, 1992). С тех пор огромное количество публикаций посвящено изучению биологических свойств этой молекулы в живых организмах. В 1998 году за успехи в изучении роли NO в регуляции сердечно-сосудистой системы трем американским физиологам была присуждена Нобелевская премия в области физиологии и медицины. В настоящее время общепризнано, что NO – это многофункциональная сигнальная молекула, активная во всех организмах - от бактерий до животных и растений.

У млекопитающих NO вовлекается в регуляцию сосудистого гомеостаза, в нейрональную сигнализацию, в иммунный ответ организма на инфекцию, воспаление и др. процессы (Schmidt, Walter, 1994; Меньщикова и др., 2000). NO играет ключевую роль в активации макрофагов в животных клетках и в защите клеток от патогенных бактерий, а также участвует в развитии ряда заболеваний у человека (Проскураков и др., 1999). Исследования показали, что механизмы действия NO у генетически разных организмов проявляют большую степень сходства, что позволяет предполагать о древнем происхождении биологической роли NO у животных, растений, бактерий и др. организмов (Durner et al., 1999). Однако высокая реактивность и “янус-ликий” характер NO затрудняет разработку модели о ее роли в сигнальных путях клетки (Меньщикова и др., 2000; Grün et al., 2006). В больших концентрациях молекула NO токсична для бактерий, грибов, опухолевых клеток, вирусов, растений, животных (Zumft, 1997). В микромолярных концентрациях оксид азота индуцировал активность каспаз, вызывал распад нуклеиновых кислот и уменьшал синтез АТФ в клетках табака (Дубовская и др., 2007). Токсичность молекулы NO связана с ее высокой реактивностью к белкам, содержащим металлы с

переменной валентностью, и кислороду, а также ее способностью образовывать продукты с аминами и тиолами (Van der Vliet et al., 1996). Исходя из этого, в научную литературу введен термин «нитрозативный стресс» (nitrosative stress) аналогично «окислительному стрессу» (oxidative stress) (Hausladen, Stamler, 1999; Klatt, Lamas, 2000).

NO в животных клетках. В клетках животных синтез NO осуществляется путем окисления аминокислоты α -аргинина до цитруллина и NO. Реакция НАДФН-зависима и катализируется ферментом – синтазой оксида азота (НФ: 1.14.13.39). В клетках млекопитающих найдено 3 основных изоформы синтазы оксида азота (NOS). Все они названы по наименованию тканей, из которых были выделены: нейрональная (nNOS), индуцибельная из макрофагов (iNOS), эндотелиальная (eNOS). Выделена изоформа из митохондрий печени крысы (mtNOS), которая подобна iNOS (Wendehenne et al. 2001). Все NOS- изоформы обнаруживают 50-60% идентичность в их аминокислотной последовательности. Каждая NOS представляет двойной домен, содержащих N-терминальную оксигеназу и C-терминальную редуктазу. Домен оксигеназы имеет гемовый центр и сайты для кофактора тетрагидробиоптерина. Домен редуктазы содержит НАДФН, ФАД и ФМН-связывающие сайты. Оба домена взаимодействуют с помощью кальмодулин-связывающего сайта в ферменте. Кроме того, каждая NOS имеет различную протяженность N-терминального конца, определяющего внутриклеточную локализацию фермента.

nNOS и eNOS – конститутивные изоформы, а iNOS индуцируется в макрофагах и в некоторых других типах животных клеток в ответ на инфекционные факторы. Активность nNOS и

eNOS в сильной степени зависит от повышения внутриклеточного свободного Ca^{2+} , который связывается в комплекс Ca^{2+} - кальмодулин. Активность iNOS не зависит от концентрации внутриклеточного Ca^{2+} и кальмодулин связывается с ферментом даже в отсутствии цитозольного Ca^{2+} . iNOS характеризуется стабильностью и высокой активностью. Количество продуцируемой им NO на 2-3 порядка выше по сравнению с конститутивными NOS (Marletta, 1994). Большие количества NO, продуцируемые NOS макрофагов, обуславливают цитотоксический и антибактериальный эффект в иммунной системе млекопитающих (Schmidt, Walter, 1994).

Молекула NO давно известна в неорганической химии как лиганд в железогемных комплексах. Она образует относительно стабильные комплексы с железом в геме цитохрома P-450, гемоглобина, леггемоглобина и в самой NOS. В последнем случае оксид азота, образованный при участии NOS, ингибирует активность фермента (Marletta, 1994).

Биологическое действие NO и NO-производных (например, пероксинитрита) основывается на химической модификации биологических молекул посредством связывания с металлами с переменной валентностью в металлобелках (металлонитрозилирование), ковалентной модификации белковых остатков цистеина (S-нитрозилирование) и тирозина (тирозиннитрование). Эти процессы рассматриваются как специфические посттрансляционные модификации белков. Металлонитрозилирование и S-нитрозилирование считаются обратимыми, а тирозиннитрование – необратимым процессом (Schopfer et al., 2003). Известно более 100 белков, которые идентифицированы как мишени для NO

(Besson-Bard et al., 2008). В результате NO-модификации белки изменяют свои свойства – активируются или ингибируются. Изменение конформации белков под действием NO может сопровождаться активацией или инактивацией транскрипционных факторов и таким образом может влиять на экспрессию генов. С другой стороны, NO может активировать сигнальные процессы, включая синтез салициловой кислоты, циклического гуанозинмонофосфата (cGMP), потоки Ca^{2+} , обратимое фосфорилирование белков. Все эти процессы в свою очередь оказывают влияние на транскрипционные факторы, ведущие к экспрессии генов (Neill et al., 2003).

Роль NO в растениях. Работы по изучению NO у растений были начаты в 70-годах прошедшего столетия с установления феномена эмиссии NO из растительных тканей (Anderson, Mansfield, 1979; Klepper, 1979). Этими авторами и другими (Wildt et al., 1997) было установлено выделение NO из тканей растений при нормальных физиологических условиях произрастания растений и усиление эмиссии NO при высокой концентрации в почве нитратного азота, обработке растений гербицидами, салициловой кислотой и другими биологически активными веществами.

Так, при нормальных условиях листья подсолнечника продуцируют NO от 0,05 до 0,3 нмоль / г / ч (Rockel et al., 2002), а листья табака около 1 нмоля (Mur et al., 2005). При действии аноксии продукция NO увеличивается в листьях подсолнечника до 170 нмоль (Rockel et al., 2002), при действии патогенной инфекции на листья табака до 40 нмоль и до 10 мкмоль / г / ч – при обработке листьев сои нитратами (Mur et al., 2005; Klepper, 1987).

Изучение физиологической и биохимической роли NO в растениях в те годы ограничивалась небольшим количеством работ до публикации в 1998 году статей Delledonne с соавт. и Durner с соавт. о роли NO в растениях как сигнальной молекулы, инициирующей защитные реакции растения. В последние годы итоги исследований о роли оксида азота в растениях регулярно обобщаются в научной периодической печати (Beck et al., 1999; Wojtaszek, 2000; Lamattina et al., 2003; Neill et al., 2003; Wendehenne et al., 2004; Дмитриев, 2004; Arasimowicz, Floryszak-Wiczorek, 2007; Molina-Favero et al., 2007; Besson-Bard et al., 2008; Hong et al., 2008). Установлено, что NO вовлечен во многие метаболические процессы в растениях: в защитные реакции (Hong et al., 2008), тропизмы (Hu et al., 2005), цветение (He et al., 2004), в устьичный механизм (Neill et al., 2008), образование ксилемы (Gabaldon et al., 2005), адаптацию и ответ на стрессовые воздействия (Valderrama et al., 2007), формирование корней (Correa-Aragunde et al., 2004; Pagnussat et al., 2003) и другие физиологические процессы (Beligni, Lamattina, 2000).

Изучен профиль генов у арабидопсиса, экспрессируемых NO (нитропруссидом натрия) (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004). Показано, что в ответ на обработку растений 0,1 мМ раствором нитропруссиды натрия (донора NO) экспрессируется 124 ген, а при обработке 1,0 мМ раствором – 261 ген. При этом 43 гена активируются при обеих концентрациях NO (Parani et al., 2004). Обработка растений связывающим NO соединением (тушителем, скавенджером) - РТНО (2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazole-1-oxyl), нивелировала активирующее влияние NO на экспрессию генов арабидопсиса (Parani et al., 2004). Это позволяет говорить о специфичности действия NO на уровень транскриптов. Большинство

активируемых под влиянием NO генов активируются также и при действии других абиотических и биотических стрессовых факторов, что говорит о вовлечении NO в регуляцию широкого диапазона физиологических функций, связанных с защитой растения от болезней и патогенных бактерий, окислительным стрессом, сигнальной трансдукцией и транскрипционными факторами (Parani et al., 2004). В то же время по данным Parani et al. (2004) из 342 генов арабидопсиса, активируемых NO, 126 – кодируют белки с неизвестными функциями

Значительная локализация NO обнаружена в сосудистых тканях листьев молодых растений гороха, а на субклеточном уровне интенсивное образование NO наблюдалось в пероксисомах при участии фермента подобного NOS, использующего аргинин как субстрат реакции (Barroso et al., 1999; Corpas et al. 2004).

NOS идентифицирована в митохондриях животных, а в растительных митохондриях NOS-подобная реакция обнаружена в корнях *Arabidopsis thaliana* (Guo, Crawford, 2005). Модуляция активности альтернативной оксидазы в митохондриях может происходить за счет NO, образуемой в пероксисомах (Barroso et al., 1999; Huang et al., 2002). Однако NO в высокой концентрации может вызывать окислительный стресс и гибель клеток (Zottini et al., 2002). При этих условиях наблюдается почти 3-кратное повышение экспрессии гена альтернативной оксидазы в листьях арабидопсиса (Parani et al., 2004), что может противодействовать ингибированию цитохромоксидазы и повышению устойчивости к NO-токсичности (Huang et al., 2002).

Взаимодействие NO с другими сигнальными молекулами. NO сигнальная система тесно

пересекается с другими сигнальными путями и отдельными сигнальными молекулами (Тарчевский, 2000). В этом плане особое внимание уделяется активным формам кислорода (АФК), ионам кальция (Ca^{2+}), салициловой кислоте (СК), cGMP и cADPR (Courtois et al., 2008; Neill et al., 2008; Asai, Yoshioka, 2008).

В животных тканях важной мишенью для оксида азота, как сигнальной молекулы, является фермент - гуанилатциклаза. Циклический гуанилат монофосфат (cGMP), который образуется при связывании NO с гемом гуанилатциклазы, регулирует многие клеточные функции (McDonald, Murad, 1995). В растениях cGMP участвует в индукции синтеза метаболитов, вовлеченных в защитные реакции (Bowler et al., 1994). Примечательно, что гены табака, ответственные за синтез защитных метаболитов, индуцируются как NO, так и cGMP и циклической аденозиндифосфатрибозой (cADPR). Эти две молекулы служат вторичными мессенджерами в NO-сигналинге у животных. Увеличение в тканях табака под воздействием NO уровня cGMP напоминает картину изменения уровня cGMP под влиянием NO в клетках гладкой мускулатуры млекопитающих (Durner et al., 1998). Эти авторы предполагают, что растения и животные используют общие механизмы для трансдукции NO-сигнала.

Обработка суспензионной культуры клеток или листьев табака нитропруссидом натрия, приводила к временному увеличению в несколько раз содержания эндогенной cGMP, к экспрессии генов, кодирующих *PRI* (с патогенезом связанный белок) и фенилаланинаммонийлиазу (*PAL*) (Durner et al., 1998). Таким образом, NO, cGMP, cADPR могут активировать гены, кодирующие синтез метаболитов, которые оказывают токсический эффект на патогенные бактерии. Причем их

влияние взаимосвязанное и синергическое. Механизмы этого влияния в настоящее время активно изучаются у разных организмов (Besson-Bard et al., 2008).

NO является одним из ключевых мессенджеров, осуществляющих регуляцию гомеостаза Ca^{2+} (Courtois et al., 2008). Почти все типы кальциевых каналов и транспортеров находятся под контролем оксида азота. NO изменяет их активность путем S-нитрозилирования или через вторичные мессенджеры – cGMP и cADPR. Так, cADPR способствует выделению Ca^{2+} из внутриклеточного пространства у животных и растительных клеток через активацию Ca^{2+} -проницаемых каналов (Fliegert et al., 2007). В то же время экспозиция суспензионных клеток бобов и табака на растворе с NO-донором приводила к быстрому увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоле и его оттоку из внеклеточного пространства (Lamotte et al., 2004). Выход кальция в цитозоль активирует АФК-генерирующие ферменты, в том числе пероксидазы и НАДФН-оксидазы (Desikan et al., 1998; Колупаев, Карпец, 2009).

В NO-сигнальный каскад, модулирующий активность кальциевых каналов, возможно вовлекается протеинкиназа с молекулярным весом 42 кД, идентичная протеинкиназе, активируемой осмотическим стрессом в культуре суспензионных клетках табака (*NiOSAK*) (Lamotte et al., 2006). В то же время осмотический стресс ведет к быстрому усилению синтеза NO в листьях табака (Gould et al., 2003). Доказательство участия протеинкиназ в NO-каскаде, связанном с Ca^{2+} -каналами, приводятся в обзоре Courtois et al. (2008).

Физиологическая роль NO как Ca^{2+} -модулирующего соединения доказана в опытах с суспензионными клетками табака и винограда (Gould et al., 2003; Lamotte et al., 2004, 2006; Vandelle et al., 2006). В частности, в этих опытах отток Ca^{2+} в цитоплазму на фоне действия осмотического стресса и патогенного элиситора уменьшался под влиянием NO-скавенгера (PTIO) и ингибиторов активности животной NOS. Предполагается, что изменение концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме и внеклеточном пространстве может быть объяснено прямым или косвенным влиянием NO на сигнальные белки, которые включают Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы (CDPKs), митогенактивируемые протеинкиназы (MAPKs) (Besson-Bard et al., 2008). По данным Parani et al. (2004) NO регулирует транспирационный уровень 24 протеинкиназ из различных классов. Поскольку протеинкиназы по современным представлениям являются основными соединениями в сигнальной сети в клетке и между клетками (Nakagami et al., 2005) становится понятным то разнообразное количество ответов организма на действие NO, таких как экспрессия генов защиты, закрытие устьиц, формирование боковых корней и др. (Lamattina et al., 2003).

Взаимодействие АФК и NO хорошо изучено при фитопатогенезе, когда системная приобретенная устойчивость формируется на основе сверхчувствительной реакции клетки (СВЧ) и последующей ее гибели. Как показали исследования гибель клетки растения-хозяина при СВЧ есть результат одновременного действия H_2O_2 и NO (Zaninotto et al., 2006). Во взаимодействие NO и АФК вовлекается НАДФН-оксидаза, продуцирующая супероксид анион ($\text{O}_2^{\cdot-}$), и с участием супероксиддисмутазы

- H_2O_2 (Глян'ко и др., 2008; 2009). При взаимодействии NO с $\text{O}_2^{\cdot-}$ образуется пероксинитрит (OONO^-), который как и NO, может реагировать с белками (нитрование, S-нитрозилирование) и изменять их свойства (Lindermayr et al., 2005). Соотношение NO, $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 и OONO^- определяет СВЧ клетки на инвазию фитопатогена или действие элиситора на растение (Delledonne et al., 2001; Zhao et al., 2007).

Хорошо известно, что СК является важнейшей сигнальной молекулой у растений при патогенезе. NO при участии СК (усилителя каскада реакций, инициируемых оксидом азота) вызывает экспрессию генов защиты и, в частности, синтез *PR1* и *PAL* (Durner et al., 1998). При этом влияние NO на экспрессию защитных генов у растений усиливается АФК и СК, то есть имеет синергический характер (Delledonne et al., 1998). H_2O_2 может влиять на сигнальные функции NO посредством активации синтеза СК, которая в свою очередь, являясь конкурентным ингибитором каталазы, способствует накоплению H_2O_2 (Rao et al., 1997).

Таким образом, NO вовлечена во многие ответы клетки на любое стрессовое воздействие. Однако изучение взаимосвязи NO с другими сигнальными молекулами четко показывает, что накопление одного сигнального компонента недостаточно, чтобы индуцировать какие-либо физиологические изменения (Zaninotto et al., 2006). Накопление в клетках растений активных форм азота (АФА), инициируемое действием неблагоприятных факторов, вызывает нитрозативный стресс у растений, который сопровождается накоплением в клетках растений NO и продуктов ее взаимодействия с другими

молекулами, таких как пероксинитрит, S-нитрозоглутатион, нитрогирозин и др. Эти соединения могут оказывать токсическое действие на растительные организмы (Valderrama et al., 2007). Очевидна тесная взаимосвязь нитрозативного стресса с окислительным стрессом (Valderrama et al., 2007). Доказано инициирование нитрозативного стресса у растений в тканях растений при действии солевого стрессора. При этом показателями стресса служили данные об уровне АФА – оксида азота, S-нитрозотиолов, S-нитрозоглутатиона (Valderrama et al., 2007). Однако механизмы этих процессов остаются неизвестными. По данным Дубовской и др. (2007) при окислительном стрессе в клетках табака, вызванном действием экзогенной H_2O_2 , NO в микромолярных концентрациях подавляла перекисное окисление липидов, фрагментацию тотальной ДНК. В миллимолярной концентрации NO оказывала токсический эффект, выражающийся в усилении каспазо-подобной активности, деградации ДНК и клеточных белков, в уменьшении синтеза АТФ. По данным Asai, Yoshioka (2009) NO играет кардинальную роль в защите клеток табака от некротрофического патогена *Botrytis cinerea*.

Отмечается тесная связь NO с фитогормональным обменом (Lamattina et al., 2003; Molina-Favero et al., 2007). В ауксин-зависимом образовании придаточных корней NO действует как вторичный мессенджер в синтезе ИУК (Pagnussat et al., 2003). Необходимость NO в ауксинозависимом образовании клубеньков у бобовых с недетерминатным типом дифференциации клубеньков сообщена в работе Pii et al. (2007). Тесная связь фитогормонального обмена с метаболизмом NO подтверждена и в других работах. Так, обработка растений экзогенными фитогормонами - ауксином, АБК, кинетином, приводила к усилению синтеза NO в клетках растений (Tun et al., 2001; Neill et al.,

2002; Tun et al., 2008). Отмечается, что одной из возможных причин отрицательного влияния высоких доз нитратного азота на формирование бобово-ризобийного симбиоза может быть нарушение в балансе ауксинов и оксида азота, инициирующее деление кортикальных клеток и образование примordia клубенька (Глянько и др., 2009a).

Синтез NO у растительных организмов.

Вопрос о путях синтеза NO однозначно решен для животных организмов: образование NO в этом случае происходит из α -аргинина, с участием O_2 и восстановленного НАДФ. Реакция катализируется синтазой оксида азота (NOS) по следующей схеме: α -аргинин + O_2 + НАДФН \rightarrow α -цитрулин + оксид азота. Все изоформы NOS специфически утилизируют α -аргинин как субстрат (Меньщикова и др., 2000).

Что касается растительных организмов, то этот вопрос до сих пор окончательно не решен. В настоящее время исследователями активно обсуждаются два пути синтеза NO в растениях: нитрат/нитрит - и α -аргинин – зависимые пути. Первый путь предусматривает восстановление нитратов и нитритов в листьях и корнях до NO с участием цитозольной нитратредуктазы (НР) (Yamasaki, Sakihama, 2000; Garcia-Mata, Lamattina, 2003; Meyer et al., 2005; Shi, Li, 2008) и нитрит-NO-редуктазы, локализованной на плазматической мембране корней табака (Stohr et al., 2001). Участие ассимиляционной НР в генерации NO в настоящее время в общем доказано. Тем более, что еще в начале 60-годов прошлого столетия Fewson и Nicholas (1960) обнаружили NO как промежуточное соединение при восстановлении нитратов растениями и микроорганизмами. Вопрос в том в каких количествах NO может образовываться с участием НР. По данным Rockel et al. (2002) продукция NO при насыщающих концентрациях

субстрата составляет только 1% от нитратвосстанавливающей способности НР. Однако при создании определенных условий (аноксия, высокая доза азотного удобрения и др.) активность НР повышается и соответственно увеличивается в цитозоле уровень нитритов и генерация NO (Rockel et al., 2002). Авторы делают вывод, что экзо- и эндогенные условия, способствующие изменению концентрации нитратов в цитозоле или скорости восстановления нитритов могут увеличивать или уменьшать генерацию NO с участием НР. Функциональное состояние НР определяется фосфорилированием или дефосфорилированием фермента (Lea et al., 2004). Считают, что количество образующего в клетках растений NO при участии НР более чем достаточно для ее действия как сигнальной молекулы (Meuer et al., 2005). Однако, как отмечалось выше, экспрессия ядерного генома на примере арабидопсиса под влиянием NO – это процесс, зависящий от уровня оксида азота: чем выше концентрация NO в клетках тем больше экспрессированных генов и выше интенсивность образования транскриптов (Parani et al., 2004). Участие НР в генерации NO было подтверждено в опытах с мутантами арабидопсиса, дефицитных по НР, и показано, что синтез NO с участием НР – основное звено в сигналинге АБК (абсцизовой кислоты) в регуляции открытия и закрытия устьичных клеток (Bright et al., 2006).

Другим компартментом восстановления нитратов и нитритов может быть плазматическая мембрана клеток растений. По данным Stohr et al. (2001) НР (ПМ-НР), локализованная на плазматической мембране в ассоциации с нитрит-NO-редуктазой (НиPNOP) восстанавливают нитраты и нитриты с образованием NO. Высокие дозы минерального азота, а также биотические факторы (ризобии и грибная микориза) усиливают генерацию NO, что

совпадает с усилением активности ПМ-НР, но не цитоплазматической НР (Stohr, Stremlau, 2006). Однако сведений об идентификации НиPNOP в настоящее время нет (Besson-Bard et al., 2008).

Наиболее дискуссионным является вопрос о генерации NO в растениях путем окисления α -аргинина с помощью NOS. Гомолога идентичного животной NOS в геноме *Arabidopsis* не обнаружено (*Arabidopsis Genome...*, 2000). Однако в настоящее время имеется достаточно много данных, свидетельствующих о наличии в тканях и органеллах растений NOS-подобной реакции (Cueto et al., 1996; Barroso et al., 1999; Ribeiro et al., 1999; Crawford, 2006). Подтверждением существования в растениях NOS-зависимой ферментной реакции служит ингибирование в тканях и в суспензионных культурах усиления генерации NO в ответ на действие различных экзогенных факторов с помощью ингибиторов животной NOS (Foissner et al., 2000; Tun et al., 2001; Guo et al., 2003; Lamotte et al., 2004; Vandelle et al., 2006; Zhao et al., 2007a; Arnaud et al., 2006). В исследованиях Corpas et al. (2004; 2006; 2008; 2009) существование NOS-подобной активности в листьях гороха было подтверждено различными методами: конфокальной лазерной микроскопией, ингибиторным анализом, применением антител к животной iNOS и др. Выделен и очищен из пероксисом листьев гороха фермент (или ферментный комплекс), обладающий NOS-активностью и использующий для своей реакции те же субстраты что и животная NOS (Corpas et al., 2009).

Особенно много вопросов возникает в последнее время относительно гена *AtNOS1*, идентифицированного в *Arabidopsis thaliana*, кодирующего белок с NOS-активностью. Этот белок (*AtNOS1* или *AtNOA1*) обладает большой степенью подобия к белку из улитки,

участвующего в генерации NO (Guo, Crawford, 2005). Имеется достаточно много работ, доказывающих участие этого белка с NO-синтазной активностью в различных физиологических процессах: в цветении (He et al., 2004), в АБК-сигнальной трансдукции (Guo et al., 2003), в липосахаридном воздействии (Zeidler et al., 2004). Последние работы (Shi, Li, 2008; Tun et al., 2008) также заостряют внимание на *AtNOS1/AtNOA1* как генераторе NO. Однако способность этого белка катализировать реакцию образования NO из аргинина была подвергнута сомнению (Zemojtel et al., 2006; Crawford et al., 2006). По мнению Zemojtel et al. (2006) этот белок может быть ГТФ-азой (GTPase), вовлеченной в рибосомный биогенез в митохондриях и в процессы трансляции. Это предположение подтверждено в работе Moreau et al. (2008), которые доказали, что *AtNOA1* из арабидопсиса не является NO-продуцирующим ферментом, а относится к семейству малых ГТФ-аз. Подобная точка зрения на *AtNOA1* как ГТФ-азу подробно разбирается в обзоре Besson-Bard et al. (2008), где указываются возможные просчеты исследователей при изучении *AtNOA1* как NO-продуцирующего фермента.

В последнее время внимание исследователей привлекает путь биосинтеза NO с участием полиаминов. Так, показано, что спермин и спермидин индуцируют быстрый синтез NO в различных тканях арабидопсиса (Tun et al., 2006; Yamasaki, Cohen, 2006; Flores et al., 2008). В этой связи предполагается присутствие в тканях арабидопсиса неизвестного фермента (ов), который (е) катализируют превращение полиаминов с образованием оксида азота. Этими ферментами могут быть аргиназа или аргининдекарбоксилаза, которые теряют свою активность при действии ингибиторов животной NOS и в этих условиях могут косвенно

супрессировать синтез NO с участием полиаминов (Besson-Bard et al., 2008).

Есть данные, что NOS-активностью обладает Р-белок из глицин-декарбоксилазного комплекса растений (Chandok et al., 2003), а также пероксидаза из хрена, которая катализирует образование NO из гидроксимочевины (Huang J. et al., 2002).

Существует еще один путь образования NO в растениях: это неэнзиматическое восстановление нитритов в кислой среде в присутствии восстановителя. Так, показано, что клетки алейронового слоя ячменя в достаточно кислом апопластном компартменте могут восстанавливать нитриты до оксида азота в присутствии аскорбиновой кислоты и фенолов (Beligni, Lamattina, 2000; Bethke et al., 2004). Неэнзиматическое восстановление нитритов в апопластном пространстве клеток растений считают одним из путей образования NO в растениях, особенно в корнях (Stohr, Ullrich, 2002; Bethke et al., 2004).

Отмечается такой парадоксальный факт, когда дефицитные по НР и нитратам мутанты арабидопсиса содержали в 10 раз меньше α -аргинина, являющегося субстратом для NOS-подобных ферментов (Modolo et al., 2006). Это свидетельствует о том, что синтез NO через нитрат - и нитритвосстанавливающий путь каким-то образом связан с метаболизмом α -аргинина. По другим данным активность аргиназы и пул аргинина весьма значительны при прорастании семян и росте проростков арабидопсиса (Zonia et al., 1995). В работе Филиппович с соавт. (2007) у мутантов гриба *Neurospora crassa*, лишенных нитрат- и нитритредуктазной активности, и выращенных на среде не содержащей азотные соли, наблюдался выброс нитратов и нитритов в среду

выращивания. Авторы считают, что синтезируемый в клетках гриба NO (без участия НР и НИР) превращается в нитраты и нитриты, которые выделяются в среду выращивания мицелия.

По нашим данным синтез NO, оцениваемый с помощью NO-специфической флюоресцентной пробы (с 4,5-диаминофлюоресцеин диацетатом, DAF-2 DA) и применением конфокальной микроскопии, наблюдается в эпидермальных клетках корней этиолированных проростков гороха, экспонированных на воде. Добавление в среду с проростками α -аргинина (1мМ) существенно увеличивало флюоресценцию в поверхностных клетках корней. Эти результаты могут свидетельствовать о наличии синтеза NO в клетках корня в нормальных физиологических условиях с помощью механизма, использующего α -аргинин.

Таким образом, вопрос о путях синтеза NO в растениях остается до конца неясным и открытым для дальнейших исследований. По мнению Flores et al. (2008) в растениях могут быть несколько источников образования NO и некоторые из них могут регулироваться через сигнальные пути (downstream).

Механизмы, предотвращающие токсический эффект NO. Как уже отмечалось, высокие концентрации NO оказывают токсическое действие на организмы. Нитрозативный стресс, вызываемый действием неблагоприятных экзогенных факторов, сопровождается накоплением свободной NO и ее дериватов – пероксинитрита и других низкомолекулярных N-соединений. Особенно токсичен продукт реакции NO с $O_2^{\cdot-}$ - пероксинитрит ($ONOO^-$), который может окислять тиоловые остатки, нитровать тирозин белков, что препятствует их фосфорилированию (Reiter et al., 2000). На

животных тканях доказано нитрование оксидом азота вторичных аминов с образованием канцерогенных N-нитрозосоединений (Меньшикова и др., 2000). У животных организмов предполагается функционирование цикла оксида азота, в котором благодаря циклическим превращениям NO и продуктов его взаимодействия с др. веществами обеспечивается эффективная регуляция метаболизма NO (Реутов, 1995; Реутов и др., 2005).

Аналогично окислительному стрессу организмы, очевидно, должны обладать системой защиты от токсического действия активных форм азота (АФА). Однако вопрос о защитных механизмах против нитрозативного стресса у растительных организмов практически не исследовался и нет четких представлений в этом вопросе.

Одним из механизмов, защиты растительных клеток от токсического действия NO, может быть эмиссия этого газа из клеток в окружающую среду, что ведет к уменьшению уровня оксида азота в клетках. Этот процесс доказан как для почв, так и растений (Klepper, 1979, 1991; Scibe et al., 1993; Wildt et al., 1997).

Другим механизмом обезвреживания NO и его деривата – пероксинитрита, является их взаимодействие с белковыми молекулами путем нитрилизирования и нитрования остатков цистеина и тирозина или связывания с металлами в гемных белковых комплексах. Однако все эти процессы являются посттрансляционными модификациями белков и могут модулировать процессы обмена, оказывая положительное или отрицательное действие на организмы. О пользе и вреде таких модификаций белков говорилось выше.

В последние годы внимание исследователей уделяется так называемым несимбиотическим

формам гемоглобина у растений. Эти формы гемоглобина синтезируются в растениях в ответ на различные стрессовые воздействия (Dordas et al., 2003; Perazzolli et al., 2004). Хотя физиологическое значение этих форм гемоглобина до конца неясно, роль их как “тушителей” NO – очевидна (Dordas et al., 2003). Несимбиотический гемоглобин и леггемоглобин могут выступать как “тушители” NO в функционирующих клубеньках бобовых (Shimoda et al., 2005; Vieweg et al., 2005). По данным Shimoda et al. (2005) содержание несимбиотического гемоглобина (*LbHgl*) увеличивается в функционирующих клубеньках в ответ на ризобиальную инфекцию, сопряженную с преходящим увеличением NO в корнях *Lotus japonicus*.

Известно, что сильным ингибитором токсического эффекта пероксинитрита в животных тканях являются ураты – продукты распада пуринов (Balavoine, Geletii, 1999). В растениях ураты содержатся в очень незначительных количествах, за исключением некоторых бобовых растений с уреидным типом усвоения NH_3 . По данным Alamillo и Garcia-Olmedo (2001) экзогенные ураты предотвращают токсический эффект пероксинитрита у арабидопсиса. Механизм снятия токсического эффекта пероксинитрита, по-видимому, связан с нитрозилированием уратов (Vasquez-Vivar et al., 1998).

Токсичность NO в существенной степени зависит от ее концентрации в растительных клетках. И это обстоятельство может обуславливать двойственную роль NO в животной или растительной клетке: как антиоксиданта, предотвращающего разрушительное действие АФК, и как прооксиданта, способного, совместно с АФК, вызывать СВЧ и программированную клеточную

смерть. Токсичность NO необходимо оценивать и с точки зрения типа стресса, возникающего в растительных тканях при действии абиотических или биотических факторов. Так, в системах, в которых токсичность обуславливается в основном АФК, NO может действовать как соединение, связывающее кислородные радикалы (O_2^-), и тем самым ограничивающее повреждение (Wink et al., 1993). Соединения, связывающие NO, могут, вероятно, служить своеобразными “депо” для оксида азота, который может при определенных условиях высвобождаться в свободное состояние.

Заключение.

То, что NO нормальный продукт обмена веществ у растений, не вызывает сомнений, как и тот факт, что концентрация этого соединения может увеличиваться многократно при действии на животные и растительные организмы неблагоприятных факторов. “NO-взрыв”- еще один термин (по аналогии с “окислительным взрывом”), свидетельствующий о важности изучения роли оксида азота и его дериватов в устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам (Foissner et al., 2000). В то же время способность NO оказывать на различные обменные процессы разнонаправленное действие обуславливается его высокой способностью превращаться в другие нитросоединения (NO_3^- , NO_2^- , NO^- , NO^+ , NO_2^- -радикал и др.) и реагировать с другими эндогенными веществами. Возможно, что это еще один из механизмов, участвующий в обезвреживании NO. По мнению Меньшиковой с соавт. (2000) уникальные физико-химические свойства NO используются организмами для эффективной регуляции его содержания в тканях и участия в сигнальных механизмах.

Плодотворной для изучения роли NO в растительных организмах может быть концепция цикличности NO и его дериватов в клетках и тканях млекопитающих (Реутов, 1995; Реутов и др., 2005). Для растительных организмов важно установление механизма активации синтеза NO и его дериватов при различных неблагоприятных воздействиях. Какие растительные рецепторы связаны с активацией продукции оксида азота? Однако ответ на этот вопрос осложняется тем, что в растениях (в отличие от животных) существует, по-видимому, несколько механизмов синтеза NO и пока нет ответа - какой из них главный.

Можно ли ожидать от изучения роли оксида азота в растительных организмах эффекта аналогичного его роли в клетках млекопитающих, в том числе человека? При ответе на этот вопрос прежде всего необходимо отметить роль оксида азота для растений как сигнальной молекулы, запускающей защитные механизмы растения при неблагоприятных воздействиях (Тарчевский, 2000). Во-вторых, некоторые нитросоединения, к которым относятся и нитраты, это элементы питания для растений. При избыточных дозах растения "сбрасывают" нитраты в вакуоль и тем самым предотвращают их восстановление до аммиака с образованием промежуточных соединений. Гораздо важнее избыток нитратов для человека при питании растительной пищей, содержащей большое количество нитратов. Образование канцерогенных нитрозосоединений при взаимодействии NO-дериватов с аминами – главная опасность для здоровья человека. "Янус-ликость" NO, установленная для животных клеток, по-видимому, свойственна и для растительных клеток. Дальнейшие исследования сигнальной роли NO и продуктов его взаимодействия с др. молекулами, антагонистическое и синергетическое влияние на

обменные процессы, прооксидантное и антиоксидантное действие – это далеко неполный перечень вопросов, решение которых важно для понимания роли оксида азота в растительных организмах.

ЛИТЕРАТУРА

- Глянько А.К., Васильева Г.Г., Ищенко А.А., Миронова Н.В., Путилина Т.Е. (2008) Активность НАДФН-оксидазы в корнях проростков гороха при ризобийной инфекции в зависимости от действия неблагоприятных факторов. *Вестник Харьковского нац. аграр. ун-та. Серия Биология*, 3 (15), 6-14.
- Глянько А.К., Ищенко А.А., Митанова Н.Б., Васильева Г.Г. (2009) НАДФН-оксидаза растений. *Вестник Харьковского нац. аграр. ун-та. Серия Биология*, 2 (17), 3-17.
- Глянько А.К., Васильева Г.Г., Митанова Н.Б., Ищенко А.А. (2009а). Влияние минерального азота на бобово-ризобийный симбиоз. *Известия РАН. Серия биол.*, 36, 302-312.
- Дмитриев А.П. (2004) Сигнальная роль оксида азота у растений. *Цитология и генетика*, 38, 67-75.
- Дубовская Л.В., Колеснева Е.В., Князев Д.М., Волотовский И.Д. (2007) Защитная роль оксида азота при окислительном стрессе, индуцированном в растениях табака пероксидом водорода. *Физиология растений*, 54, 847-855.
- Колупаев Ю.Е., Карпец Ю.В. (2009) Активные формы кислорода при адаптации растений к стрессовым температурам. *Физиология и биохимия культ. растений*, 49, 95-108.
- Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. (2000) Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных

- функциональных состояниях. *Биохимия*, 65, 485-503.
- Проскуряков С.Я., Конопляников А.Г., Иванников А.И., Скворцов В.Г. (1999) Биология окиси азота. *Успехи соврем. биологии*, 119, 380-395.
- Реутов В.П. (1995) Цикл оксида азота в организме млекопитающих. *Успехи биол. химии*. 35, 189-228.
- Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Косицын Н.С. (2005) Проблемы оксида азота и цикличности в биологии и медицине. *Успехи соврем. биологии*, 125, 41-65.
- Тарчевский И.А. (2000) Сигнальные системы клеток растений. Наука, М.
- Филиппович С.Ю., Бачурина Г.П., Крицкий М.С. (2007) Исследование выброса нитрата и нитрита из клеток мутантов *Neurospora crassa*, лишенных нитрат- и нитритредуктазной активности. *Прикладная биохимия и микробиология*, 43, 331-337.
- Alamillo J.M. and Garcia-Olmedo F. (2001) Effect of urate, a natural inhibitor of peroxynitrite-mediated toxicity, in the response of *Arabidopsis thaliana* to the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant J.*, 25, 529-540.
- Anderson L. and Mansfield T.A. (1979) The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. *Environ. Pollution*, 20, 113-121.
- Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *A. thaliana* (2000). *Nature*, 408, 796-815.
- Arasimowicz M. and Floryszak-Wieczorek J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Science*, 172, 876-887.
- Arnaud N., Murgia I., Boucherez J., Briat J.F., Cellier F. and Gaymard F. (2006) An iron-induced nitric oxide burst precedes ubiquitin-dependent protein degradation for *Arabidopsis AtFee1* ferritin gene expression. *J. Biol. Chem.*, 281, 23579-23588.
- Asai S. and Yoshioka H. (2008) The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity. *Plant Signaling Behavior*, 3, 920-922.
- Asai S. and Yoshioka H. (2009) Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant-Microbe Interac.*, 22, 619-629.
- Balavoine G.C. and Geletii Y.V. (1999) Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. Part 1: convenient assay. *Nitric Oxide*, 3, 40-45.
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Sandalio L.M., Valderrama R., Palma J.M., Lupianez J.A. and del Rio L.A. (1999) Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.*, 274, 36729-36733.
- Beck K-F., Eberhardt W., Frank S., Huwiler A., Mebmer U.K., Muhl H. and Pfeilschifter J.P. (1999) Inducible NO synthase: role in cellular signaling. *J. Exp. Biol.*, 202, 645-653.
- Besson-Bard A., Pugin A. and Wendehenne D. (2008) New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 21-39.
- Bethke P.C., Badger M.P. and Jones R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell*, 16, 332-341.
- Beligni M.W. and Lamattina L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, there light-inducible responses in plants. *Planta*, 210, 215-221.
- Bowler C., Neuhaus G., Yamagata H. and Chua N-H. (1994) Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction. *Cell*, 77, 73-81.
- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S. and Neill S.J. (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are

- dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.*, 45, 113-122.
- Chandok M.R., Ytterberg A.J., van Wijk K.J., Klessig D.F. (2003) The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, 113, 469-482.
- Corpas F.J., Palma J.M., del Rio L.A. and Barroso J.B. (2009) Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytol.*, 184, 9-14.
- Corpas F.J., Chaki M., Fernandez A., Valderrama R., Palma J.M., Carreras A., Begara-Morales J.C., Airaki M., del Rio L. and Barroso J.B. (2008) Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol.*, 2008, 1711-1722.
- Corpas F.J., Barroso J.B. Carreras A., Quiros M., Leon A. M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gomez M. and Del Rio L.A. (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.*, 136, 2722-2733.
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Leon A.M. and del Rio L. (2006) Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224, 246-254.
- Correa-Aragunde N., Graziano M. and Lamattina L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta*, 218, 900-905.
- Courtois C., Besson A., Dahan J., Bourque S., Dobrowolska G., Pugin A. and Wendehenne D. (2008) Nitric oxide signaling in plants: interplays with Ca²⁺ and protein kinases. *J. Exp. Bot.*, 59, 155-163.
- Crawford N.M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.*, 57, 471-478.
- Crawford M.N., Galli M., Tischner R., Heimer Y.M., Okamoto M. and Mack A. (2006) Response to Zemojtel et al.: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trend Plant Sci.*, 11, 526-527.
- Culotta E. and Koshland D.E. (1992) NO news is good news. *Science*, 258, 1862-1865.
- Cueto M., Hernandez-Perera O., Martin R., Bentura M.L., Rodrigo J., Lamas S. and Golvano M.P. (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.*, 398, 159-164.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. and Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394, 585-588.
- Delledonne M., Zeier J., Marocco A. and Lamb C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 13454-13459.
- Desikan R., Burnett E.C., Hancock J.T. and Neill S.J. (1998) Harpin and hydrogen peroxide induce the expression of homologue of gp91-phox in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *J. Exp. Bot.*, 49, 1767-1771.
- Dordas C., Rivoal J. and Hill R.D. (2003) Plant haemoglobins, nitric oxide and hypoxia stress. *Ann. Bot.*, 91, 173-178.
- Durner J., Wendehenne D. and Klessig D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 10328-10333.
- Durner J., Gow A.J., Stamler J.S. and Glazebrook J. (1999) Ancient origins of nitric oxide signalling in biological systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 14206-14207.
- Foissner I., Wendehenne D., Laanegartels C. and Durner J. (2000) Technical advance: in vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide

- burst in tobacco. *Plant J.*, 23, 817-824.
- Fewson C.A. and Nicholas D.J.D. (1960) Utilization of nitric oxide by microorganisms and higher plants. *Nature*, 188, 794-796.
- Fliegert R., Gasser A. and Guse A.H. (2007) Regulation of calcium signalling by adenine-based second messengers. *Biochem. Soc. Trans.*, 35, 109-114.
- Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P.K., Corra-Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L. and Polacco J.C. (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signalling in root development. *Plant Physiol.*, 147, 1936-1946.
- Gabaldon C., Gomez Ros L.V., Pedreno M.A. and Ros Barcelo A. (2005) Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol.*, 165, 121-130.
- Garcia-Mata C. and Lamattina L. (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci.*, 8, 20-26.
- Gould K., Lamotte O., Klinguer A., Pugin A. and Wendehenne D. (2003) Nitric oxide production by tobacco leaves: a general stress response? *Plant Cell Environ.*, 26, 1851-1862.
- Grun S., Lindermayr S. and Durner J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.*, 57, 507-516.
- Guo F.Q., Okamoto M. and Crawford N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 302, 100-103.
- Guo F.Q. and Crawford N.M. (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase 1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell*, 17, 3436-3450.
- Hausladen A. and Stamler J.S. (1999) Nitrosative stress // *Methods Enzymology*. 300, 389-395.
- He Y., Tang R.H., Hao Y., Stevens R.D., Cook C.W., Ahn S.M., Jing L., Yang Z., Chen L., Guo F., Fiorani F., Jackson R.B., Crawford N.M. and Pei Z.-M. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 305, 1968-1971.
- Hong J.K., Yun B-W., Kang J-G., Raja M.U., Know E., Sorhagen K., Chu C., Wang Y. and Loake G.J. (2008) Nitric oxide function and signaling in plant disease resistance. *J. Exp. Bot.*, 59, 147-154.
- Huang J., Sommers E.M., Kim-Shapiro D.B., King S.B. (2002) Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *J. Am. Chem. Soc.*, 124, 3473-3480.
- Huang X., Rad U. and Durner J. (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric-oxide tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta*, 215, 914-923.
- Hu X., Neill S.J., Tang Z. and Cai G.J. (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol.*, 137, 663-670.
- Ignarro L.J., Byrns R.E., Buga G.M. and Wood K.S. (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Res.*, 61, 866-879.
- Yamasaki H. and Sakihama Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.*, 468, 89-92.
- Yamasaki H. and Cohen M.F. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci.*, 11, 522-524.
- Klatt P. and Lamas S. (2000) Regulation of protein

- function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur. J. Biochem.*, 267, 4928-4944.
- Koshland D.E. (1992) The molecule of the year. *Science*, 258, 1861.
- Klepper L.A. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emission from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environ.*, 13, 537.
- Klepper L.A. (1991) NO_x evolution by soybean leaves treated with salicylic acid and selected derivatives. *Pesticide Biochem. Physiol.*, 39, 43-48.
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M. and Pagnussat G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 109-136.
- Lamotte O., Gould K., Lecourieux D., Sequeira-Legrand A., Lebrun-Garcia A., Durner J., Pugin A. and Wendehenne D. (2004) Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.*, 135, 516-529.
- Lamotte O., Courtois C., Dobrowolska G., Besson A., Pugin A. and Wendehenne D. (2006) Mechanisms of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana glauca* cells. *Free Radic. Biol. Med.*, 40, 1369-1376.
- Lindermayr C., Saalbach G. and Durner J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 137, 921-930.
- Lea U.S., ten Hoopen F., Provan F., Kaiser W.M., Meyer C. and Lillo C. (2004) Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta*, 219, 59-61.
- Marletta M.A. (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78, 927-930.
- McDonald L.J. and Murad F. (1995) Nitric oxide and cyclic GMP signaling. *Adv. Pharmacol. Chmother.*, 34, 263-276.
- Meyer C., Lea U.S., Provan F., Kaiser W.M. and Lillo C. (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth. Res.*, 83, 181-189.
- Modolo L.V., Augusto O., Almeida I.M.G., Pinto-Maglio C.A.F., Oliveira H.C., Pinto-Maglio C.A.F., Seligman K. and Salgado I. (2006) Decreased arginine and nitric oxide levels in nitrate reductase deficient *A. thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.*, 171, 34-40.
- Molina-Favero C., Creus C.M., Lanteri M.L., Correa-Aragunde N., Lombardo M.C., Barassi C.A. and Lamattina L. (2007) Nitric oxide and plant growth promoting rhizobacteria: common features influencing root growth and development. *Adv. Bot. Res.*, 46, 1-33.
- Moreau M., Lee G.I., Wang Y., Crane B.R. and Klessig D.F. (2008) AtNOS/ AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 283, 32957-32967.
- Mur L.A.J., Carver T.L.W., Prats E. (2006) No way to live: the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions // *J. Exp. Bot.* 75, 2006. 489-505.
- Nakagami H., Pitzschke A. and Hirt H. (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci.*, 10, 339-346.
- Neill S.J., Desikan D., Clarke A., Hancock J.T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.*, 128, 13-16.
- Neill S.J., Desikan R. and Hancock J.T. (2003) Nitric

- oxide signaling in plants. *New Phytol.*, 159, 11-35.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D. and Wilson I. (2008) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.*, 59, 165-176.
- Palmer R.M., Ferrige A.G. and Monsada S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327, 524-526.
- Parani M.P., Myers R., Weirich H., Smith B., Leaman D.W. and Goldman S.L. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechn. J.*, 2, 359-366.
- Pagnussat G.C., Lanteri M.L. and Lamattina L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.*, 132, 1241-1248.
- Perazzolli M., Dominici P., Romero-Puertas M.C., Zago E., Zeier J., Sonoda M., Lamb C. and Delledonne M. (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin *AHb1* modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell*, 16, 2785-2794.
- Pii Y., Crimi M., Cremonese G., Spena A. and Pandolfini T. (2007) Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biol.*, 7: 21.
- Polverari A., Molesini B., Pezzotti M., Buonauro R., Marte M. and Delledonne M. (2003) Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 16, 1094-1105.
- Rao M.V., Paliyath G., Ormrod D.P., Murr D.P. and Reid D.M. (1997) Influence of salicylic acid on H₂O₂ production, oxidative stress, and H₂O₂-metabolizing enzymes (Salicylic acid-mediated oxidative damage requires H₂O₂). *Plant Physiol.*, 115, 137-149.
- Reiter C.D., Teng R.J. and Beckman J.S. (2000) Superoxide reacts with nitric oxide to nitrate tyrosine at physiological pH via peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, 275, 32460-32466.
- Ribeiro E.A., Cunha F.Q., Tamashiro W.M. and 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., Wild J. and Kaizer W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 53, 103-110.
- Schopfer F.J., Baker P.R. and Freeman B.A. (2003) NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? *Trends Biochem. Sci.*, 28, 646-654.
- Schmidt H.H.H.W. and Walter U. (1994) NO at work. *Cell*, 78, 919-925.
- Scibe U., Smith K.A. and Fowler D. (1993) Nitrification and denitrification as sources of nitric oxide and nitrous oxide in a sandy loam soil. *Soil Biol. Biochem.*, 25, 1527-1536.
- Shi F.M. and Li Y.Z. (2008) Verticillium dahliae toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase. *BMB Rep.*, 41, 79-85.
- Shimoda U., Nagata M., Suzuki A., Abe M., Sato S., Kato T., Tabata S., Higashi S. and Uchiumi T. (2005) Symbiotic Rhizobium and nitric oxide induce gene expression of non-symbiotic hemoglobin in *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.*, 46, 99-107
- Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R. and Rockel P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212, 835-841.
- Stohr C. and Ullrich W.R. (2002) Generation and possible roles of NO in plant roots and

- apoplastic space. *J. Exp. Bot.*, 53, 2293-2303.
- Stohr C. and Stremlau S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *J. Exp. Bot.*, 57, 463-470.
- Tun N.M., Holk A. and Scherer G.F. (2001) Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Lett.*, 509, 174-176.
- Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Floh E.I.S. and Scherer G.F.F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.*, 47, 346-354.
- Tun N.N., Livaja M., Kieber J.J. and Scherer G.F.E. (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytol.*, 178, 515-531.
- Vandelle E., Poinssot B., Wendehenne D., Bentejac M. and Pugin A. (2006) Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 19, 429-440.
- Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque L., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varea P., del Rio L.A. and Barroso J.B. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.*, 581, 453-461.
- Van der Vliet A., Eiserich J.P., Kaur H., Cross C.E. and Halliwell B. (1996) Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. In: Nitric oxide (ed. Packer L.) // Methods in Enzymology, 269, 175-184.
- Vasquez-Vivar J., Santos A.M., Junqueira V.B. and Augusto O. (1996) Peroxynitrite-mediated formation of free radicals in human plasma: EPR detection of ascorbyl, albumin-thyl and uric acid-derived free radicals. *Biochem. J.*, 314, 868-876.
- Vieweg M.F., Hohnjec N. and Kuster H. (2005) Two genes encoding different truncated haemoglobins are regulated during root nodule and arbuscular micorriza symbioses of *Medicago truncatula*. *Planta*, 220, 757-766.
- Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F. and Durner J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.*, 6, 177-183.
- Wendehenne D. and Klessig D.F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signaling and defense responses. *Cur. Opin Plant Biol.*, 7, 449-455.
- Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P. and Segsneider H.J. (1997) Emission of NO from several higher plant species. *J. Geophys. Res.*, 102, 5919-5927.
- Wink D.A., Hanbauer I., Krishna M.C., DeGraff W., Gamson J. and Mitchell 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.
- Zaninotto F., La Camera S., Polverari A. and Delledonne M. (2006) Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. *Plant Physiol.*, 141, 379-383.
- Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P. and Durner J. (2004) Innate immunity in *A. thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 15811-15816.
- Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M.C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L.S., Wanker E.E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P. and Durner J. (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.*, 11, 524-525.

- Zhao J., Fujita K. and Sakai K. (2007) Reactive oxygen species, nitric oxide, and their interactions play different roles in *Cupressus lusitanica* cell death and phytoalexin biosynthesis. *New Phytol.*, 175, 215-229.
- Zhao M.G., Tian Q.Y. and Zhang W.H. (2007a) Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 144, 206-217.
- Zonia L.E., Stebbins N.E. and Polacco J.C. (1995) Essential role of urease in germination of nitrogen-limited *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Physiol.*, 107, 1097-1103
- Zottini M., Formentin E., Scattolin M., Carimi F., Lo Schiavo F., Terzi M. (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS Lett.*, 515, 75-78.
- Zumft W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 533-616.