

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Biologie  
Studijní program: Biologie



Jakub Schier

Metabolismus NO při stresu rostlin  
NO plant metabolism under stress

Bakalářská práce

Školitel: Ing. Dagmar Procházková PhD.

Praha 2012

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval zejména své školitelce paní Ing. Dagmar Procházkové PhD. za její neomezenou trpělivost a dále všem , kdo mě při psaní této práce podporovali.

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré informační zdroje a použitou literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 26.srpna 2012

Jakub Schier

## Abstrakt

Práce se zabývá rolí oxidu dusnatého (*NO*) ve fyziologickém a stresovém metabolismu rostlin, představuje historii výzkumu v této oblasti, včetně nutných odboček do živočišné říše. Shrnuje fyzikální a chemické vlastnosti *NO*, které do značné míry určují jeho chování ve fyziologických procesech. Dále se práce zabývá různými možnostmi syntézy *NO* v rostlinných buňkách, přibližuje několik enzymatických i neenzymatických cest k syntéze *NO*. V dalších částech shrnuje působení *NO* na různé typy fyziologických mechanismů, antioxidační aparát buňky a konečně se zabývá jednotlivými původci stresu rostlin, jejich důsledky a roli *NO* v nich. Práce je uzavřena zvláštní kapitolou sledující vliv faktorů souhrnně nazývaných „těžké kovy“, mechanismy jejich toxicity a role antioxidačních systémů, s důrazem na roli *NO*.

Klíčová slova: oxid dusnatý (*NO*), rostlinná fyziologie, stres, těžké kovy (HM)

## Abstract

This work handles the role of nitric oxide (*NO*) in both physiological, and stress metabolism of plants, it introduces the history of *NO* studies, including necessary inclusion of some facts related to the animal kingdom. It summarizes the physical and chemical properties of *NO*, which largely influence the way it acts in physiological processes. The work further discusses the various ways *NO* is synthesized in plants, including enzymatic, and non-enzymatic means. It further deals with various ways *NO* can influence different physiological processes, antioxidant mechanisms, and finally concerns itself with various stress inducing factors, their impact on plants, and the role of *NO* in influencing physiological responses. Finally, this work includes a chapter discussing the so called „heavy metals“, mechanisms of their toxicity and the role of antioxidant mechanisms, with emphasis to role of *NO*.

Key words: nitric oxide (*NO*), stress, reactive oxygen species, antioxidant, heavy metals (HM)

## Použité zkratky

AsA - askorbát

APX - Askorbát peroxidaza

cAPX - cytosolická askorbát peroxidáza

CAT - kataláza

cGMP - cyklický guanosin monofosfát

cPTIO - 2-(4-carboxyphenyl)-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazolin-3-oxid-1-oxyl

DAF-2DA - 4,5-diaminofluorescein-diacetát

DHAR - dehydroaskorbát reduktáza

GSH - glutathion

GR - glutathion reduktáza

GST - glutathion-S-transferáza

GPX - glutathion peroxidáza

GSNO - S-nitrosoglutathion

GSNOR - S-nitrosoglutathion reduktáza

GS-FDH - glutathione-dependentní formaldehyd dehydrogenáza

HR - hypersensitivní odpověď

L-NAME - NG-nitro-L-arginine-methylester

MDHAR - monodehydroaskorbát reduktáza

NO - oxid dusnatý

NOS - enzym NO syntáza

NR - nitrát reduktáza

Ni:NOR - nitrit:NO reduktáza

NOHA - N-hydroxy-arginin

PTIO - 2-fenyl-4, 4, 5, 5-tetramethylimidazolin-3-oxid-1-oxyl

ProDH - prolin dehydrogenáza

P5CS1 - 1-pyrrolin-5-carboxylát syntetáza

ROS - reaktivní formy kyslíku

SNP - nitroprussid sodný

SOD - superoxid dismutáza

SAR - získaná systémová odolnost

SA - kyselina salicylová

XOR - xantinová oxidoreduktáza

HM - těžké kovy

# Obsah

1. Úvod	6
2. Historie oxidu dusnatého	7
3. Fyzikální a chemické vlastnosti NO	9
4. Syntéza NO v rostlinách	10
5. Účinky NO v nestresové fyziologii	14
5.1 Působení NO na zavírání průduchů	14
5.2 Působení NO během senescence	15
5.3 Působení NO během růstu rostliny	15
5.4 Efekt NO na respiraci	15
5.5 Vliv NO na aktivitu nitrát reduktázy	16
5.6 Působení NO na dormanci semen	16
5.7 NO a programovaná buněčná smrt	16
5.8 Antioxidační efekt NO	17
5.9 NO a fotosyntéza	17
6. Účinky NO ve stresové fyziologii	19
6.1 Mechanismy indukované stresové tolerance	20
6.2 Neenzymatické cesty regulace a stresová tolerance v rostlinách pomocí NO	21
6.2.1 Glutathion (GSH)	21
6.2.2 Askorbát (AsA)	21
6.3 Antioxidační enzymy a jejich interakce s NO	22
6.3.1 Superoxiddismutasa (SOD)	22
6.3.2 Askorbátperoxidáza (APX)	22
6.3.3 Monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR)	23
6.3.4 Glutathionreduktasa (GR)	24
6.3.5 Dehydroaskorbátreduktasa (DHAR)	24
6.3.6 GlutathionS-transferasa (GST)	24
6.3.7 Katalasa (CAT)	25
6.3.8 Glutathionperoxidasa (GPX)	25
6.4 Salinita	25
6.5 Sucho	26
6.6 Extrémní teploty	26
6.6.1 Vysoká teplota	26
6.6.2 Nízká teplota	26
6.7 UV B záření a $O_3$	27
6.8 Biotický stres	27
7. Účinky NO na stresovou fyziologii těžkých kovů	29
7.1 Efekty stresu HM na hladinu endogenního NO	29
7.2 Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s ROS	30
7.3 Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s komponenty buněčné stěny	30
7.4 Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s regulací genové exprese	30
7.5 Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s chelačními proteiny	30
8. Závěr	32
9. Seznam literatury	33

## 1. Úvod

Oxid dusnatý (*NO*) se v posledních 20ti letech stal z molekuly, která se těšila pouze okrajovému zájmu a jejíž účinky v živých systémech byly shrnuty jako „škodlivé“, jedním z hlavních středů zájmu nejdříve živočišné a o několik let později i rostlinné fyziologie. Za výzkum v oblastech jeho fyziologie byla roku 1998 udělena Nobelova cena a několik let předtím, v roce 1992 ocenění „Molekula roku“. Posupem času a přibývajících dat jsou odkrývány další a další aspekty z široké škály fyziologického působení *NO* jak v rostlinných systémech, na které se tato práce zaměřuje, tak v systémech živočišných.

*NO* se ukázal hrát ústřední úlohu nejen v normální fyziologii, ale také během působení stresových faktorů. Přes velké množství nahromaděných experimentálních dat je charakterizace konkrétních molekulárních mechanismů působení *NO*, které se tato práce snaží shrnout, značně nedostatečná, hlavně díky obecnému jevu celkové provázanosti fyziologických jevů, zejména signalizace a regulace buněčných procesů a proto se zdá, že se tento obor výzkumu v budoucnu ještě rozšíří a promítne do mnoha jiných aplikací.

## 2. Historie oxidu dusnatého

Oxid dusnatý (*NO*) byl ještě před několika desítkami let spojován pouze se znečištěním ovzduší a byl považován za nebezpečnou složku výfukových plynů, přispívající ke vzniku smogu a kyselých dešťů. V současnosti však patří tato molekula mezi nejstudovanější látky a její výzkum přispěl k významným klinickým pokrokům.

Objev oxidu dusnatého jako plynu, zatím ne jako biomolekuly, je značně problematické datovat, některé zdroje uvádí rok 1669 a jako objevitele chemika Johna Maywa (*Sedláček, 1999*), jiné mluví o roku 1620 a objevitelem měl být Jan Babtista van Helmont. Chemickou charakterizaci pak provedl roku 1774 Joseph Priestley. V 19. století si lékaři uvědomili dramatické zmírnění symptomů anginy pectoris v případech užívání organických nitrátů (nitroglycerin). Roku 1977 byl jejich účinek vysvětlen Feridem Muradem (*Katsuki et al., 1977*). Na funkci *NO* narazili Furchgott a Zawadski během studia vasodilatačních procesů spojených s acetylcholinem v endoteliích. Stimulace receptorů studovaných tkání vedla k uvolnění substance, kterou nazvali „endothelium derived relaxing factor“ a o několik let později byla tato substance identifikována jako *NO*. Konečný důkaz přinesl Palmer s kolektivem, kteří zjistili, že *NO* je uvolňován endoteliálními buňkami ve shodných množstvích, jaké byly pozorovány u „endothelium derived relaxing factor“ (*Furchgott a Zawadski, 1980*).

V osmdesátých letech byl *NO* popsán u savců jako hlavní signální molekula kardiovaskulárního, imunitního a nervového systému. Plní regulační, signalizační, kryoprotektivní a cytotoxické funkce (*Ignarro, 1995*).

Roku 1992 byl *NO* časopisem Science zvolen molekulou roku. V roce 1998 byla trojici Furchgott, Ignarro, Murad udělena Nobelova cena v oboru fyziologie a medicíny za objev role *NO* jako signalizační molekuly v kardiovaskulárním systému.

Od konce 90. let se *NO* jako signální molekula dostalo i do pole zájmu rostlinných biologů. Bylo zjištěno mnoho způsobů, kterými *NO* působí na fyziologii rostlin, mezi jinými například na klíčení, programovanou buněčnou smrt a senescenci, odpovědi na stres a další.

V posledních letech se také ukazuje, že *NO* pravděpodobně synergizuje s „klasickými rostlinnými hormony“, čímž se znovu značně rozšiřují jeho možné účinky.

Výzkumy fyziologie *NO* byly nejdříve prováděny hlavně metodami exogenní aplikace pomocí látek schopných *NO* uvolňovat do prostředí, případně méně často plynným *NO*, později pak indukci vnitrobuněčné syntézy. Výsledky bylo možné ověřovat přidáním látek vyvazujících *NO* ze substrátu. U výzkumu a detekce enzymů vnitrobuněčné syntézy *NO* se používají jednak protilátky proti známým homologům z říše živočichů, nebo se hledají podobné genetické sekvence a konečně v případě konkrétních dějů vedoucích ke vzniku *NO* je využívána například paramagnetická resonance.

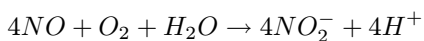
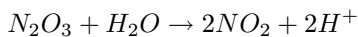
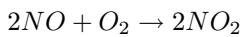
V posledních letech zájem o  $NO$  a jeho roli v rostlinách neustále vzrůstá a dochází k hromadění velkého množství relevantních dat diskutovaných v dalších kapitolách této práce.



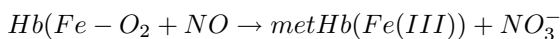
### 3. Fyzikální a chemické vlastnosti NO

NO je za normálních podmínek bezbarvý plyn s hustotou  $1,3 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3}$ , teplotou tání  $-163,6 \text{ }^\circ\text{C}$  a teplotou varu  $-151,8 \text{ }^\circ\text{C}$ . Oba atomy NO jsou spojeny dvojnou vazbou o délce  $0,115 \text{ nm}$ . Malé rozměry molekuly zajišťují snadnou difusibilitu, molekula se poměrně nesnadno rozpouští ve vodě, při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  je rozpustnost  $1,7 \text{ mmol/l}$ , podobně jako  $\text{O}_2$  nebo  $\text{N}_2$ . Je dobře rozpustná v tucích a proto snadno prochází lipidovými membránami buněk (Leshem et al., 1996).

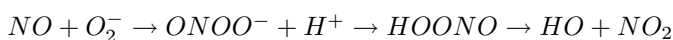
Molekula NO obsahuje jeden nepárový elektron což jí uděluje charakter radikálu a umožňuje snadno reagovat s dalšími sloučeninami (Greenwood a Ernshaw, 1993). Poločas života NO je v biologických systémech v řádu sekund a závisí na koncentraci  $\text{O}_2$  a NO v systému (Thomas et al., 2001). S  $\text{O}_2$  totiž ve fyziologických podmínkách aerobních organismů NO ochotně reaguje a tvoří  $2\text{NO}_2$  - podle rovnice:



Pokud se v buňce jednoho reaktantu nedostává, může se poločas života NO prodloužit na několik minut. Pokud jsou u reakce přítomny hemoproteiny, proběhne oxidace až na nitráty ( $\text{NO}_3^-$ ) například takto:



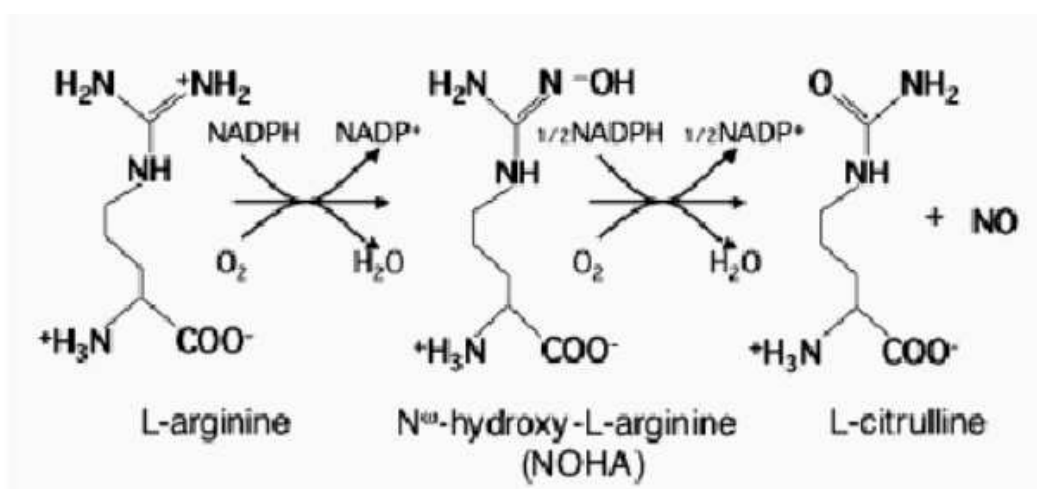
NO reaguje i s dalšími komplexy kovů a jinými radikály (Wink a Mitchell, 1998). Pro biologické systémy je pravděpodobně nejdůležitější jeho reakce se superoxidovým radikálem za vzniku peroxynitritu, který vzniká podle níže uvedené rovnice a jeho další vlastnosti budou diskutovány dále:



## 4. Syntéza NO v rostlinách

Existuje několik cest, pomocí kterých je *NO* syntetizován v rostlinách. Použití konkrétní cesty záleží na druhu rostliny, vnějších podmínkách, typu pletiva nebo buněk atd. (Neill et al., 2003).

V živočišných buňkách je zřejmě *NO* produkován hlavně pomocí *NO* syntázy (NOS). Ta katalyzuje 5 elektronovou oxidaci jednoho z atomů L-argininu ( $N_3^-$  na  $N_2^+$ ) za účasti NADPH a  $O_2^-$ .



Obr. 4.1. Schéma 5 elektronové oxidace L-argininu za vzniku L-citrulinu a *NO*, reakce je katalyzována NOS (Crawford 2006)

Přestože i v rostlinách byla detekována aktivita podobná *NO* syntáze, nepodařilo se dosud izolovat ani samotný enzym, ani DNA/cDNA sekvenci, která by ho kódovala (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Garcés et al., 2001). Pomocí inhibitorů savčí NOS se však dá inhibovat syntéza *NO* i v rostlinách, navíc byla prokázána přítomnost proteinů podobných NOS pomocí imunofluorescenčních sond proti savčím NOS isoformám (Barroso et al., 2004; Corpas et al 2006). Tyto výsledky jsou ale důkazem, o kterém se pořád dá pochybovat díky podobnosti některých domén NOS s doménami jiných proteinů (P450 Cytochrom oxidáza) (Butt et al., 2003).

Možnou nadějí pro identifikaci NOS byla izolace genové sekvence pojmenované AtNOS1 (z genomu *Arabidopsis thaliana*). Tato sekvence sice neměla žádnou homologii s dosud známými savčími NOS, avšak protein, který kódovala, se ukázal být zdrojem *NO* v procesu kontroly kvetení (He et al., 2004). Další studie na purifikovaných proteinech totiž ukázaly, že patří do rodiny proteinů vázajících GTP (Morimoto et al., 2002). Byla navržena teorie, že AtNOS slouží jako GT-Pasa účastníci se na translaci, biogenezi mitochondriálních ribosomů nebo obojí (Zemojtel et al., 2006). Spojení s translací by mohlo vysvětlit nepochybné spojení tohoto proteinu se syntézou *NO*.

I přes to, že se nejedná o dlouho hledanou NOS, identifikace AtNOS, později AtNOA1 (*NO associated*), přinesla efektivní nástroj k in vivo kontrole produkce NO pomocí AtNOA1 mutantů (Guo et al., 2003; Zeidler et al., 2004).

Dalším enzymatickým zdrojem NO v rostlinách je nitrát reduktasa (NR). Hlavní rolí NR v rostlinách je katalýza NAD(P)H dependentní dvouelektrokové redukce dusičnanu na dusitan. Experimentálně však bylo potvrzeno, že za určitých podmínek může docházet k jednoelektro- nové redukci dusitanu na NO (Kaiser et al., 2002).

Dál se předpokládá, že přechod z  $\text{NO}_2^-$  na NO probíhá na molybdenovém kofaktoru, podobně jako u dalšího z enzymů schopných katalyzovat tvorbu NO-xantine oxidoreduktáza, která má molybdenkobaltové centrum (Hancock et al., 2002).

Produkce NO závislá na aktivitě NR byla detekována v mnoha rostlinách, například ve slunečnici, špenátu a kukřici, v huseníčku, přenici a tabáku (Xu et al., 2003; Planchet et al., 2006a, 2006b). Byla demonstrována in vitro (Yamasaki et al., 2000) i in vivo (Rockel et al., 2002) a je úzce závislá na buněčné koncentraci  $\text{NO}_2$  a  $\text{NO}_3$  (Kaiser et al., 2001). pokud je in vitro vysoká koncentrace  $\text{NO}_2$  ( $100\mu\text{M}$ ), představuje syntéza NO přibližně 1% celkové aktivity nitrát reduktasy, in vivo je předpokládán podíl menší, asi 0,01-0,1% (Rockel et al., 2002).

Xanthine oxidoreduktasa (XOR) je dalším enzymem se schopností katalyzovat tvorbu NO jak v rostlinách, tak v živočišných buňkách. Tento enzym se v buňkách vyskytuje ve dvou zaměnitelných formách, jednou z forem je xantinová oxidasa produkující superoxidový radikál a xantinová dehydrogenasa (Palma et al., 2002). XOR byla identifikována v peroxysomech hrachových listů kde je převažující formou xantinová oxidasa a jen 30% enzymu je ve formě xantinové dehydrogenasy (Sandalio et al., 1988).

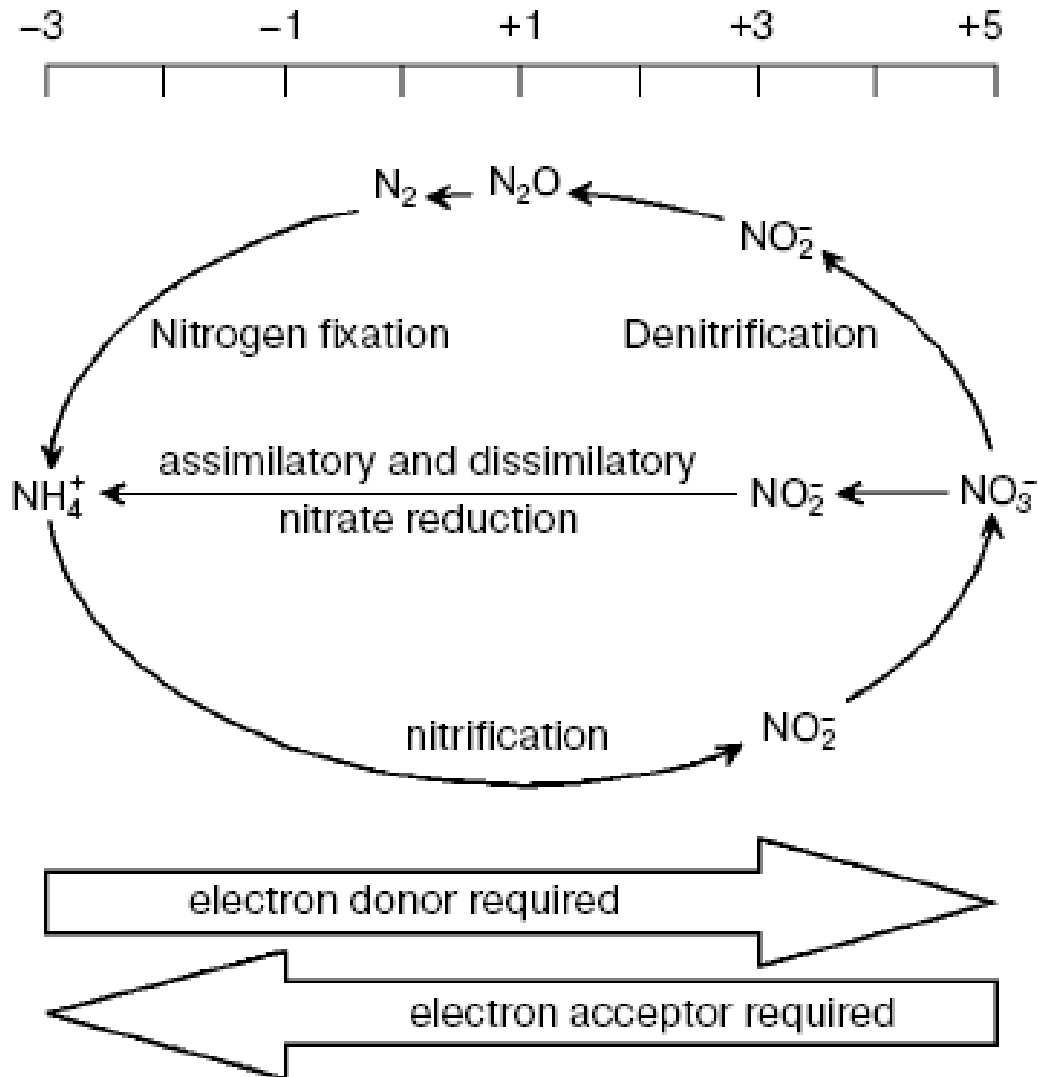
V závislosti na tlaku kyslíku v buňkách XOR produkuje buď zmíněný NO nebo superoxidový radikál, což umísťuje XOR do role zdrojového enzymu rostlinných signálních molekul (Corpas et al., 2001).

Nitrit: NO reduktasa (Ni:NOR), identifikovaná v plasmatických membránách kořenů tabáku, je stejně jako NR schopna katalyzovat přeměnu  $\text{NO}_2$  na NO - viz obr. 4.2 (Stohr et al., 2001). Enzym Ni:NOR má vyšší molekulární hmotnost než NR a patrně využívá cytochrom c jako donoru elektronů in vitro, podrobněji však dosud nebyl charakterizován (Wilson et al., 2008)

Enzymů a jiných látek schopných katalyzovat reakce jejichž výsledkem je NO je ještě více a patří sem například cytochrom P450 (Boucher et al., 1992), hemoglobin (Boucher et al., 1992). Produkce NO a citrulinu křenovou preoxidasou z N-hydroxy-argininu (NOHA) a peroxidu vodíku byla popsána už 1992 (Boucher et al., 1992). Stejná peroxidasa může generovat NO z hydroxyurey a peroxidu vodíku (Huang et al., 2002).

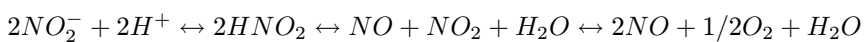
Hemové proteiny jsou dalšími dobrými kandidáty na funkci syntézy NO, zvláště cytochromy P450. Tyto proteiny se vyskytují jak v rostlinných tak živočišných buňkách a oxidují NOHA pomocí NADPH a  $O_2$  za vytvoření NO (Boucher et al., 1992;).

V rostlinách může být NO syntetizován v reakcích nezávislých na enzymové katalýze. Nitrifikační/denitrifikační cyklus poskytuje NO jako meziprodukt oxidace  $N_2O$  do atmosféry (Wojtaszek, 2000).

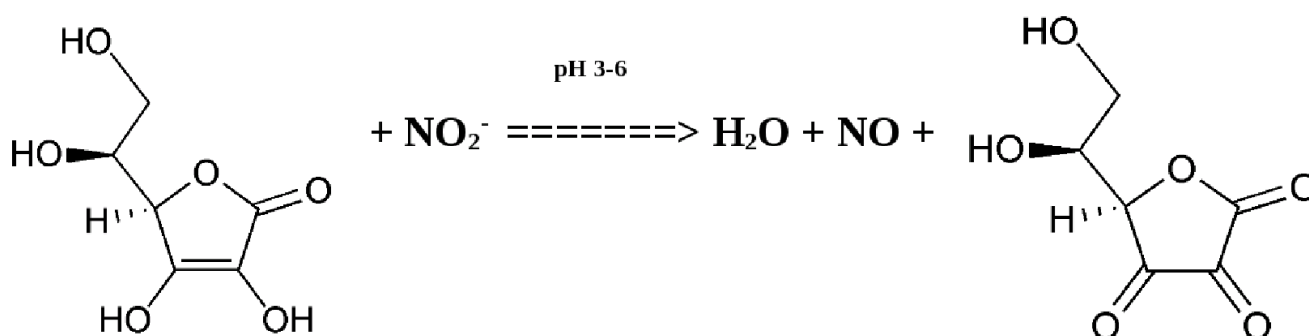


Obr. 4.2. Nitrifikační/denitrifikační cyklus (Morozkina, 2007)

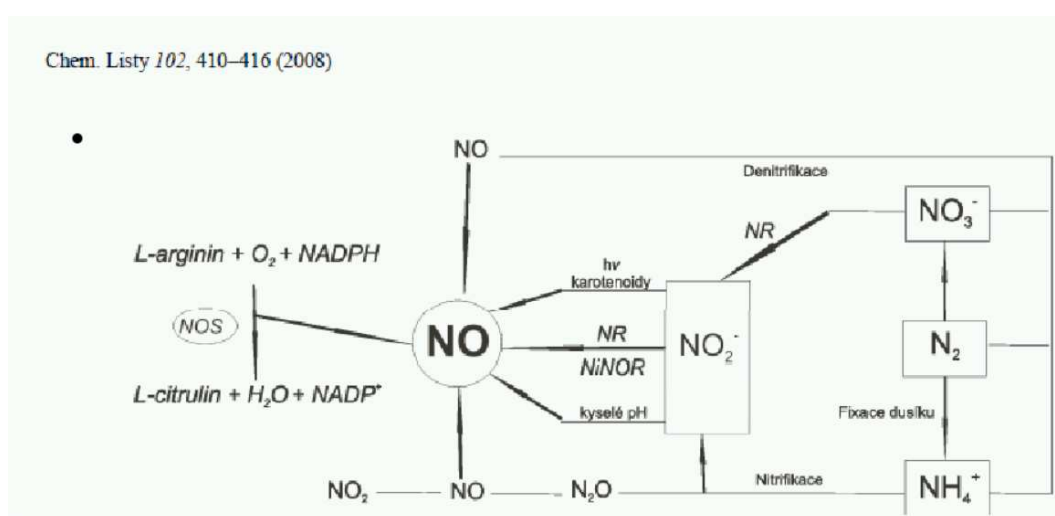
Byla popsána také neenzymatická redukce nitritu, která může vést k vytvoření NO. Tato reakce probíhá snáze za nízkého pH (Stohr a Ullrich, 2002).



Nitrit může být dále chemicky redukován kyselinou askorbovou při pH 3-6 za vzniku kyseliny dehydroaskorbové a NO (Henry et al., 1997). Tato reakce by mohla probíhat v mikroprostředí chloroplasů a apoplastu, kde se kyselina askorbová vyskytuje (Horemans et al., 2000).



V buňkách aleuronové vrstvy u ječmene byl objeven další způsob syntézy  $\text{NO}$  redukcí askorbátem ((Belgini et al., 2002). Byla též popsána světlem indukovaná redukce  $\text{NO}_2$  na  $\text{NO}$  pomocí karotenoidů (Cooney et al., 1994).  $\text{NO}$  může vzniknout i oxidací hydroxylaminu nebo salicylhydroxamatu (Rümer et al., 2009).



Obr. 4.3. Schéma zdrojů  $\text{NO}$  v rostlinných buňkách;  $\text{NR}$  (nitrát reduktasa),  $\text{NOS}$  ( $\text{NO}$  syntáza),  $\text{NiNOR}$  (nitrit  $\text{NO}$  Areduktasa) (Piterková 2008)

## 5. Účinky NO v nestresové fyziologii

Ukazuje se, že *NO* je důležitou molekulou, která figuruje v mnoha fyziologických a biochemických procesech rostlin. Zpočátku byl *NO* klasifikován jako fytohormon, ale protože se svým působením vymyká klasickému pojetí hormonu, začal se spíše používat výraz „netradiční regulátor růstu“ (*Beligni a Lamattina, 2001*). Aby molekula mohla být klasifikována jako hormon musí splňovat tři premisy, za první musí mít lokalizované místo biosyntézy, za druhé musí mít oddělené místo kde se syntetizuje a kde působí-na místo působení je hormon dopravován, za třetí rozsah působení hormonu je dán citlivostí cílové buňky. *NO* má schopnost regulovat širokou škálu fyziologických procesů, přičemž jeho účinek se zná být značně koncentračně závislý a neselektivní, není tedy úplně přesné charakterizovat ho jako hormon.

### 5.1. Působení NO na zavírání průduchů

*NO* hraje roli při procesu otevírání a zavírání stomat, ta byla poprvé popsána na družích *Vicia faba*, *Salpichora organifolia* a *Tradescantia spp.* (*Garcia-Matta a Lamattina, 2001*). Aplikace několika typů *NO* donorů indukuje zavírání průduchů v závislosti na dávkování a čase expozice. Tento efekt je možné neutralizovat přidáním PTIO, nebo cPTIO (*Bright, 2006*), což potvrzuje, že původce tohoto jevu je *NO*. Tento závěr byl potvrzen i pomocí dalších farmakologických či genetických přístupů, které různými způsoby inhibovaly endogenní syntézu *NO*, nebo ho přímo odstraňovaly z buňky (*Bright et al., 2006; Desikan et al., 2002*). Tyto výsledky ale poněkud podryla skutečnost, že detekce byla prováděna fluorescenčním barvením pomocí DAF-2DA, které jak se ukázalo může generovat artefakty, protože reaguje i s jinými sloučeninami vyskytujícími se v buňce (*Planchett a Kaiser, 2006*). Existují ale i výzkumy, které využily jiných metod detekce *NO* a předpokládanou roli *NO* v indukovaném zavírání průduchů potvrzují (*Neill et al., 2002*). Dále se zdá, že v tomto případě je *NO* generováno pomocí enzymu podobného savčí NOS, byly provedeny experimenty s látkami specificky inhibujícími její činnost (L-NAME), po přidání těchto látek efekt uzavření stomat vymizel (*Neill et al., 2002; Guo et al., 2003; Bright et al., 2006*). Podle dalších výsledků souvisí efekt *NO* na indukcii zavírání pórů i s peroxidem vodíku a kyselinou abscisovou (*Garcia-Mata a Lamattina, 2003; Garcia-Mata a Lamattina 2002; Desikan a Cheung 2004*). Při exogenní aplikaci *NO* je indukováno zavírání stomat procesem spojeným s  $Ca^{2+}$  (*Garcia-Mata a Lamattina, 2001*). V *Pisum sativum* a *Vicia faba* zvyšovala kyselina abscisová hladinu *NO* a předpokládá se souvislost s uzavíráním pórů.

Vyskytly se i důkazy zapojení nitrátreduktasy, zvláště pak u *Arabidopsis thaliana*, do tohoto procesu skrze produkci *NO* v „guard cells“ což způsobilo jejich zavírání (*Garcia-Mata a Lamattina, 2002; Neill et al., 2002; Bright et al., 2006*).

## 5.2. Působení NO během senescence

Senescence je geneticky regulovaný proces charakterizovaný poklesem fotosyntézy, rozpadem organelových struktur, intenzivní ztrátou chlorofylů a proteinů, vzrůstem peroxidace lipidů a poškozením integrity buněčných membrán. Byl opakovaně popsán vliv exogenního NO na zpomalení senescence (Arasimowicz et al., 2007; Leshem et al., 1996).

NO ovlivňuje biosyntézu etylénu, který je považován za pro-senescenční hormon. Aplikace exogenního NO inhibuje aktivitu ATP:metionin S-adenosyltransferasy, což vede k redukci zásobního poolu přímého prekursoru etylénu S-adenosylmethioninu (Arasimowicz a Floryszak-Wieczorek, 2007). Další možností působení NO protisenescenčně by mohla být inhibice peroxidace lipidů popsána v další kapitole.

Podle některých autorů má oxid dusnatý účinky, které senescenci zabraňují a aplikace exogenního NO na listy hrachu, u kterých byla indukována senescence, se projevilo sníženou koncentrací ethylénu. Díky inhibici jeho syntézy (Leshem a Wills, 1998; Leshem 2000; Leshem et al., 1996). na druhou stranu ale plyný NO indukoval produkci ethylénu v huseníčku rolním (Magalhaes et al., 2000). Byl pozorován pokles syntézy NO, korespondující se zvýšením ethylenu, během přechodu z „anthesis“ k senescenci.

U lístků rýže se ukázalo, že donory NO propůjčují rostlinám ochranu před kyselinou abscisovou indukovanou senescencí. Protektivní efekt byl ověřen přidáním PTIO, látky vyvazující NO, čímž se protektivní efekt ztratil (Hung a Kao, 2003).

## 5.3. Působení NO během růstu rostliny

Při experimentech s tímto aspektem působení NO se ukázalo, že velice záleží na jeho koncentraci. V rychle rostoucích semenáčcích hrachu, byl při aplikaci nízkých (mmol) dávek exogenní NO pozorován zvýšený růst lístků, zatímco vysoké koncentrace neměly žádný pozitivní efekt (Leshem a Haramathy, 1996).

Stejně tak vysoké koncentrace NO přidané k rostoucím rajčatům měly inhibiční účinek oproti nízkým koncentracím, které měly účinky stimulační. Podobné efekty byly sledovány i u salátu a hrachu (Hofton et al., 1996).

NO je schopen také aktivovat růst kořenů podobně jako kyselina indolactová (Gouvea et al., 1997).

## 5.4. Efekt NO na respiraci

Oxid dusnatý ovlivňuje funkčnost mitochondrií v buňkách rostlin a díky svému inhibičnímu efektu na funkci cytochromu snižuje celkovou respiraci buněk.

Při testování na buňkách soji, NO zamezilo příjem kyslíku mitochondriemi až do vyčerpání jeho zásob (v buňce) (Millar a Day, 1996).

NO může modulovat funkci enzymů účastnících se krebsova cyklu jako je například tabáková akonydasa, jejíž inaktivace vede ke značnému snížení energetického metabolismu buňky a v důsledku i průtoku elektronů mitochondriálním transportním řetězcem. Tato inhibice, ale zároveň snižuje tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), které přirozeně vznikají respirací (Navarre et al., 2000).

### 5.5. Vliv NO na aktivitu nitrát reduktázy

Nitrát reduktáza je jedním ze zdrojů vnitrobuněčné produkce NO zvláště v kořenech. Aplikace exogenního donoru NO (SNP) značně zvýšila aktivitu nitrát reduktasy i v listech testované kukuřice (Planchet et al., 2006). Stejný efekt však nebyl pozorován při aplikaci SNP na kořeny hrachu a pšenice (Kolbert et al., 2005).

### 5.6. Působení NO na dormanci semen

Dormance v přirozených podmínkách zajišťuje, aby klíčení semen v podmínkách, které by ho normálně umožňovaly.

Existuje řada exogenních sloučenin, které redukují dobu dormance nebo přímo indukují klíčení.

Mezi nimi jsou i sloučeniny dusíku včetně nitritů, nitrátů, hydroxylaminů a SNP. Právě účinek SNP na zkracování dormance semen salátu a huseníčku a ječmene (Belgini a Lamattina, 2000; Batak et al., 2002; Bethke et al., 2004; Bethke et al., 2006) vedl k domněnkám, že NO bude hrát roli i v procesu klíčení semen. U některých dalších rostlin byl dokonce objeven efekt stimulační, konkrétně u *Paulomia tomentosa* (Giba et al., 1998) za normálních podmínek a u *Suaeda salsa* během chloridem sodným indukovaným stresem.

Zdá se, že zásadní vliv má v tomto případě koncentrace, nízké koncentrace (0,05-0,5 mM) mají indukční účinek vyšší (1 mM) naopak klíčení inhibují.

### 5.7. NO a programovaná buněčná smrt

Výsledky experimentů týkajících se efektu NO na programovanou buněčnou smrt se různí. Nezávisle na reaktivních formách kyslíku se podařilo programovanou buněčnou smrt navodit u huseníčku (Clarke et al., 2000). Naproti tomu ani samotné zvýšení koncentrace NO nebo ROS nenavodilo buněčnou smrt u rostlin tabáku (Depinto et al., 2002), zatímco společné zvýšení koncentrací ano.



Interakce NO a reaktivních forem kyslíku byla zkoumána i v suspenzi buněk soji, s tím výsledkem že samostatné NO není schopné způsobit PCD ale důležitý je poměr ROS; NO (Delledone et al., 2001).

Další výzkum znovu ukazuje rozdílné výsledky - v *Taxus brevifolia* a *Calanchoe diagraphemontiana*, exogenní donor NO (SNP) způsobil prudký nárůst koncentrace buněčného NO a následně fragmentaci jaderné DNA a navození programované buněčné smrti.

Opět jiný výzkum, tentokrát na ječmeni, ukázal že exogenní donory NO naopak pozdrží PCD.

Že je efekt NO donorů čistě NO specifický bylo znovu ověřeno pomocí molekul vychytávající NO ze substrátu.

### 5.8. Antioxidační efekt NO

Jedním ze zajímavých aspektů biologie NO je fakt, že molekula vykazuje dvojí charakter. Je jak účinným oxidačním, tak významným antioxidačním činidlem (Beligni et al., 1999).

Tento dvojí charakter NO respektive, který zrovna převládne je zřejmě značně závislý na jeho koncentraci, stejně tak jako na charakteru prostředí.

Efekt NO jako ochranné látky je založen na udržení buněčné homeostáze redox potenciálů a redukcii toxicity ROS. Mezi hlavní způsoby jak konkrétně NO působí protektivně patří jeho reakce s lipidovými radikály, což zamezí dalšímu oxidativnímu poškození lipidů, dále vyvazování super oxidového radikálu za tvorby poněkud méně nebezpečného a pomocí askorbátu a glutathionu neutralizovatelného peroxinitritu ( $OO\text{NO}^-$ ) a konečně aktivací některých antioxidačních enzymů (SOD) (Frank et al., 2000).

### 5.9. NO a fotosyntéza

Vliv NO na tento důležitý fyziologický proces je zatím nedostatečně pochopen a z několika málo provedených experimentů byly publikovány značně kontroverzní výsledky (Taka Hashi et al., 2002; Yang et al., 2004).

NO je schopno cíleně reagovat s proteiny obsahujícími thiolovou skupinu, nebo kovový iont (Lamattina et al., 2003). Fotosyntetický aparát, stejně tak jako mitochondriální „dýchací“ komplex je postaven na komplexech obsahujících přechodné kovy (Lum et al., 2005).

Různé látky aplikované, jako exogenní zdroje NO sice nějakým způsobem regulují fotosyntézu, ale každý z nich poněkud jinak. Plynný NO se ukázal snižovat míru fotosyntézy v *Avena sativa* a *Medicago sativa* (Hill et al., 1970).

Donor exogenního NO, SNP, snižuje koncentraci enzymů regulujících fotosyntézu pšenice a *Pshaseobus vulgaris* (Tu et al., 2003; Lum et al., 2005). Schopnost NO přímo ovlivnit fotosyntézu tkví v přítomnosti několika vazebných míst na fotosystému II., zahrnující jedno nehemové železo, tyrosinový zbytek D2 proteinu a manganový klastr komplexu oxidujícího  $H_2O$  (Wodala et al., 2008; Sanakis et al., 1997; Schanscer, 2002).

Byl prokázán pozitivní vliv NO na obsah chlorofylu u bramboru, huseníčku a salátu, při aplikaci exogenního donoru (SNP) (Belgini a Lamattina, 2000).

Protektivní efekt na udržení chlorofylu by mohl souviset s vlivem NO na dostupnost železa. Podmínky s nedostatkem železa totiž normálně vyústí v „chlorosis“, ale ošetření testovaných rostlin kukuřice pomocí NO obsah chlorofylu zvýší na úroveň kontrolních rostlin (Graziano et al., 2002).

## 6. Účinky NO ve stresové fyziologii

Zatímco někteří autoři pokládali *NO* stále za faktor indukující stres, jiní publikovali výsledky dokazující, že má naopak ochranné účinky. Ty závisí na několika faktorech, mezi nimiž je koncentrace *NO*, konkrétní pletivo, na které je aplikován, věk rostliny, nebo typ stresu. Ve většině případů, pokud je *NO* přítomen v nízkých koncentracích, funguje jako aktivační prvek obranných mechanismů. Naopak vysoké koncentrace *NO* mohou způsobit poškození buněčných membrán a DNA (Pedroso et al., 2000; Yamasaki, 2000; Romero-Puertas et al., 2004), snižovat fotosyntézu (Hill a Bennett, 1970) a respiraci (Zottini et al., 2002).

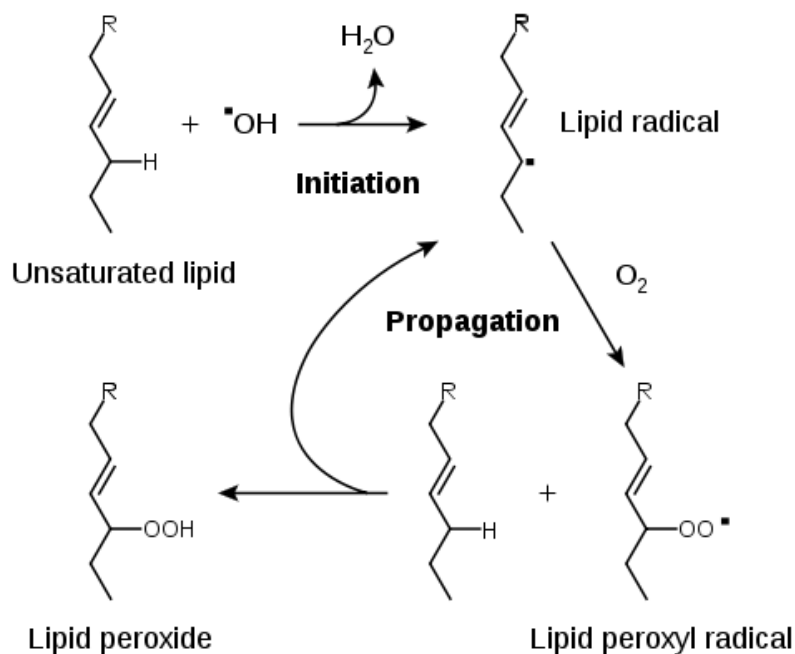
Už na začátku 90. let byly navrženo několik způsobů, jak aplikace exogenního *NO* může zmírňovat stres (Radi et al., 1991). Za prvé, *NO* může fungovat jako antioxidant a přímo reagovat s některými reaktivními formami kyslíku- například se superoxidovým aniontem  $O_2^-$ , za tvorby peroxynitritu (reakce v kapitole 5.8) (Lamattina et al., 2003). Peroxynitrit ( $ONOO^-$ ) je stále toxický, ale ve značně menší míře než superoxidový aniont, takže se touto reakcí omezí poškozování buněčných struktur.

Druhým navrženým způsobem je funkce *NO* jako signální molekuly v signální kaskádě vedoucí ke změně genové exprese (Lamattina et al., 2003).

Jak už bylo řečeno, *NO* v kombinaci s  $O_2^-$  tvoří peroxynitrit. Tvorba peroxynitritu pomocí *NO* zabraňuje reakcím vedoucím k vytvoření peroxidů, které by se mohly účastnit Fentonovy reakce, vedoucí ve svém důsledku k tvorbě hydroxylových ( $\cdot OH$ ) radikálů a oxidaci organických struktur. Rovnice popisující Fentonovu reakci (Halliwell a Gutteridge, 2007):



Navíc, jak už bylo zmíněno v předešlé kapitole, *NO* rychle reaguje s lipidovým alkoxyly ( $LO\cdot$ ) a peroxyly ( $LOO\cdot$ ) radikálem, čímž *NO* může také přímo zastavit radikálovou oxidaci lipidů.



Obr. 6.1. Schéma peroxidace lipidů (wikipedia)

Samotné stresové faktory lze potom dělit na biotické a abiotické. Nejdříve se budeme zajímat o abiotické.

### 6.1. Mechanismy indukované stresové tolerance

Široká škála stresových faktorů způsobuje rostlinám poškození. Buď přímo, nebo nepřímo skrze tvorbu reaktivních forem kyslíku, jako jsou například superoxid ( $\text{O}_2^-$ ), hydroxylový radikál ( $\text{OH}$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), nebo singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ) (Laspina et al., 2005; Farreria et al., 2010; Therond et al., 2000).

Aby se aerobní buňky vyhnuly poškození reaktivními formami kyslíku (ROS), disponují celou škálou enzymů a metabolitů schopných odbourávat ROS. Tyto procesy často probíhají přímo na místech, kde se reaktivní formy kyslíku vytvářejí, kvůli minimalizaci poškození (Shigeoka et al., 2002; Foyer et al., 2004; Mittler et al., 2004; De Pinto et al., 2006).

Jedním z nejzajímavějších aspektů biologie NO je jeho dvojitá funkce, jak účinný oxidant, tak efektivní antioxidant (Belgini a Lamattina, 1999). Zmíněná rozpolcenost účinků NO, a která z nich zrovna převažuje závisí s největší pravděpodobností na rozdílech v buněčné koncentraci NO, ostatních biochemických procesech, na stadiu vývoje rostliny, či na druhu (Ferrer et al., 1999; Clark et al., 2000; Zeier et al., 2004). Cytoprotektivní role NO je ve velké míře založena na jeho schopnosti udržovat buněčnou redoxní homeostázi a regulovat toxicitu ROS. Konkrétně v případě oxidativního stresu tkví protektivní funkce NO za prvé v reakci s lipidovými radikály,

což omezí nebo zastaví další oxidace tuků a za druhé reakce se superoxidovým aniontem za tvorby peroxynitritu ( $ONOO^-$ ). Tato reakce je jedním z nejrychlejších známých bochemických dějů. Ten je pro rostliny poněkud méně toxický, způsobuje sice poškození DNA, lipidů a proteinů ale lze ho dále neutralizovat za pomoci glutathionu a askorbátu (Neill *et al.*, 2003; Wendehenne *et al.*, 2001; Yamasaki *et al.*, 1999). Třetím způsobem je aktivace antioxidantních enzymů diskutovaných dále.

## 6.2. Neenzymatické cesty regulace a stresová tolerance v rostlinách pomocí NO

Jak bylo zmíněno výše v rostlinách existuje paleta neenzymatických molekul hrajících důležitou roli v opatřeních proti oxidativnímu poškození způsobeným stresem. Neenzymatické antioxidanty zahrnují askorbát, glutathion, tokofenoly, karotenoidy a flavonoidy (Noctor a Foyer, 1998; Tausz a Grill, 2000). Tyto látky ve spolupráci s enzymatickými antioxidanty působí během stresových podmínek na redoxní potenciál buňky a budou dále podrobněji diskutovány.

### 6.2.1. Glutathion (GSH)

Tripeptid glutathion plní ve vyšších rostlinách širokou škálu funkcí. Chemická reaktivita a vysoká rozpustnost ve vodě jeho thiolové skupiny ho činí vhodným pro mnoho biochemických funkcí při ochraně rostlin před oxidativním stresem (Hossain *et al.*, 2010). Tyto funkce zahrnují důležitou roli při udržování redox potenciálu a jeho účast na detoxifikaci xenobiotik a těžkých kovů. Krom toho funguje GSH jako signál zprostředkující kontrolu aktivity enzymů a regulačních proteinů buď přímo, a nebo skrze glutaredoxiny. GSH se podílí nejen na čištění  $H_2O_2$  pomocí AsA-GSH cyklu, ale i přímo reaguje s dalšími ROS (May *et al.*, 1998).

Hromadí se důkazy, ukazující na činnost NO při stimulaci syntézy GSH jako odpovědi na oxidativní stres (Moellering *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2004; Innocenti *et al.*, 2007).

GSH může hrát naopak významnou úlohu v regulaci bioaktivity NO, reaguje s ním za tvorby GSNO, které slouží jako rezervoár NO v buňce a v případě živočichů i jako vektor při působení na vzdálených místech (Zhao *et al.*, 2004).

Stimulace syntézy GSH pomocí NO by mohlo poskytnout důležitou regulační smyčku jeho bioaktivity.

### 6.2.2. Askorbát (AsA)

Askorbát je v rostlinných buňkách nejčastějším antioxidantem, stejně jako GSH přispívá k balancování redoxního potenciálu a chrání rostlinu před oxidativním poškozením způsobeným různými faktory (Smirnoff, 2000; Hossain *et al.*, 2010). Díky schopnost AsA fungovat jako donor

elektronů ve velkém počtu různých biochemických reakcí, předpokládá se, že v procesech detoxifikace ROS zaujímá hlavní úlohu. Je substrátem pro cytosolickou askorbátperoxidázu (cAPX) a její odvozené organelové isoformy, které figurují v cyklu AsA-GSH pro detoxifikaci peroxidu vodíku (Nakano *et al.*, 1981; Dalton *et al.*, 1986). AsA je schopna přímo potlačit singletový kyslík, superoxidový aniont a hydroxylový radikál, navíc regeneruje  $\alpha$ -tocopherol z  $\alpha$ -chromanoxylvého radikálu a tím chrání buněčné membrány. Zvýšení koncentrace endogenní AsA je v rostlinách potřebné kromě kompenzace oxidativního stresu i k regulaci jiných buňkových procesů (Smirnov, 2000).

### 6.3. Antioxidační enzymy a jejich interakce s NO

Krom výše probraných neenzymatických složek disponují rostliny i několika enzymy zajišťujícími homeostázi ROS ve všech kompartmentech buňky. Důkladný výzkum v této oblasti ukázal, že je nutná koordinace enzymatických a neenzymatických složek pro dosažení zásadní tolerance vůči oxidativnímu stresu v rostlinách.

#### 6.3.1. Superoxiddismutasa (SOD)

SOD katalyzuje dismutaci superoxidového iontu  $O_2^-$  na molekulární kyslík ( $O_2$ ) a peroxid vodíku ( $H_2O_2$ ). Tím plní roli klíčové složky obranného mechanismu rostlin proti toxicitě volných radikálů (Bowler *et al.*, 1992). Rostliny tolerantní vůči stresu vykazují vyšší aktivitu SOD v porovnání s rostlinami na stres sensitivními (Shalata *et al.*, 2001; Sekmen *et al.*, 2007). Ve své roli signální molekuly NO indukují a stabilizují genovou expresi SOD (Frank *et al.*, 2000). Bylo provedeno několik experimentů, v rámci kterých aplikace NO zvýšila aktivitu SOD při pěstování rostlin za stresujících podmínek, nebo zmírnila její inhibici. To může také znamenat, že NO nějakým způsobem podporuje přeměnu  $O_2^-$  na  $O_2$  a  $H_2O_2$  (HuaiFu *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2007).

Činnost superoxid dismutasy samotné ale není dostatečnou ochranou proti poškození radikály, jí produkovaný peroxid vodíku totiž reaguje s  $O_2^-$  a tvoří hydroxylové radikály. Předpokládá se, že právě ty jsou ve velké míře zodpovědné za kyslíkovou toxicitu v buňce. Jak bude diskutováno dál, objevilo se velké množství dat podporujících domněnku, že NO má pozitivní vliv i na další enzymy schopné peroxid vodíku degradovat.

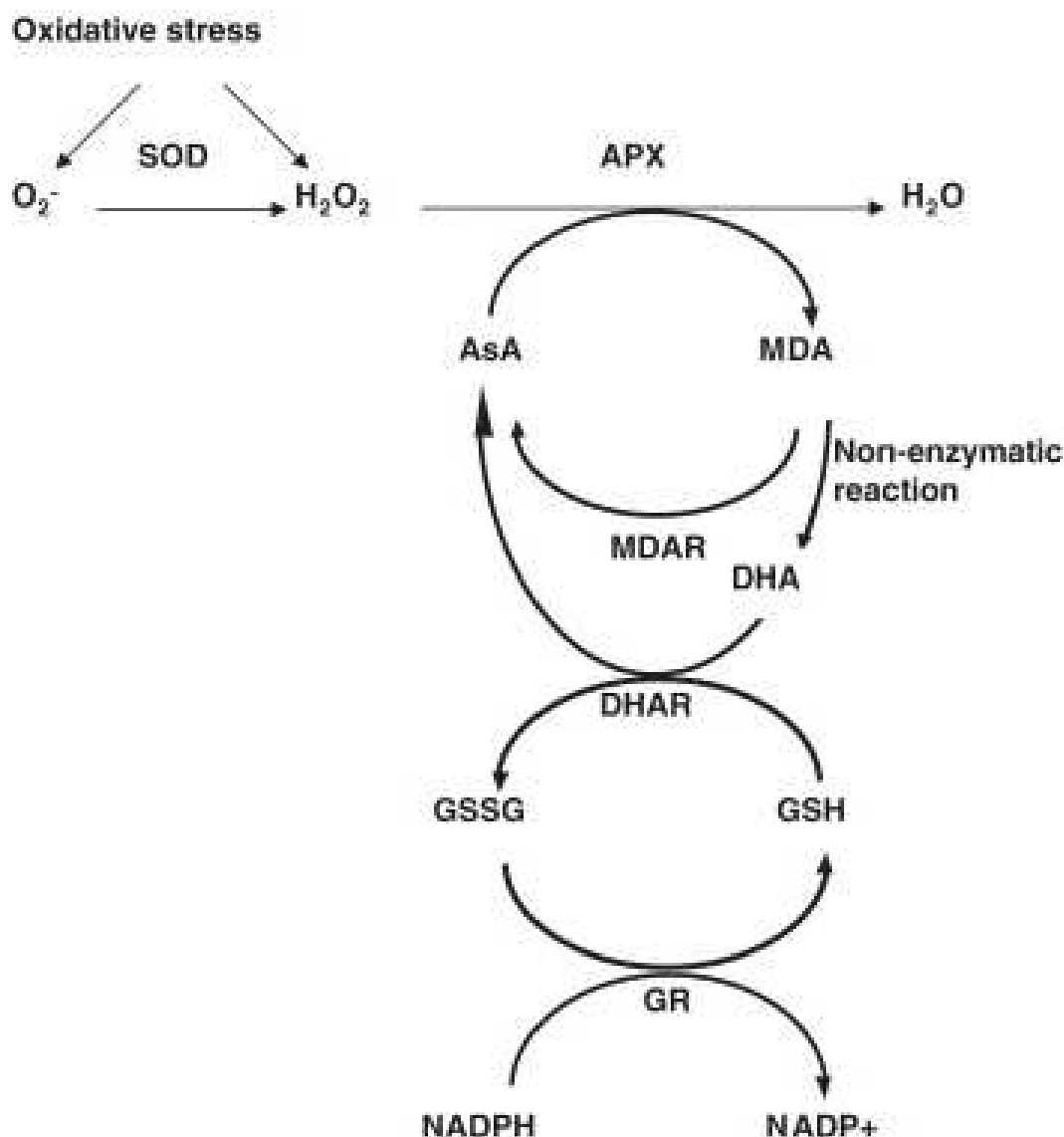
#### 6.3.2. Askorbátperoxidáza (APX)

Odstraňování peroxidu vodíku je prvním krokem AsA-GSH cyklu, ve kterém APX katalyzuje redukci  $H_2O_2$  na  $H_2O$ , přičemž AsA slouží jako donor elektronů (Zhang *et al.*, 2008; Asada, 1994). Krom detoxikace  $H_2O_2$  mají izozymy cAPX dynamickou úlohu v modulaci redox potenciálu a genové exprese ve oxidativního stresu tím, že modulují koncentraci  $H_2O_2$  na hladinu potřebnou

pro aktivitu druhých posílů. NO by mohlo v tomto systému figurovat jako reagulátor aktivity APX a jiných enzymů s hemovou doménou, nebo akonitasy bez hemové domény (Wang et al., 2004).

Zároveň se ale zdá, že stimulační efekt NO na APX je značně koncentračně závislý a vysoké koncentrace APX naopak inhibují (Zanardo et al., 2005; Ferrer a Barcelo, 1999).

NO, generovaný v rostlinách huseníčku zabraňuje akumulaci APX transkriptů v thylakoidech. Rostliny se sníženou expresí APX mají potom sníženou rezistenci k NO indukované buněčné smrti a indukovanému oxidativnímu stresu (Murgia et al., 2004; Tarantino et al., 2005).



Obr. 6.2. Schéma AsA-GSH cyklu (Ushimaru et al., 2005)

### 6.3.3. Monodehydroaskorbátreduktasa (MDHAR)

Činnost MDHAR v buňce zajišťuje regeneraci AsA z monodehydroaskorbátu (Hossain et al.,

2010). Jediný náznak participace NO na regulaci toho to mechanismu je pokus na okvětních lístcích orchideje rodu *Phanaelopsis* (Tewari et al., 2009), kdy exogenní aplikace NO výrazně zvýšila aktivitu MDHAR.

#### 6.3.4. Glutathionreduktasa (GR)

Tento enzym zajišťuje udržení hladiny redukováného GSH a AsA, které jsou, jak bylo zmíněno výše významné při udržování redoxní rovnováhy buňky ve stresujících podmínkách. Rostliny tolerantní vůči stresu mají tendenci vykazovat vysokou aktivitu GR (Mittova et al., 2003; Sekmen et al., 2007). Podle očekávání ukázaly experimenty, že zvýšení exprese GR vede k větší stresové toleranci rostliny, snížení vede ke stresové senzitivě (Potters et al., 2004; Noctor et al., 1998).

Exogenní aplikace NO v několika studiích znamenala zvýšení aktivity GR, po aplikaci PTIO se účinek ztratil. (Shi et al., 2007; Xu et al., 2010). Objevily se ale i výsledky, kde aplikace NO neměla žádný vliv na aktivitu tohoto enzymu (Laspina et al., 2005).

#### 6.3.5. Dehydroaskorbátreduktasa (DHAR)

DHAR je součástí AsA-GSH cyklu vyšších rostlin, kde katalyzuje potřebnou redukci dehydroaskorbátu, který by jinak prodělal nereversibilní hydrolýzu na 2,3-diketo-1-gulovou kyselinu. DHAR umožní rostlině DHA recyklovat a tím zabránit ztrátám AsA (Hossain et al., 2010).

Silný důkaz pro synergistický efekt NO na aktivitu DHAR přinesly experimenty Fe deficientního čínské zeli, kde došlo k dramatickému nárůstu aktivity DHAR po aplikaci NO (Ding et al., 2008).

Podobný výsledek byl zaznamenán i v kořenech okurky vystavené salinnímu stresu (Shi et al., 2007). Oproti tomu se staví experimenty které žádné zvýšení aktivity nezaznamenaly (Sheokand et al., 2008).

#### 6.3.6. GlutathionS-transferasa (GST)

Glutathion S-transferasy jsou rodinou multifunkčních enzymů vyskytujících se jak v rostlinných tak v živočišných systémech. Jsou to dimerické enzymy katalyzující conjugaci GSH a rozličných elektrofilních, hydrofobních a mnohdy toxických sloučenin za současného snížení jejich nebezpečnosti pro buňku. GST poskytují mnoha druhům rostlin toleranci vůči abiotickým stresorům indukujícím tvorbu ROS (Hossain et al., 2002; Hossain et al., 2010).

GST katalyzuje i reakci, při které vzniká z NO a glutathionu GSNO diskutovaný výše.



### 6.3.7. Katalasa (CAT)

Katalasa je klíčovým antioxidačním enzymem lokalizovaným pouze v peroxisomech, její činností je rozkládán peroxid vodíku. Vliv NO na aktivitu tohoto enzymu byl celkem často studován a zdá se, že je schopen výrazně zvýšit účinnost antioxidačních mechanismů právě stimulací CAT, jak se podařilo naměřit v případě osmoticky stresovaných semen pšenice (Zang et al., 2003). I další experimenty potvrzují tento výsledek, tak byla zvýšená aktivita detekována ve stárnoucích listech pšenice (Tu et al., 2003). Exogenní aplikace NO se ukázaly mít podobné účinky (Zheng et al., 2009).

### 6.3.8. Glutathionperoxidasa (GPX)

Spolu s APX a CAT, GPX je dalším významným rostlinným enzymem, jehož substrátem je peroxid vodíku (Asada, 1994). Podobně jako u dalších enzymů experimenty s NO ukázaly jeho vliv na zvýšení aktivity GPX, například u pšeničných semenáčků (Hossain et al., 2010). Existují data, která naznačují, že v případě solí stresovaných rostlin může dojít k nárůstu aktivity až po nějaké době (Shi et al., 2007).

## 6.4. Salinita

Salinita je jedním z nejdůležitějších stresových faktorů, limitujících růst a vývoj rostlin. Její negativní vliv tkví v tom, že mění morfologické, fyziologické a biochemické atributy. V případě vysoké salinity v mezibuňčných prostorách se buňky snaží o vyrovnání iontových poměrů transportováním Na iontů do média, nebo ho internalizují ve vakuolách, zatímco udržují tok iontů K do buňky. Cílem je stav s vyšší koncentrací K v cytosolu než Na. Ovlivňuje aktivity enzymů aktivních v drahách asimilace sulfátu a nitrátu a vytváří jejich nedostatek (Siddiqui et al., 2009). Bylo prokázáno, že aktivita membránové  $H^+$ -ATPasy je klíčová k adaptaci rostlin na stres způsobený salinitou (Hasanuzzaman et al., 2009).

Ochranná role, kterou hraje NO v případě stresových situací způsobených salinitou je poměrně dobře prozkoumaná. Na kukuřici, vystavené tomuto typu stresu a působení NO, byla pozorována zvýšená akumulace  $K^+$  v kořenech, listech a listových pochvách a zároveň snížený příjem  $Na^+$  (Zhao et al., 2004). Pokud je rostlina vystavena působení exogenního NO v době stresu, zvýší se aktivita  $H^+$ -ATPasy a  $Na^+/H^+$  antiporteru v tonoplastu a tím rostlina dosáhne vyšší tolerance.

Podobný experiment na kalusech topolu odhalil stejnou tendenci zvyšování poměru  $K^+/Na^+$ . Proces byl zprostředkován peroxidem vodíku a závisel na aktivitě  $H^+$ -ATPasy (Zhang et al., 2007).

Dalším experimentem bylo ošetření rýžových semen předem, pomocí NO donoru (SNP). Takto upravená semena, pěstovaná ve stresovém prostředí, vykazovala větší rezistenci a dala vznik kvalitnějším rostlinám (Uchida et al., 2002).

## 6.5. Sucho

Z hospodářského hlediska je sucho pravděpodobně nejvýznamnější stresový faktor, který způsobuje významné ztráty při pěstování hospodářských plodin téměř na celém světě a ohrožuje dostupnost potravin.

Bylo prokázáno, že exogenní aplikace NO pomocí SNP snížila ztráty vody v samotných listech a semenech pšenice vystavených suchu díky zvýšení aktivity SOD a CAT. Snížila se i ztráta iontů a míra transpirace díky uzavírání stomat. V případě přidání cPTIO, který vyvazuje NO, se rezistence ztratila (Garcia-Matta a Lamattina, 2001). Další pokusy potvrdily, že exogenní aplikace NO zmírňuje cytotoxicitu způsobovanou reaktivními formami kyslíku, například u listů brambor (Beligni a Lamattina, 1999).

Pšenice vystavená suchu vykazala vyšší syntézu NO, které spolu s  $H_2O_2$  participuje na regulaci kyselinou abscisovou indukovaném zavírání stomat (Neill et al., 2008).

Zdá se, že obsah endogenního NO je závislý na délce a míře dehydratace. Experiment na kořenech okurky ukázal, že v případě mírného stresu suchem (5-7 hodin) byl zaznamenán jistý nárůst syntézy NO ve špičkách kořenů a v elongačních zónách. V případě těžké dehydratace (17 hodin) byl nárůst signifikantně větší (Arasimowicz-Jelonek et al., 2009).

## 6.6. Extrémní teploty

Teplota, ať už příliš vysoká, nebo příliš nízká má negativní vliv na růst a vývoj rostlin. Každý druh rostlin má své vlastní teplotní optimum. Výsledky výzkumů naznačují, že i odpověď na teplotní extrémy u rostlin souvisí s činností NO.

### 6.6.1. Vysoká teplota

Zvýšení teploty v suspenzi tabákových buněk mělo také okamžitý efekt ve formě zvýšené syntézy NO (Gould et al., 2003). Ukazuje se, že syntéza NO během extrémních teplot negativně koreluje se syntézou ethylenu, preventivní ošetření NO zabraňuje poškozování fotosystému II, zesiluje aktivitu enzymů zabráňujících oxidativnímu poškození a indukuje genovou expresi proteinů souvisejících se stresovou odpovědí (malý „heat shock“ protein a sucrosa-fosfátsyntesa) (Uchida et al., 2002).

### 6.6.2. Nízká teplota

Experimenty s exogenní aplikací NO při nízkých teplotách ukázaly zvýšení rezistence u kukuřice, rajčete a pšenice (Neill et al., 2003). Stejně tak aklimace - to je zlepšení odpovědi v chladu

indukuje vyšší míru endogenní syntézy NO u huseníčku rolního. Tato endogenní syntéza NO je katalyzována převážně NR, zatímco aktivita enzymů podobných NOS je tlumena..

Ukázalo se, že aklimatizace pozitivně ovlivňuje genovou expresi P5CS1 (1-pyrrolin-5-

karboxylát syntetasa) a negativně ProDH (prolin dehydrogenasa), což v důsledku vedlo k akumulaci prolinu v rostlinách (Zhao *et al.*, 2009)

### 6.7. UV B záření a $O_3$

V posledních letech dochází díky ztenčení ozonové ochranné vrstvy v atmosféře ke zvyšování dávek UV B (280-320nm) záření dopadajícího na zemský povrch. Jako ostatní stresující faktory, i UV B záření ve svém důsledku v živých organismech vede k zvýšené koncentraci ROS.

Vystavení rostliny UV B záření zvyšuje produkci NO cestou typově podobnou NOS u zvířat. Zvýšená koncentrace NO potom rostlinu chrání proti vznikajícím ROS pravděpodobně znovu zvyšováním aktivity antioxidantních enzymů.

Bylo zjištěno, že exogenní NO zmírní i poškozování membrán tylakoidů a úbytek chlorofylu normálně asociovaný s UV B zářením. Zdá se, že NO účastní se zavírání stomat indukované UV B zářením a zprostředkované ještě za spolupráce  $H_2O_2$ , je generováno NOS-podobnou aktivitou (Ruan *et al.*, 2004).

Jiní autoři ale přišli s výsledky naznačujícími naopak NR aktivitu (Shi *et al.*, 2005).

Preventivní ošetření rostlin pomocí NO se zvýšilo úroveň produkce ethylenu indukované  $O_3$  a poškozování listů. (Rao Davis, 2001). V rostlinách tabáku vydezinfikovaných  $O_3$  docházelo k akumulaci peroxidu vodíku v mitochondriích a časně akumulaci NO a ethlenu v pletivech listů (He *et al.*, 2005).

Zajímavé je zjištění, že při ošetření listů *Vicia faba* SNP, jako donorem NO došlo nejen k zmírnění efektů UV B záření, ale také ke zvýšení teoretického a efektivního kvantového výtěžku energie z fotosystému II, pravděpodobně díky snížení oxidativního poškození a tedy omezení nutnosti resyntézy poškozených proteinů (Shi *et al.*, 2005).

### 6.8. Biotický stres

Zdá se, že NO je zapojeno do obrany rostlin proti biotickému stresu díky své schopnosti regulovat několik korespondujících procesů. Jsou to hypersensitivní odpověď (HR), možné baktericidní účinky peroxynitritu, získaná systémová odolnost (SAR) a schopnost tvořit nitrosoglutathion (GSNO).

V případě HR je indukována hypersensitivní buňečná smrt a NO pravděpodobně hraje klíčovou regulační roli, vedle akumulace ROS a kyseliny salicylové (SA) (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1999). Experimenty ukázaly, že ošetření pomocí donorů NO iniciovalo kondensaci chromatinu a fragmentaci DNA (Clarke et al., 2000; Pedroso et al., 2000). Ukázalo se, že je možná inhibice takto nastartované dráhy vedoucí k buňečné smrti pomocí živočišného inhibitoru kaspázy-1 (Clarke et al., 2000). Přes tyto výsledky nebyly zatím v rostlinách kaspasy podobného typu jako jsou v živočišných buňkách nalezeny, několik studií poze detekovalo kaspázovou aktivitu a byly objeveny funkční homology těchto enzymů (Hatsugai et al., 2004; Bozhkov et al., 2005).

Spolu se zvýšenou syntézou NO se v některých studiích zvyšuje koncentrace  $H_2O_2$  a společně tyto dva faktory aktivují PCD, zatímco pokud je přítomen pouze jeden z této dvojice faktorů, PCD je indukována jen mírně (Delledonne et al., 1998; de Pinto et al., 2002).

Stále není úplně jasné, zda je samotný NO používán jako baktericidní látka a zda je vůbec bakteriím toxický (Garcia-Olmedo et al., 2001), objevilo se ale několik experimentů naznačujících, že by se na baktericidní odpovědi mohl účastnit až peroxynitrit vznikající z NO a superoxidového aniontu (Durner et al., 1999; Romero-Puertas et al., 2004).

Jak bylo výše zmíněno, NO může participovat v začátečních fázích SAR. Ukázalo se, že v listech tabáku je exogenní NO schopno indukovat tvorbu SA, která hraje klíčovou úlohu v SAR (Durner et al., 1998). Zdá se, že NO účastní se na tomto typu regulací je endogenně produkováno enzymy podobnými NOS, protože aplikace inhibitorů zvířecích NOS omezila SAR, stejně tak došlo k omezení odpovědi pokud byly přítomny molekuly vycytávající NO. SAR se podařilo indukovat i pomocí aplikace GSNO (Song et al., 2001).

Role GSNO v abiotickém stresu je jednak, stejně jako v případě zvířat transport NO. Předpokládá se, že GSNO je jak intracelulárním tak extracelulárním přenašečem a v rostlinách postupuje floémem (Durner et al., 1999). Enzymy související s produkcí GSNO a jeho odbouráním, GS-FDH a GSNOR by mohly regulovat zapínání a vypínání NO, nebo GSNO signalizace a modulace koncentrace intracelulárních thiolů zodpovědných za nitrosativní stres (Sakamoto et al., 2002; Liu et al., 2001).

## 7. Účinky NO na stresovou fyziologii těžkých kovů

Pod pojmem „těžké kovy“ (HM) se v korespondující literatuře skrývá poměrně široká škála kovů a polokovů a přesto, že termín těžký kov správně znamená skupinu kovů s hustotou větší, než  $5 \text{ g.cm}^{-3}$  a relativní atomovou hmotností přes 20, je mezi autory už zažit a pravděpodobně se v nejbližší době měnit nebude. Společnou vlastností prvků shrnutých pod název těžké kovy je jen to, že mají tendenci reagovat s biologickými ligandy, což v některých případech není žádoucí a tím se stávají pro živé systémy toxickými. Blokují aktivní místa proteinů, nahrazují, nebo vytlačují důležité komponenty, inaktivují enzymy, nebo narušují buněčné a organelové membrány.

Fytotoxické koncentrace těžkých kovů se zřídka nacházejí i v přírodních půdách, většinou jsou ale kontaminace dílem původně lidského znečištění. Obrovská nebezpečnost těchto kontaminací tkví v tom, že ji lze jen velmi obtížně eliminovat. Těžké kovy zachycené z půdy do těl rostlin putují vzhůru po potravním řetězci až k člověku a způsobují závažná poškození. Po smrti jedince, kde se nahromadily nad únosnou míru se těžké kovy vrací zpět do půdy v původní podobě a cyklus začíná znovu. Jen v Evropě činí kontaminované půdy několik milionů hektarů zemědělské půdy (Flathman a Lanza, 1998).

Některé kovy spadající do této kategorie jsou esenciálními prvky potřebnými k životu rostlin i živočichů (*Mn*, *Fe*, *Cu*, *Zn*, *Mo*, *Ni*), tyto jsou toxické ve zvýšených koncentracích. Nejvíce rizikové jsou potom polokov arsen (*As*), a dále kovy - rtuť (*Hg*), olovo (*Pb*) a kadmium (*Cd*) (McLaughlin et al., 1999). Schopnost těchto prvků účastnit se obdobných reakcí a působit na stejných místech mnohdy s vyšší afinitou je principem jejich toxicity.

V rostlinách existují mechanismy, které negativní efekty těžkých kovů částečně tlumí, závisí na konkrétním pletivu, druhu rostliny, konkrétním polutantu a jeho koncentraci. Některé z těchto mechanismů pravděpodobně souvisí s činností NO.

### 7.1. Efekty stresu HM na hladinu endogenního NO

Publikovaná data naznačují, že vztah mezi toxicitou způsobenou těžkými kovy a koncentrací endogenního NO existuje, ale konkrétní mechanismus působení lze jen odvozovat. Výsledky výzkumů tohoto fenoménu jsou navíc značně kontroverzní v dopadu toxicity těžkých kovů na akumulaci NO.

Velká část experimentů používá jako toxický těžký kov *Cd*, aplikace na suspenze buněk *Glycine max* a *Arabidopsis thaliana* po dobu 72 hodin vyústila v zvýšení koncentrace endogenního NO (Kopyra et al., 2006). Aplikace *Cd* na kořeny *Medicago truncatula* po dobu 48 hodin, *Pisum sativum* po dobu 14 dnů a *Oryza sativa* po dobu 24 hodin, způsobila pokles endogenní koncentrace NO (Xiong et al., 2009; Xiong et al., 2008; Rodríguez-Serrano et al., 2006; Wang et al., 2010).

Z dalších těžkých kovů stojí za zmínku hliník (Al), který se zdá endogenní koncentraci NO jen snižovat, aplikace Al na kořeny *Arabidopsis thaliana* po dobu 60 minut a na kořeny *Hibiscus moscheutos* koncentraci snížila (Tian et al., 2007; Illěš et al., 2006).

## 7.2. Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s ROS

Stejně tak jako většina ostatních stresových faktorů působících na rostliny, i toxicita těžkých kovů je alespoň částečně způsobena indukcí tvorby ROS (Laspina et al., 2005). Úloha NO v jejich metabolismu je podrobněji popsána v kapitole 5.8.

## 7.3. Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s komponenty buněčné stěny

NO by mohlo ovlivnit míru akumulace těžkých kovů v buněčných stěnách, což se ukázalo být jedním z přirozených obranných mechanismů rostlin. Jevy související s touto cestou zahrnují aktivní transport toxických kovů z buňky do mezibuněčných prostor, navazování do buněčné stěny, nebo kompartmentaci ve vakuolách (Wang et al., 2008). Hlavním trendem v této oblasti se zdá být co největší snížení akumulace v nadzemních částech rostliny (He et al., 2008), kovy se v buněčných stěnách většinou vážou na polygalakturonové kyseliny, které jsou v bohaté míře zastoupeny pektinech a hemicelulóze, tvořící majoritní část buněčných stěn rostlin. Afinita jednotlivých těžkých kovů k těmto kyselinám se různí, ale ukazuje se, že NO ovlivňuje zastoupení celulózy v buněčných stěnách rajčete a to v závislosti na koncentraci (Taylor et al., 2008; Correa-Aragunde et al., 2008)

## 7.4. Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s regulací genové exprese

NO by mohl fungovat jako signální molekula v kaskádové reakci ovlivňující změny exprese během stresu, v jiných případech působení stresových faktorů je úloha NO v tomto mechanismu poněkud jasnější, ale v případě těžkých kovů není znám žádný konkrétní regulovaný gen (Grün et al., 2006).

## 7.5. Efekt NO na zmírnění poškození způsobeném HM související s chelačními proteiny

Chelační proteiny, proteiny schopné svým aktivním místem koordinačně vázat některé prvky, byly detekovány u mnoha druhů rostlin. Hlavní skupinou těchto proteinů jsou fytochelatiny (PC), proteiny bohaté na cystein. Syntéza PC probíhá transpeptidační reakcí z GSH a je katalyzována fytochelatinsyntasou (PCS). PC byly poprvé izolovány v suspenzních kulturách

po vystavení Cd stresu (*Grill et al., 1985*). Bylo prokázáno, že PC se indukovaně vyskytnou v rostlinných buňkách i při stresování jinými těžkými kovy *Hg, Cu, Zn, Pb* aj. (*Zenk, 1996*), a byly izolovány a klonovány sekvence PCS z několika druhů rostlin, včetně *Arabidopsis thaliana*, rýže, pšenice a hořčice (*Clemens et al., 1999; Vatamaniuk et al., 1999*).

## 8. Závěr

Tato práce, shrnuje výsledky dosavadního výzkumu v oblasti fyziologie *NO* v rostlinách s důrazem na stresovou fyziologii. Představuje známé mechanismy funkce *NO* v stresové i nestresové fyziologii a shrnuje některé výsledky výzkumů v této oblasti v tématicky orientovaných celcích. V souvisejících tématech se dotýká i prací živočišných fyziologů, včetně lidských a zahrnuje i nutné biochemické pozadí probíraných dějů pokud je známo.

Jak je zřejmé výzkum v této oblasti ještě neprobíhá tak dlouho, jako v jiných případech a proto existují značné nedostatky, zvláště v charakterizaci molekulárních mechanismů působení *NO*, provázanosti jednotlivých ovlivňovaných dějů, která se je mnohdy tak říkájíc na očích a přesto zatím neuchopitelná. Existují vážné mezery v datech týkajících se syntézy pomocí NOS, enzym, který má pravděpodobně největší podíl na syntéze *NO* nebyl dosud v rostlinných systémech izolován a charakterizován ani jako protein, ani jako sekvence DNA.

Na výše zmíněné nedostatky je směřována značná část zdrojů v tomto oboru, zároveň ale ještě není znám úplný rozsah procesů, které *NO* ovlivňuje a zdá se, že těmto se věnuje stále majoritní část vědeckých pracovníků působících v tomto oboru.

Možných budoucích témat pro diplomovou práci se nabízí spousta, pro mě jsou zajímavé zejména oblasti *NO* interakce s antioxidantními enzymy.



## 9. Seznam literatury

- Arnold W. P., Ch. K. Mittal, S. Katsuki, F. Murad, 1977: Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3:5 cyclic monophosphate levels in various tissue preparations; PNAS 74: 3203-3207
- Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Kubis J., 2009: Interaction Between Polyamine and Nitric Oxide Signaling in Adaptive Responses to Drought in Cucumber. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28: 177-186
- Arasimowicz, M., Floryszak-Wieczorek, J., 2007: Nitric oxide as bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.*, 172: 876-887 Asada K., 1994: Production and action of active oxygen species in photosynthetic tissues. In: Foyer C.H., Mullineaux P.M. (eds.): *Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants*. CRC Press, Boca Raton, FL., 77-104
- Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Quiros, M., Leon, A.M., Romero-Puertas M.C., Esteban F.J., Valderrama R., Palma J.M., Sandalio L.M., Gomez M., del Rio L.A., 2004: Cellular and Subcellular Localization of Endogenous Nitric Oxide in Young and Senescent Pea Plants. *Plant physiology*, 136: 2722-2733.
- Batak I., Devica M., Gibala Z., Grubišica D., Poffa K.L., Konjevic R., 2002: The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research*, 12: 53-259
- Beligni M.V., Fath A., Bethke P.C., Lamattina L., Jones R.L., 2002: Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 129: 1642-1650
- Beligni M.V., Lamattina L., 1999: Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Sciences* 4: 299
- Beligni M.V., Lamattina L., 2000: Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221
- Beligni M.V., Lamattina L., 1999: Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* 208: 337-344
- Beligni M.V., Lamattina L., 1999a: Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell. Environ.* 24: 267-278
- Beligni M.V., Lamattina L., 1999b: Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide* 3: 199-208
- Bethke P.C., Libourel I.G.L., Jones R.L., 2006: Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 57, 517-526
- Bethke P.C., Badger M.R., Jones R.L., 2004: Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *The Plant Cell*, 16: 332-341
- Boucher J.L., Genet A., Vadon S., Delaforge M., Henry Y., Mansuy D., 1992: Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N omega-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and citrulline. *Biochem Biophys Res Commun.*
- Bowler C., Montagu M.V., Inze D., 1992: Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116
- Bozhkov P.V., Suarez M.F., Filonova L.H., Daniel G., Zamyatnin A.A., Rodriguez-Nieto S., Zhivotovsky B., Semertenko A., 2005: Cysteine protease mcl-1 executes programmed cell death during plant embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 14463-14468
- Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S., Neill S.J., 2006: ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *The Plant Journal*, 45: 113-122 Bright J.,

- 2006: Nitric oxide signalling in *Arabidopsis thaliana* guard cells. PhD thesis. Bristol, UK: University of the West of England
- Butt Y.K.C., Lum J.H.K., Lo D.C.L., 2003: Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. *Planta* 216:762-71
- Clarke D., Durner J., Navarre D.A., Klessiget D.F., 2000: Nitric Oxide Inhibition of Tobacco Catalase and Ascorbate Peroxidase. *Mol. Plant. Microbe Interact*, 13: 1380-1384
- Clemens S., Kim E.J., Neumann D., Schroeder J.I., 1999: Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. *EMBO J* 18:3325-3333
- Cooney R.V., Harwood P.J., Custer L.J., Franke A.A., 1994: Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environ Health Perspect*, 102: 460-462
- Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A., Valderrama R., Palma J.M., Len A.M., Sandalio L.M., del Ro, L.A., 2006: Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 224
- Corpas F.J., Barroso J.B., del Rio L.A., 2001: Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends Plant Sci* 6: 145-150
- Crawford N.M., 2006: Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 57, 471-478
- Dalton D.A., Russell S.A., Hanus F.J., Pascoe G.A., Evans H.J., 1986: Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 83: 3811-3815
- de Pinto M.C., Paradiso A., Leonetti P., De Gara L., 2006: Hydrogen peroxide, nitric oxide and cytosolic ascorbate peroxidase at the crossroad between defence and cell death; *Plant J.* 48: 784-95
- de Pinto M.C., Tommasi 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 Physiol*, 130: 698-708
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C., 1998: Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance; *Nature* 394:585-588
- 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*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 99: 16314-16338
- Ding F., Shi Q., Wang X., Wei M., 2008: Exogenous nitric oxide alleviated the inhibition of photosynthesis and antioxidant enzyme activities in iron-deficient chinese cabbage (*Brassica chinensis* L.). *Agric.Sci. China*, 7: 186-179
- Durner J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. 1998: Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*,
- Durner J., Klessig D.F., 1999: Nitric oxide as a signal in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2: 369-374
- Ferrer M.A., Barcelo A.R., 1999: Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ.*, 22: 891-897
- Foyer C. H. 2004: The role in ascorbic acid in defence networks and signalling in plants. In: Asard, H., May, J., Smirnoff, N., (eds.): *Vitamin C: its Function and Biochemistry in Animals and Plants*. BIOS Scientific, Oxford, 65-82.

- Frank S., Kämpfer H., Podda M., Kaufmann R., Pfeilschifter J., 2000: Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. *Biochem J.* 15: 719-28
- Furchgott R.F., Zawadsk, J.V., 1980: The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine; *Nature*, 27: 373-6
- Garces H., Durzan D., Pedroso M.C., 2001: Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Bot.*, 87: 567-574
- García-Mata, C., Lamattina, L., 2001: Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol.* 126: 1196-1204
- García-Mata, C., Lamattina, L., 2002: Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128: 790-792
- García-Olmedo F., Rodríguez-Palenzuela P., Molina A., Alamillo J.M., López-Solanilla E., Berrocal-Lobo M., Poza-Carrion C., 2001: Antibiotic activities of peptides, hydrogen peroxide and peroxynitrite in plant defense. *FEBS Lett.*, 498:219-222
- Giba Z., Grubisic D., Todorovic S., Sajc L., 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
- Gouvea C.M.C.P., Souza J.F., Magalhaes A.C.N., Martins I.S., 1997: NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21: 183-187
- Graziano M., Beligni M.V., Lamattina L., 2002: Nitric oxide improves iron availability in plants. *Plant Physiology* 130: 1852-1859
- Greenwood N.N. a Ernshaw A., 1993: *Chemistry of the elements*. Pergamon press, Oxford UK
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H., 1985: Phytochelatin: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230: 674-676
- Guo F.Q., Okamoto M., Crawford N.M., 2003: Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100-103
- Halliwell B., Gutteridge J., 2007: *Free Radicals in biology and medicine*. Third edition, 888
- Hancock J.T., Salisbury V., Ovejero-Boglione M.C., Cherry R., Hoare C., Eisenthal R., Harrison R., 2002: Antimicrobial properties of milk: dependence on the presence of xanthine oxidase and nitrite. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3308-3310
- Hasanuzzaman M., Fujits M., Islam M.N., Ahamed K.U., Nahar K., 2009: Performance of four irrigated rice varieties under different levels of salinity stress. *Int. J. Integrative Biol.*, 6: 85-90
- Hatsugai N., Kuroyanagi M., Yamada K., Meshi T., Tsuda S., Kondo M., Nishimura M., Hara-Nishimura I., 2004: A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858
- He M.M., Tian G.M., Liang X.Q., 2008: Phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead during the aerobic composting of sewage sludge. *J Hazard*:009 30;163(2-3):671-7
- He Y.K., Tang R.H., Yi H., 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., Pei Z.M., 2004: Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Sci* 305:1968-1971
- He J.M., Xu H., She X.P., Song X.G., Zhao W.M., 2005: The role and interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UV-B induced stomatal closure in broad bean. *Funct. Plant Biol.*, 32: 237-247

- Henry Y.A., Ducastel B., Guissani A., 1997: Basic Chemistry of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: Henry, Y.A., Ducastel, B., Guissani, A., (eds.) Landes Co., Austin, USA., 15-46
- Hill A.C., Bennett J.H., 1970: Inhibition of apparent photosynthesis by nitrogen oxides. *Atmos Environ.* 4: 341-348
- Hofton C.A., Besford P.T., Wellburn A.R., 1996: Effects of NO(+NO<sub>2</sub>) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce grown hydroponically in winter with CO<sub>2</sub> enrichment. *New Phytol.* 133: 495-501
- Horemans N., Foyer C.H., Asard H., 2000: Transport and action of ascorbate at the plasma membrane. *Trends Plant Sci.*, 5: 263-267
- Hossain M. A., Fujita M., Hasanuzzaman M., 2010: Up-regulation of antioxidant and glyoxalase systems by exogenous glycinebetaine and proline in mung bean confer tolerance to cadmium stress. *Physiol. Mol. Biol. Plant.* 17
- Hossain M. A., Fujita M., 2010: Evidence for a role of exogenous glycinebetaine and proline in antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems in mung bean seedlings under salt stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 16: 19-29
- Hossain M.Z., Fujita M., 2002: Purification of a phi-type glutathione S-transferase from pumpkin flowers and molekular cloning of the cDNA. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 2068-2076
- Huaifu F., Shirong G., Yansheng J., Runhua Z., Juan L., 2007: Effects of exogenous nitric oxide on growth, active oxygen species metabolism and photosynthetic characteristics in cucumber seedlings under NaCl stress. *Front. Agric. China*, 1: 308-314
- 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
- Hung K.T., Kao C.H., 2003: Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J. Plant Physiol.* 160: 871-879
- Ignarro 1995: Annual Review of Pharmacology and Toxicology
- Innocenti G., Pucciariello C., Gleuher M.L., Hopkins J., de Stefano M., 2007: Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta*, 225: 1597-1602
- Kaiser W. M., Weiner H., Kandlbinder A., Tsai C.B., Rockel P., Sondav M., Planchet E., 2002: Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *J. Exp. Bot.* Kaiser W.M., Huber S.C., 2001: Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanisms, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* 52: 1981-1989
- Kim J.M., Kim H., Kwon S.B., Lee S.Y., Chung S.C., Jeong D.W., Min B.M., 2004: Intracellular glutathione status regulates mouse bone marrow monocyte-derived macrophage differentiation and phagocytic activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 325: 101-108
- Kolbert Zs., Batha B., Erdei L., 2005: Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum* and *Triticum aestivum* plants under osmotic stress. *Acta Biol. Szeged.* 49(1-2): 13-16
- Kopyra M., Stachon-Wilk M., Gwozdz E.A., 2006: Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum*, 28: 525-536
- Lamattina L., Garcia-Mata C., Graziano M., Pagnussat G., 2003: Nitric oxide: The versatility of extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54: 109-136
- Laspina N.V., Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P., 2005: Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress; *Plant Sci.* 169: 323-330

- Leshem Y.Y., 2000: Nitric Oxide in Plants: Occurrence, Function and Use. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands
- Leshem Y.Y., Wills R.B.H., Ku V.V.V. 1998: Evidence for the function of the free radical gas-nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants; *Plant Physiol Biochem.* 36 Leshem Y. Y., Haramaty E., 1996: The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* linn. *Foliage. Journal of plant physiology*, 148: 258-63
- Liu L., Hausladen A., Zeng M., Que L., Heitman J., Stamler J.S., 2001: A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410: 490-494
- Lum H.K., Lee C.H., Butt Y.K., Lo S.C., 2005: Sodium nitroprusside affects the level of photosynthetic enzymes and glucose metabolism in *Phaseolus aureus* (mung bean). *Nitric Oxide* 12: 220-230
- Magalhaes J.R., Monte D.C., Durzan D., 2000: Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 2: 117-127. Morimoto R., 2002: Dynamic remodeling of transcription complexes by molecular chaperones. *Cell* 110:281-284 May M., Vernoux T., Leaver C., van Montagu M., Breusegem F.V., 1998: Glutathione homeostasis in plant: Implications for environmental sensing and plant development. *J. Exp. Bot.*, 49: 649-667
- Millar A.H., Day D.A., 1996: Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* 398: 155-158
- Min-Gui Zhao, Chen, L., Li-Li Zhang, Wen-Hao Zhang, 2009: Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 151
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M., Breusegem F.V., 2004: Reactive oxygen gene network in plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498
- Mittova V., Thedoulou F.L., Kiddle G., Gomez L., Volokita M., Tal M., 2003: Co-ordinate induction of glutathione biosynthesis and glutathione metabolizing enzymes is correlated with salt tolerance. *FEBS Lett.*, 554: 417-421
- Moellering D., McAndrew J., Patel R.P., Cornwell T., Lincoln T., 1998: Nitric oxide-dependent induction of glutathione synthesis through increased expression of gamma-glutamylcysteine synthetase. *Arch. Biochem. Biophys.*, 358: 74-82
- Nakano Y. a Asada K., 1981: Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase in Spinach Chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880
- Navarre D.A., Wendehenne D., Durner J., Noad R., Klessig D.F., 2000: Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.* 122: 573-582
- Neill S. J., Desikan R., Hancock J.T., 2003: Nitric signalling in plants. *New Phytologist* 159: 11-35
- 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 Physiology* 128, 13-16.
- Neill S., Barros R., Bright J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Morris P., Ribeiro D., Wilson I., 2008: Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59: 165-176
- Noctor G., Foyer C.H., 1998: Ascorbate and glutathione; keeping active oxygen under control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* 49: 249-279
- Palma J.M., Sandalio L.M., Corpas F.J., Romero-Puertas M.C., McCarthy I., del Ro L.A., 2002: Plant proteases, protein degradation and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 521-530
- Pedroso M.C., Durzan D.J., 2000: Effect of different gravity environments of DNA fragmentation and cell death in *Kalanchoe* leaves. *Ann. Bot. (Lond.)* 86: 983-994

- Piterková J., Luhová L., Petřivalský M., 2008: Signální dráhy oxidu dusnatého v rostlinách. *Chem. Listy* 102: 410-416
- Planchet E., Kaiser W. M., 2006b: Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J. Exp. Bot.* 57 12: 3043-3055
- Planchet E., Kaiser W.M., 2006a: Nitric oxide production in plants. *Plant signalling and behaviour* 1: 46-51
- Potters, G., Horemans, N., Bellone, S., Caubergs, R.J., Trost, P., Guisez, Y., Asard, H., 2004: Dehydroascorbate influences the plant cell cycle through a glutathione-independent reduction mechanism. *Plant. Physiol.*, 134: 1479-1487
- Radi R., Beckam J.S., Bash K.M., Freeman R.A., 1991: Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 228: 481-487
- Rao M.V. a Davis K. R. 2001: The physiology of ozone induced cell death. 213: 682-690
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M., 2002: Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* 53: 103-110
- Romero-Puertas M.C., Perazzolli M., Zago E.D., Delledonne M., 2004: Nitric oxide signalling functions in plantpathogen interactions. *Cellu Microbiol.* 6: 795-803
- Ruan H.H., Shen W.B., Xu L.L., 2004: Nitric oxide involved in the abscisic acid-induced proline accumulation in wheat seedling leaves under salt stress. *Acta Bot. Sin.* 46: 1307-1315
- Sakamoto A., Ueda M., Morikawa H., 2002: Arabidopsis glutathionedependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS Letters* 515: 20-24
- Sanakis Y., Goussias C., Mason R.P., Petrouleas V., 1997: NO interacts with the tyrosine radical YD of photosystem II to form an iminoxyl radical. *Biochemistry* 36: 1411-1417
- Sandalio L.M., Fernandez V.M., Rupérez F.L., Del Río L.A., 1988: Superoxide Free Radicals Are Produced in Glyoxysomes. *Plant Physiol.* 87: 1-4
- Sedláček J., 1999: Oxid dusnatý jako signální molekula. *Vesmír* 78
- Sekmen A.H., Turkman, Takio S., 2007: Differential responses to antioxidant enzymes and lipid peroxidation of salt stress in salt-tolerant *Plantago maritime* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiol. Plant.*, 131: 399-411
- Shalat A., Mittova V., Voloit M., Guy M., Tal M., 2001: Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt-dependent oxidative stress: The root antioxidative system. *Physiol. Plant.*, 112: 487-494
- Sheokand S., Kumari A., Sawhney V., 2008: Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. *Physiol Mol Biol Plants* 14:355-362
- Shi Q., Ding F., Wang X., Wei M., 2007: Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiol Biochem* 45:542-550
- Shi S., Wang G., Wang Y., Zhang L., Zhang L., 2005: Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* 13:1-9
- Shigeoka S., Ishikawa T., Tamoi M., Miyagawa Y., Takeda T., Yabuta Y., Yoshimura K., 2002: Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* 53: 1305-1319
- Schansker G., Goussias C., Petrouleas V., Rutherford A.W., 2002: Reduction of the Mn cluster of the water-oxidizing enzyme by nitric oxide: formation of an S-2 state. *Biochemistry* 41: 3057-3064

- Siddiqui M.H., Mohammad F., Khan M.N., 2009b: Morphological and physio-biochemical characterization of *Brassica juncea* L.Czern. & Coss. genotypes under salt stress. *J Plant Interact* 4:67-80
- Siddiqui M.H., Mohammad F., Khan M.N., Naeem M., Khan .M.M.A., 2009a: Differential response of salt-sensitive and salt-tolerant *Brassica juncea* genotypes to N application: enhancement of N metabolism and anti-oxidative properties in the salt-tolerant type. *Plant Stress* 3:55-63
- Smirnoff N., 2000: Ascorbic acid: Metabolism and funkcions of multi-faceted molecule. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3: 229-297
- Song F., Goodman R.M., 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
- Sthr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R., Rockel P., 2001: A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212: 835-841
- Stöhr C., Ullrich W.R., 2002: Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *J. Exp. Bot.* 53: 2293-2303
- Takahashi S., Yamasaki H., 2002: Reversible inhibition of photophos-phorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett* 512: 145-148
- Takashi Ushimaru, Tomofumi Nakagawa, Yuko Fujioka, Katsue Daicho, Makiko Naito, Yuzo Yamauchi, Hidako Nonaka, Katsumi Amako, Kazuki Yamawaki, Norio Murata; Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress; *Plant Physiol* 163; 2006
- Tausz M., Grill D., 2000: The role of glutathione in stress adaptation of plants; *Phyton Int. J. Exp. Bot.* 40
- Tewari R.K., Kumar P., Kim S., Hanhn E.J., Peak K.Y., 2009: Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalaenopsis* flower: an implication of NO in senescence and oxidative stress regulation. *Plant Cell Rep.*, 28: 267-279
- Therond P., Bonfont-Rousselot D., Davit-Spraul A., Conti M., Legrand A., 2000: Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach; *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3
- Thomas DD, Liu X, Kantrow SP, Lancaster JR Jr., 2001: The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2:355-60
- Tu J., Shen W.B., Xu L.L., 2003: Regulation of nitric oxide on ageing processes of wheat leaves. *Acta Bot. Sinica*, 45: 1054-1061
- Uchida A., Jagendorf A.T., Hibino T., Takabe T., Takabe T., 2002: Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 163: 515-523
- Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y-P., Rea, P.A., 1999: AtPCS1, aphytochelatin synthase from *Arabidopsis*: isolation and in vitro reconstitution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 7110-7115
- Wang R., Tischner R., Gutierrez R.A., Hoffman M., Xing X., Chen M., Coruzzi G., Crawford N.M., 2004: Genomic analysis of the nitrate response using a nitrate reductase-null mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 136: 2512-2522
- Wendehenne D., Pugin A.,Klessig D.F., Durner J., 2001: Nitrite oxide: comparative synthesis and signalling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 77-83
- Wink D.A., MitchellJ.B., 1998: Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free radical biology and medicine* 25: 434-456

- Wodala B., Deák Z., Vass I., Erdei L., Altorjay I., Horváth F., 2008: In Vivo Target Sites of Nitric Oxide in Photosynthetic Electron Transport as Studied by Chlorophyll Fluorescence in Pea Leaves. *Plant Physiology* 146:1920-1927
- Wojtaszek P., 2000: Nitric oxide in plants: to NO or not to. *Phytochemistry* 54: 1- 4
- Xu J., Yin H.X., Liu X.J., Li X., 2010: Salt affects plant Cd-stress responses by modulating growth and Cd accumulation. *Planta* 231: 449-459
- Yamasaki H., 2000: Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.* 355:1477-1488
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S., 1999: An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* 4: 128-129
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S., 1999: An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* 4: 128-129 Yang J.D., Zhao H.L., Zhang T.H., Yun J.F., 2004: Effects of exogenous nitric oxide on photochemical activity of photosystem II in potato leaf tissue under non-stress condition. *Acta. Bot. Sin.* 46: 1009-1014
- Zeidler D., Zahringer U., Gerber I., Dubery I., Hartung T., Bors W., Hutzler P., Durner J., 2004: Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 101, 15811-15816
- Zeier J., Delledonne M., Mishina T., Severi E., Sonoda M., Lamb C., 2004: Genetic elucidation of nitric oxide signalling in incompatible plant pathogen interactions. *Plant Physiol.* 136: 2875-2886
- Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M.C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L.S., Wanker E.E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., 2006: Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* 11: 524-525
- Zenk M.H. 1996: Heavy metal detoxification in higher plants: a review. *Gene* 179: 21-30
- Zhang H., Li Y.H., Hu L.Y., Wang S.H., Zhang F.Q., Hu K.D., 2008a: Effects of exogenous nitric oxide donor on antioxidant metabolism in wheat leaves under aluminum stress. *Russ. J. Plant Physiol.* 55:469-474
- Zhang H., Shen W.B., Xu L.L., 2003: Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress. *Acta Botanica Sinica* 45, 901-905
- Zhang L.P., Mehta S.K., Liu Z.P., Yang Z.M., 2008b: Copper-induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell Physiol* 49:411-419
- Zhang X., Takemiya A., Kinoshita T., Shimazaki K., 2007: Nitric oxide inhibits blue light-specific stomatal opening via abscisic acid signaling pathways in *Vicia* guard cells. *Plant Cell. Physiol.* 48:715-723
- 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 Physiol* 134:849-857
- Zhao M.G., Chen L., Zhang L.L., Zhang W.H., 2009: Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151:755-767
- Zheng C., Jiang D., Liu F., Dai T., Liu W., Jing Q., Cao W., 2009: Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environ. Exp. Bot.* 67:222-227