ROLA TLENKU AZOTU W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRES ABIOTYCZNY*

ROLE OF NITRIC OXIDE IN PLANT RESPONSE TO ABIOTIC STRESS

Weronika GRZEGORZEWSKA, Krzysztof JAWORSKI,
Adriana SZMIDT-JAWORSKA

Zakład Fizjologii i Biologii Molekularnej Roślin,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Streszczenie: Tlenek azotu (NO) jest wolnym rodnikiem, który był obszernie badany jako substancja powodująca zanieczyszczenie powietrza oraz produkt metabolizmu pewnych grup bakterii. Sposoby jego pobierania, metabolizm oraz szkodliwy wpływ na rośliny zostały dobrze poznane. Okazało się jednak, że rośliny nie tylko reagują na zmiany stężenia NO w środowisku, lecz są w stanie samodzielnie go produkować. Zmieniło to sposób myślenia o tlenku azotu, który obecnie uważany jest za cząsteczkę sygnalną odgrywającą doniosłą rolę w szlakach transdukcji sygnałów u roślin, w które zaangażowane są także cykliczne nukleotydy (cAMP, cGMP), nadtlenek wodoru, kwas salicylowy czy jony wapnia. Stężenie NO, jako cząsteczki biologicznie aktywnej, musi podlegać ścisłej regulacji w miejscu jego działania, za co odpowiadają zarówno mechanizmy prowadzące do jego generowania, jak i usuwania. Wiadomo, że NO jest wytwarzany z udziałem syntazy tlenku azotu z L-argininy, z azotynów, w wyniku działania reduktazy azotanowej, jak również w wyniku przemian nieenzymatycznych (reakcje oksydoredukcyjne), jako produkt pośredni w procesie wiązania azotu, oddychania czy denitryfikacji. W proces jego unieczynniania zaangażowanych jest szereg związków, takich jak: rodnik ponadtlenkowy (O_2^-), glutation, jony metali grup przejściowych oraz niesymbiotyczna hemoglobina. Działanie NO w organizmie rośliny jest wielokierunkowe i zależne od różnych czynników wewnętrznych i środowiskowych. Jego udział został opisany w niektórych procesach morfogenetycznych, takich jak: skracanie fazy spoczynkowej nasion, promowanie procesu kiełkowania i starzenia roślin, hamowanie kwitnienia, programowana śmierć komórki i ksylogeneza, jak również w ruchach aparatów szparkowych. Jednak najlepiej został poznany jego udział w reakcjach odpornościowych na czynniki biotyczne (infekcja patogenu) oraz abiotyczne (susza, zasolenie, wysokie temperatury, naświetlanie światłem UV, metale ciężkie, herbicydy, zranienie). W przeważającej większości czynniki stresowe powodują wzrost stężenia NO, którego zadanie polega na zmniejszaniu szkodliwych skutków działania wolnych rodników oraz reakcji z innymi cząsteczkami sygnalnymi, takimi jak: kwas salicylowy, jony wapnia czy cykliczny GMP. Ponadto stwierdzono jego udział w modulowaniu ekspresji genów zaangażowanych w reakcje stresowe. Celem

*Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego nr N N310 141435 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

niniejszego opracowania jest przedstawienie wiadomości dotyczących metabolizmu tlenku azotu w komórkach roślinnych oraz udziału w reakcjach roślin na stres abiotyczny. Ponadto przedstawiono dowody na współdziałanie NO z innymi cząsteczkami sygnalnymi w regulacji zamykania szparek w odpowiedzi roślin na stres dehydratacyjny.

Słowa kluczowe: tlenek azotu, stres abiotyczny, reaktywne formy tlenu, transdukcja sygnału.

Summary: Nitric oxide (NO) is a small gaseous radical molecule previously studied primarily as an air pollutant and metabolic product of certain bacteria. NO's uptake into leaves, as well as its metabolism and phytotoxicity are well documented. It was subsequently demonstrated that plants not only respond to atmospheric NO but also produce substantial amount of nitric oxide. After such discovery our appreciation of NO dramatically changed. Nowadays there is no doubt that nitric oxide has emerged as an important molecule in plant signal transduction pathways, where NO may directly or indirectly interact with other signaling molecules such as cyclic nucleotides (cAMP, cGMP), H_2O_2, salicylic acid, and cytosolic Ca^{2+}. It is likely that concentration of biologically active molecule such as nitric oxide must be precisely regulated by its synthesis and removal. There are many possible sources of nitric oxide. It can be generated by nitric oxide synthase from L-arginine or from nitrite via nitrate reductase. Moreover, NO can be generated non-enzymaticly as a byproduct of denitrification, nitrogen fixation and respiration. Simple chemical reactions and some compounds such as superoxide anions, glutathione, transition metals and non-symbiotic haemoglobins are responsible for quick NO removal from the solution. Various experimental data indicate that in plants nitric oxide plays important signaling role in diverse (patho)physiological processes from reduction of seed dormancy and promotion of seed germination, regulation of plant senescence, suppression of floral transition, stomatal movement as an intermediate downstream of abscisic acid signaling to programmed cell death and xylogenesis. Moreover, nitric oxide mediates a multiple plant responses toward a variety of biotic (pathogen infection) and abiotic (drought, salt, heat, UV light irradiation, heavy metals, herbivores, mechanical wounding) stresses. All stresses mostly induce NO production in plants. NO alleviates the harmfulness of reactive oxygen species and reacts with other target molecules such as salicylic acid, calcium ions and cyclic GMP. It also regulates the expression of stress responsive genes. In the present review, we introduce how NO is produced and removed in plants and highlight the recent progress that provides novel insights into the functions of NO under abiotic stresses. Moreover, interactions of NO signaling with other signaling molecules in regulation of stomatal closure in responses to dehydratation were also discussed.

Key words: abiotic stress, nitric oxide, reactive oxygen species, signal transduction.

WPROWADZENIE

Tlenek azotu (NO) jest niskocząsteczkowym reaktywnym związkiem o dużej lipofilności, który z łatwością przenika przez błony drogą pozareceptorową (dyfuzja) i pełni funkcję ważnego przekaźnika w sygnalizacji komórkowej.

Wykrycie pod koniec lat 70 tlenku azotu w komórkach zwierzęcych zapoczątkowało zakrojone na szeroką skalę badania nad jego metabolizmem i rolą w żywych komórkach. U ssaków NO jest kluczową cząsteczką zaangażowaną w szeroką gamę procesów biologicznych, takich jak: obniżanie napięcia mięśni gładkich oraz naczyń krwionośnych, przekaźnictwo nerwowe czy reakcje immunologiczne.

U roślin jego rola wydaje się być nie mniej istotna. Udowodniono, że jest on zaangażowany w regulację szeregu procesów fizjologicznych. Przykładowo, tlenek azotu wpływając na skracanie długiego spoczynku nasion stymuluje ich kiełkowanie [3, 4, 29]. Uczestniczy także w procesie kwitnienia [21, 49, 50] oraz dojrzewaniu owoców i nasion [19, 32]. Pośrednicząc w szlaku sygnalizacyjnym kwasu abscysyno-

wego (ABA) wpływa na ruchy aparatów szparkowych [8, 13, 14]. Pełni jednocześnie funkcję ważnego przekaźnika sygnałów w reakcjach roślin na stres biotyczny: infekcję patogenu oraz abiotyczny: suszę, zasolenie, wysoką lub niską temperaturę [5, 11, 33, 53, 63, 67].

Tlenek azotu jest związkiem o charakterze zarówno cytotoksycznym, jak i obronnym [59, 60]. Dwojaka natura NO jako potencjalnego utleniacza lub skutecznego przeciwutleniacza w przeważającej mierze zależy od jego koncentracji w komórce. W niskich stężeniach NO pobudza normalny wzrost i rozwój roślin, natomiast zastosowanie go w wyższej dawce wyraźnie zakłóca normalny metabolizm. Bierze on udział w procesach prowadzących do uszkadzania błon plazmatycznych, białek i kwasów nukleinowych, które w efekcie powodują śmierć komórki [16, 42]. Wpływa także na obniżenie wydajności fotosyntezy oraz powoduje hamowanie procesów oddechowych [44, 67].

NO spełnia również kluczową rolę w roślinnych szlakach transdukcji sygnału, w których elementami pośredniczącymi są cykliczny GMP i jony wapnia. Może także wchodzić w interakcje z innymi cząsteczkami sygnalnymi, takimi jak: H_2O_2 czy kwas salicylowy [27, 56].

Aktualny stan wiedzy dotyczący biosyntezy i zaangażowania NO w procesy wzrostu i rozwoju roślin oraz w reakcje stresowe jest sukcesywnie omawiany zarówno w anglojęzycznej, jak i polskiej literaturze [6, 7, 8, 15, 31]. Konieczne staje się jednak ciągłe uzupełnianie tej wiedzy, wynikające z dużej liczby prac ukazujących się corocznie, związanych z tymi zagadnieniami. Niniejsze opracowanie stanowi podsumowanie aktualnego stanu wiedzy na temat syntezy oraz biologicznej funkcji NO u roślin narażonych na działanie stresu abiotycznego.

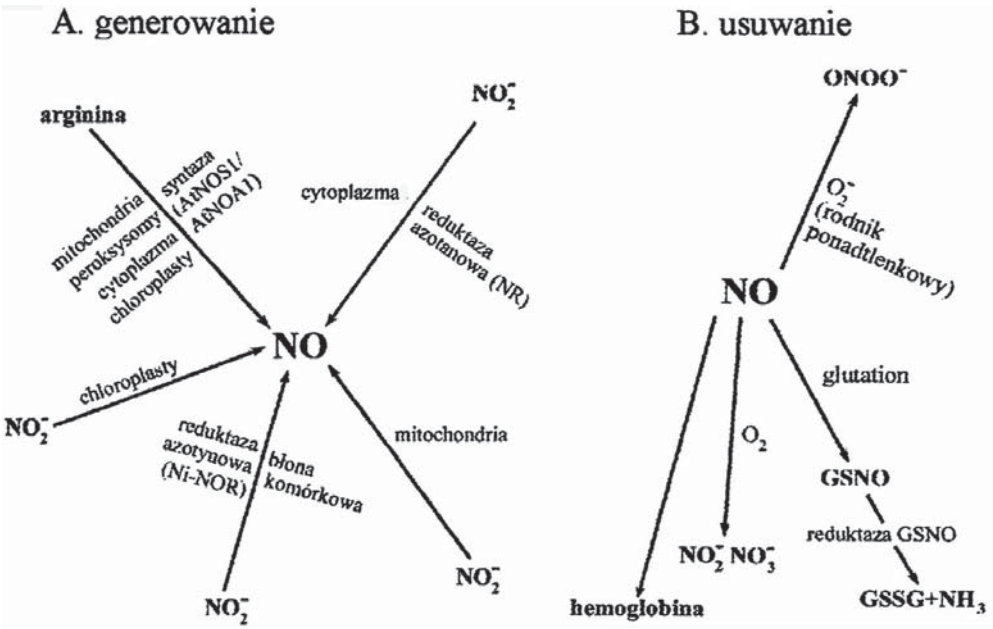
GENEROWANIE ORAZ USUWANIE TLENKU AZOTU

Tlenek azotu pojawia się w komórkach roślinnych w wyniku procesów zachodzących z udziałem enzymów lub w wyniku przemian nieenzymatycznych (ryc. 1A).

W przypadku komórek zwierzęcych głównymi enzymami odpowiedzialnymi za proces syntezy są trzy dioksygenazy – syntazy tlenku azotu – NOS (ang. *Nitric Oxide Synthase*), z których każda odznacza się odmienną lokalizacją i funkcją. Zmieniają one L-argininę do L-cytruliny i NO. NOS funkcjonują w postaci homodimerów, a do ich aktywności niezbędna jest obecność kilku kofaktorów, w tym NADPH, FAD, FMN, TH_4, jonów Ca^{2+} i kalmoduliny [31].

U roślin zastosowanie analogów argininy, będących inhibitorami NOS, oraz przeprowadzenie reakcji syntezy L-cytruliny doprowadziło do zidentyfikowania w brodawkach korzeniowych łubinu enzymu o aktywności podobnej do NOS. W kolejnych latach pojawiły się prace wskazujące na obecność odpowiednika zwierzęcych NOS w komórkach tytoniu, soi, grochu i kukurydzy [6, 7, 10].

U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano genu *AtNOS1*, który prawdopodobnie koduje białko związane z biosyntezą NO [18]. Stwierdzono, że do aktywacji



RYCINA 1. Generowanie oraz usuwanie tlenku azotu w komórkach roślinnych. NO może być wytwarzany z argininy w wyniku działania syntazy NO (AtNOS1/AtNOA1); z NO_3^- i NO_2^- w wyniku działania reduktazy azotanowej (NR) i reduktazy azotynowej (Ni-NOR) oraz nieenzymatycznie. NO jest usuwany w wyniku reakcji z hemoglobiną, glutationem; jest również przekształcany do jonu peroksynitrylowego oraz w wyniku nitryfikacji/denitryfikacji do NO_3^-, NO_2^- (na podstawie [38], zmodyfikowane)
FIGURE 1. NO generation and removal in plant cells. NO can be generated from arginine by NO synthase (AtNOS1/AtNOA1); from nitrate (NO_3^-) by nitrate reductase (NR) and nitrite (NO_2^-) by nitrite reductase (Ni-NOR) and via non-enzymatic reactions. NO is metabolized by reactions with haemoglobins and glutathione. It reacts readily with oxygen and superoxide producing NO_2^-, NO_3^- and peroxynitrile ($ONOO^-$) (based on [38], modified)

rekombinowanego białka potrzebne są jony wapnia, kalmodulina i NADPH. Białko AtNOS1 wykazuje wysoki stopień homologii z enzymem odpowiedzialnym za wytwarzanie NO u ślimaka winniczka (*Helix pomatia*), jak również wiąże się ono z przeciwciałami skierowanymi na neuronową NOS. Analizy immunocytochemiczne wskazały na obecność AtNOS1 w chloroplastach, peroksysomach, mitochondriach i cytozolu [19]. Wyniki pomiaru zawartości NO *in vitro* u mutantów *Atnos1* wykazały, że rośliny te charakteryzują się obniżonym poziomem tlenku azotu. Do chwili obecnej nie uzyskano potwierdzenia, czy rośliny te przejawiają zredukowaną aktywność syntazy NO również *in vivo*. Założono więc, że zmiany poziomu aktywności AtNOS1 z biosyntezą tlenku azotu mogą mieć charakter pośredni lub białko powstające na bazie omawianego genu spełnia jedynie rolę regulatorową. Z tego powodu zasugerowano zmianę nazwy AtNOS1 na AtNOA1 (ang. *NO-Associated protein 1*) [61]. Ostatnio pojawiły się dane wskazujące, że AtNOS1/AtNOA1 nie jest jednak syntazą tlenku azotu. Wykazano, że białko to specyficznie wiąże GTP i bierze udział w jego hydrolizie, a proces ten, choć jest istotny, nie warunkuje fizjologicznej aktywności charakterystycznej dla syntaz NO. Zasugerowano więc, że analizowany AtNOA1 jest członkiem rodziny cGTPaz [35].

Innym enzymem generującym NO u roślin jest reduktaza azotanowa – NR (ang. *Nitro Reductase*), która katalizuje zależną od NAD(P)H reakcję redukcji azotanów do azotynów [39, 55]. Wzrost stężenia azotynów w komórkach roślinnych, wynikający z braku tlenu lub ograniczenia jego ilości, aktywuje reduktazę azotanową, która katalizuje jednoelektronową redukcję azotynu do NO przy udziale NADH. Produkcja NO będąca wynikiem działania NR została stwierdzona u wielu gatunków roślin, takich jak: słonecznik, szpinak, kukurydza, ogórek, pszenica, storczyk i aloes oraz u zielenic [39, 45, 46, 52, 58]. W genomie *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa geny, oznaczone *NIA1* i *NIA2*, kodujące przypuszczalne reduktazy azotanowe. Podwójny mutant *nia1 nia2* charakteryzował się zmniejszoną aktywnością NR i obniżoną syntezą NO w komórkach przyszparkowych [26]. Zawierał on 10 razy niższe stężenie argininy, tak więc redukcja zawartości tego aminokwasu może być czynnikiem ograniczającym aktywność NOS [34]. Odkrycie to wskazało, że proces syntezy NO z wykorzystaniem NOS i NR jest bardziej złożony niż się początkowo wydawało. Pojawia się zatem pytanie, czy i w jaki sposób te dwa enzymy współdziałają podczas regulacji syntezy NO w komórkach roślinnych.

Istnieją także inne enzymy, których aktywacja wpływa na powstawanie NO. Jest to między innymi oksydoreduktaza ksantynowa – XOR (ang. *Xanthin-Oxido Reductase*), której aktywność została stwierdzona w peroksysomach liści grochu. W zależności od dostępności tlenu w reakcji z udziałem tego enzymu powstaje tlenek azotu lub anionorodnik ponadtlenkowy [31, 60]. Tlenek azotu generowany jest również w wyniku działania peroksydazy chrzanowej, która katalizuje reakcje powstawania NO z hydroksymocznika lub N-hydroksyargininy w obecności H_2O_2. Także N-hydroksyarginina może być utleniana do NO przez katalazę oraz cytochrom P_{450} (z udziałem NADPH i tlenu) [31].

Tlenek azotu u roślin może tworzyć się także w drodze nieenzymatycznej. W ścianie komórkowej, ziarnach aleuronowych i chloroplastach, które charakteryzują się kwaśnym pH, dochodzi do redukcji azotynów (NO_2^-) do NO. Proces redukcji azotynów zachodzi także przy dostępie światła, w obecności karotenoidów oraz jako uboczny produkt utleniania N_2O w procesach nitryfikacji/denitryfikacji [54].

Jest oczywiste, że stężenie cząsteczki biologicznie aktywnej, jaką jest NO, musi podlegać ścisłej regulacji w miejscu jej działania. Odpowiadają za to zarówno mechanizmy prowadzące do jej syntezy, jak i usuwania (ryc. 1B).

Zarówno u roślin, jak i u zwierząt NO jest produkowany w tym samym miejscu i tym samym czasie co reaktywne formy tlenu (RFT). Zauważono, że podstawowy poziom NO w komórkach liścia jest zawsze poniżej poziomu detekcji, gdyż NO bardzo szybko reaguje z rodnikami ponadtlenkowymi, w wyniku czego powstaje jon peroksynitrylowy, który dla roślin nie jest związkiem toksycznym. Mechanizm ten nie tylko prowadzi do regulacji poziomu RFT, lecz także jest jednym ze sposobów usuwania NO z komórek [38].

NO łatwo wchodzi także w odwracalne reakcje z grupami tiolowymi cysteiny lub z glutationem, a proces S-nitrozylacji białek może mieć kluczowe znaczenie w sygnalizacji NO. Średnie stężenie glutationu w komórkach roślinnych wynosi 2–3 mM [2] i z tego

powodu tworzenie nitrozoglutationu (GSNO) może odgrywać bardzo ważną rolę w kontrolowaniu wolnych cząsteczek NO. NO ma zdolność oddawania elektronów, zatem może reagować z jonami metali przejściowych, takich jak: żelazo, miedź, cynk, z utworzeniem kompleksów metalo-nitrozylowych. Mechanizm ten poza zmniejszaniem stężenia NO w miejscu jego działania odgrywa też rolę w przebiegu różnych procesów, gdyż metale przejściowe są składnikami grup prostetycznych wielu enzymów (np. żelazo grupy hemowej w cząsteczce cyklazy guanylanowej czy hemoglobiny). W chwili obecnej u roślin nie opisano oczyszczonej cyklazy, której aktywność byłaby bezpośrednio regulowana przez wiązanie NO z grupą hemową, chociaż obserwowano wpływ NO na poziom cGMP oraz aktywność cyklazową [49, 50].

Stosunkowo niedawno pojawiły się informacje wskazujące na reakcję NO z hemoglobiną. Niesymbiotyczna hemoglobina (nsHbs) opisana u jęczmienia, lucerny i *Arabidopsis* reagowała z NO, powodując tym samym obniżenie stężenia wolnego NO *in vitro*. Obniżenie stężenia nsHbs u *Arabidopsis* (AHb1) wpływało na wzrost stężenia NO, co było skorelowane ze stanem hipoksji, czyli niedoboru tlenu, wskazując tym samym na fizjologiczną rolę AHb1 w modulowaniu poziomu NO [17, 43].

TLENEK AZOTU A STRES ABIOTYCZNY

Działanie NO w organizmie roślinnym jest wielokierunkowe i zależne od różnych czynników wewnętrznych i środowiskowych. Jedną z najlepiej zbadanych funkcji tego gazu jest udział w reakcjach wywoływanych przez stres abiotyczny (tab. 1). W większości przypadków stres ten wpływa na zwiększenie stężenia reaktywnych form tlenu (RFT) w komórkach roślinnych, co prowadzi do stresu oksydacyjnego [30]. Kontrolowanie stężenia RFT jest jednym z elementów warunkujących precyzyjną odpowiedź na czynniki stresowe [54]. Organizmy aerobowe są chronione przed uszkodzeniami spowodowanymi RFT przez antyoksydacyjny system obronny, składający się z katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy, alternatywnej oksydazy oraz składników nieenzymatycznych, takich jak askorbinian czy glutation. Rola tlenku azotu jako przeciwutleniacza oparta jest głównie na jego zdolności do utrzymywania komórkowej homeostazy oksydacyjno-redukcyjnej oraz regulacji toksyczności RFT. Ponadto, istnieją sugestie, że NO bierze udział w eliminowaniu nadmiaru azotynów, które mogą być toksyczne dla komórek roślinnych.

Istnieje bezpośrednia zależność pomiędzy procesem biosyntezy tlenku azotu i reaktywnych form tlenu, a poziom NO ma w tych zależnościach kluczowe znaczenie [59, 60]. W istocie, przy niedoborze NO w stosunku do jonu ponadtlenkowego (O_2^-), jest on zużywany w reakcji tworzenia rodników peroksynitrylowych ($ONOO^-$) [25]. Powoduje to brak warunków do tworzenia się rodników hydroksylowych z H_2O_2. Przy wysokim stężeniu NO pełni funkcję wymiatacza wobec rodnika ponadtlenkowego (O_2^-) tworząc $ONOO^-$, który nie wykazuje tak silnego działania apoptotycznego jak O_2^-, równocześnie uniemożliwiając powstanie wystarczających ilości H_2O_2 [25].

TABELA 1. Rola tlenku azotu w reakcjach odpornościowych roślin na stres abiotyczny (na podstawie [44], zmodyfikowane)
TABLE 1. The role of nitric oxide in plant responses toward a variety of abiotic stresses (based on [44], modified)

Rodzaj stresora	Efekt wywoływany przez NO	Gatunek rośliny	Literatura
Susza i stres osmotyczny	Uruchomienie szlaku sygnalizacji ABA, zamykanie szparek, indukcja syntezy ABA	*Nicotiana tabacum* *Pisum sativum*	[17, 44]
Zasolenie	Wzrost tolerancji na zasolenie, indukcja ekspresji genu kodującego antyporter Na^+/H^+	*Nicotiana tabacum* *Zea mays*	[17, 63]
Metale ciężkie	Wpływ na elongację korzeni; redukcja aktywności NOS	*Hibiscus moscheutos*	[51]
Herbicydy	Promowanie aktywności enzymów syntetyzujących antyoksydanty	*Scenedesmus obliquus* *Chlamidomonas reinhardtii*	[44, 46]
Wysoka temperatura	Gwałtowna synteza NO, wzrost tolerancji siewek	*Medicago sativa* *Nicotiana tabacum*	[17]
Niska temperatura	Spadek aktywności RFT	*Scenedesmus obliquus*	[53]
Zranienie mechaniczne	Podniesienie poziomu NO prowadzące do śmierci komórki	*Arabidopsis thaliana* *Taxus brevifolia* *Scenedesmus obliquus*	[40, 42]
Promieniowanie UV	Indukcja ekspresji genu kodującego syntazę chalkonową	*Arabidopsis thaliana* *Zea mays*	[1]

Udział tlenku azotu w tolerancji na stres dehydratacyjny

Dehydratacja komórek jest następstwem występowania w środowisku takich czynników abiotycznych, jak: susza, wysokie zasolenie oraz ekstremalne temperatury. W odpowiedzi na te czynniki w roślinie dochodzi do szeregu zmian fizjologicznych związanych np. z syntezą związków organicznych, które obniżając potencjał wody zapobiegają jej wypływowi z komórki oraz zmian molekularnych, polegającym na zróżnicowanej ekspresji wielu genów, będących elementami szlaków zależnych lub niezależnych od ABA [41].

Susza jest jednym z najistotniejszych czynników ograniczających produktywność roślin. Dowiedziono, iż susza promuje syntezę tlenku azotu u grochu i tytoniu [16]. Aplikowany egzogennie nitroprusydek sodu (SNP), będący donorem NO, obniża straty wody w siewkach pszenicy poddanych warunkom suszy. Stymuluje ponadto wypływ jonów i inicjuje zamykanie aparatów szparkowych, co poprzez ograniczenie utraty wody wywołuje zwiększoną tolerancję rośliny na stres spowodowany suszą [14]. Specyficzny wymiatacz NO, (cPTIO; 2-(4-karboksyfenylo)-4,4,5,5-tetrametylo-imidazolino-1-oxyl-3-tlenek potasu) powoduje odwrócenie efektu wywołanego działaniem tlenku azotu. Wiadomo, że obecność sprawnego mechanizmu zamykania aparatów szparkowych ma istotne znaczenie w odporności roślin na deficyt wody. NO selektywnie aktywuje wewnątrzkomórkowe kanały wapniowe w komórkach przyszparkowych *V. faba* poprzez szlak sygnalizacyjny zależny od cGMP/cADPR, ujawniając zaangażowanie tlenku azotu jako cząsteczki sygnałowej w zamykaniu aparatów szparkowych [12]. Ponadto stwierdzono, że obecność reduktazy azotano-

wej (NR), która reaguje na zmiany stężenia ABA, jest wymagana do indukowanego przez ABA zamykania aparatów szparkowych w komórkach przyszparkowych *Arabidopsis* [8]. NO i RFT uczestniczą także w zahamowaniu utraty wody przez liście siewek pszenicy poprzez stymulację biosyntezy ABA [57]. NO wykazuje również zdolność odwracania negatywnych skutków stresu osmotycznego. Poziom anionów ponadtlenkowych w mikrosomach izolowanych z komórek soi jest znacząco obniżany po podaniu donora NO, jednakże nie odnotowano podobnego wpływu na poziom H_2O_2. NO znosi wywoływane przez RFT reakcje cytotoksyczne w liściach pomidora. Indukowane suszą procesy prowadzące do uszkodzenia struktur komórkowych, zaburzeń w przepływie jonów, fragmentacji DNA są hamowane przez egzogenne traktowanie NO, a hamujący efekt NO jest niwelowany przez traktowanie wymiataczem NO (PTIO). Ochronna rola, jaką pełni tlenek azotu w warunkach stresu osmotycznego, została ostatnio potwierdzona w zawiesinach komórkowych pochodzących z dwóch ekotypów trzciny, u której glikol polietylenowy (PEG-6000) przez indukowanie uwalniania NO, efektywnie chronił przed uszkodzeniami oraz zwiększał tolerancję na stres osmotyczny [64].

Problem zaangażowania tlenku azotu w nabywaniu tolerancji na stres solny był w ostatnich latach podejmowany wielokrotnie, tak więc funkcja, jaką pełni NO w tym procesie została opisana u wielu gatunków roślin. Traktowanie młodych siewek ryżu donorem NO (SNP) ma ochronny wpływ na rośliny poddane stresowi solnemu, powodując ich szybszy wzrost i większą żywotność [53]. W siewkach łubinu żółtego promuje on kiełkowanie nasion i wzrost korzeni [24], a w przypadku kukurydzy zwiększa wzrost rośliny i przyrost suchej masy [63]. Mutanty *Atnoa1 Arabidopsis*, charakteryzujące się obniżoną aktywnością NOS i zredukowanym endogennym poziomem tlenku azotu, są bardziej wrażliwe na stres spowodowany NaCl niż rośliny typu dzikiego [18, 65]. W trakcie wzrostu w warunkach stresu solnego ich przeżywalność jest niższa niż u roślin wykazujących wyższą aktywność NOS. Ponadto w *Atnoa1* jest wyższe stężenie nadtlenku wodoru niż w roślinach typu dzikiego zarówno w warunkach kontrolnych, jak i stresu solnego, co dodatkowo potwierdza większą ich wrażliwość. Co najważniejsze jednak, traktowanie mutantów *Atnoa1* SNP znosi wszelkie zmiany, powodowane poddaniem roślin stresowi [66].

Wpływ NO na zwiększenie tolerancji siewek kukurydzy na zasolenie polega na promowaniu akumulacji jonów K^+ w korzeniach, liściach i pochwach liściowych oraz zmniejszeniu stężenia jonów Na^+ [63]. Dalsze badania wykazały ponadto, że zarówno traktowanie NO, jak i NaCl stymuluje aktywność wakuolarnej H^+-ATPazy i H^+-PPazy, powodując zwiększone przemieszczanie się jonów H^+ i wymianę Na^+/H^+. Aktywność H^+-ATPaz i H^+-PPaz, indukowanych obecnością NaCl, była zredukowana w obecności wymiatacza NO (błękit metylowy, MB-1) [63]. Wytworzenie odporności na zasolenie w kallusie *Populus euphratica* jest stymulowane poprzez aplikację NO i ma także wpływ na wzrost współczynnika K^+/Na^+ [62]. Ekspresja genu *OsNOA1* u ryżu, będącego homologiem genu *AtNOA1 Arabidopsis*, prowadzi do podniesienia poziomu NO oraz ekspresji genu *AtSOS1*, kodującego białko antyportera Na^+/H^+ oraz genu *AtAHA2*, kodującego H^+-ATPazę, powodując zwiększenie fenotypów z nabytą tolerancją na zasolenie. Podobne zjawisko może

być wywołane przez egzogenną aplikację donorów NO [44]. Sugeruje się więc, że NO może wzmagać tolerancję roślin na zasolenie przez zwiększanie ekspresji genu błonowego antyportera sodowo-protonowego i genów H+-ATPazy, które są niezbędne dla zachowania homeostazy jonów Na^+/K^+ [48].

Rola tlenku azotu w warunkach ekstremalnych temperatur może polegać na obniżaniu poziomu wolnych rodników powstałych w wyniku działania wysokiej lub niskiej temperatury. Wykazano, że zarówno w komórkach epidermy, jak i w zawiesinie komórkowej tytoniu wysoka temperatura generuje gwałtowny i znaczący wzrost poziomu tlenku azotu [17]. U lucerny krótkotrwały stres termiczny zwiększa produkcję NO, co wpływa na zahamowanie syntezy etylenu, a traktowanie siewek kukurydzy, pszenicy i ryżu donorem NO zapobiega uszkodzeniom fotosystemu II (PSII) [53].

Udział tlenku azotu w tolerancji na herbicydy, UV, metale ciężkie i stres mechaniczny

Istnieje niewiele danych o roli NO w reakcji roślin na herbicydy. Wykazano, że tlenek azotu wpływa ochronnie na błonę chloroplastu, gdyż rozpad chlorofilu, który został zainicjowany przez dikwat, można było odwrócić przez traktowanie SNP. Ponadto podanie tlenku azotu bezpośrednio po podaniu parakwatu zapobiega redukcji ogólnej ilości białek, zmniejsza poziom dialdehydu malonowego i poprawia aktywność enzymów antyoksydacyjnych, takich jak: dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydazy czy reduktaza glutationowa [22].

Tlenek azotu jest także zaangażowany w mechanizmy obronne rośliny przed szkodliwym działaniem UV. Stwierdzono, że w wyniku wystawienia *Arabidopsis* na działanie promieniowania UV-B następuje znaczący wzrost poziomu zarówno NO, jak i reaktywnych form tlenu (RFT). Wiadomo także, że aktywność NOS w hypokotylach kukurydzy znacząco wzrasta po ich wystawieniu na działanie tego promieniowania. Tlenek azotu indukuje również ekspresję genów związanych z reakcją obronną (PR-1 i PAL) oraz wpływa na ekspresję genu syntazy chalkonowej (CHS), jednak powyższe procesy nie są zależne od RFT. Te nieliczne wyniki mogą sugerować, iż NO może funkcjonować jako przekaźnik drugiego rzędu spełniający rolę antyoksydacyjną przy oddziaływaniu promieniowania UV [1].

Metale ciężkie stanowią kolejną grupę czynników stresowych, w reakcję na nie zaangażowany jest NO. Dostępne w chwili obecnej wyniki badań wskazują, że NO w obecności jonów metali ciężkich zwiększa aktywność enzymów antyoksydacyjnych, przede wszystkim dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Wykorzystując techniki mikroskopowe zauważono, że wstępne traktowanie SNP znacząco zredukowało zaindukowaną przez O_2-specyficzną fluorescencję w korzeniach łubinu żółtego traktowanych jonami metali ciężkich [24]. Wyniki sugerują, że antyoksydacyjna funkcja NO może być realizowana przez usuwanie O_2^- z tkanek poddanych stresowi. Podobny efekt został zaobserwowany w kulturach komórkowych soi wystawionych na działanie zielenicy (*Chlorella vulgaris*) traktowanej kadmem i miedzią. Ostatnie doniesienia sugerują, że tlenek azotu łagodzi toksyczny wpływ wywierany przez jony Al^{3+} na wydłużanie się korzeni hibiskusa bagiennego (*Hibiscus moscheutos*) [44, 51].

Zranienie jest pospolitym uszkodzeniem, które występuje w wyniku działania zarówno czynników biotycznych, jak i abiotycznych. W wyniku takiego uszkodzenia nie tylko dochodzi do rozerwania tkanki, lecz także otwarcia drogi do inwazji organizmów patogennych. Uszkodzenie tkanek uruchamia szereg procesów, które potocznie są nazywane reakcją roślin na stres mechaniczny i obejmują: (1) naprawę uszkodzonych tkanek, (2) produkcję substancji, które zapobiegną penetracji uszkodzonej tkanki przez organizmy patogeniczne, (3) uruchomienie szlaku obronnego czy (4) przestawienie metabolizmu na zwiększone zapotrzebowanie na substancje odżywcze.

Wyniki badań pokazują, że szereg hormonów oraz cząsteczek sygnalnych jest zaangażowanych w odpowiedź roślin na zranienie, pośród których NO odgrywa istotną rolę. W hipokotylach ogórka siewnego oraz liściach i warstwie epidermy rzodkiewnika zranienie wywołuje lokalną i bardzo szybką akumulację NO. Mechaniczne uszkodzenie liści *Arabidopsis* wpływa na aktywność NOS i podniesienie stężenia NO. Pojawiły się również dane, że odpowiedź na niektóre rodzaje stresu jest specyficzna gatunkowo. Nie stwierdzono podniesienia poziomu NO w uszkodzonych mechanicznie liściach pomidora i tytoniu, natomiast zranienie liści ziemniaka powoduje usuwanie kalozy oraz wzrost poziomu transkryptu genu *PAL* i ekstensyny. Te same efekty były obserwowane w wyniku podania SNP [40].

WSPÓŁDZIAŁANIE NO Z INNYMI CZĄSTECZKAMI SYGNALNYMI W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRES

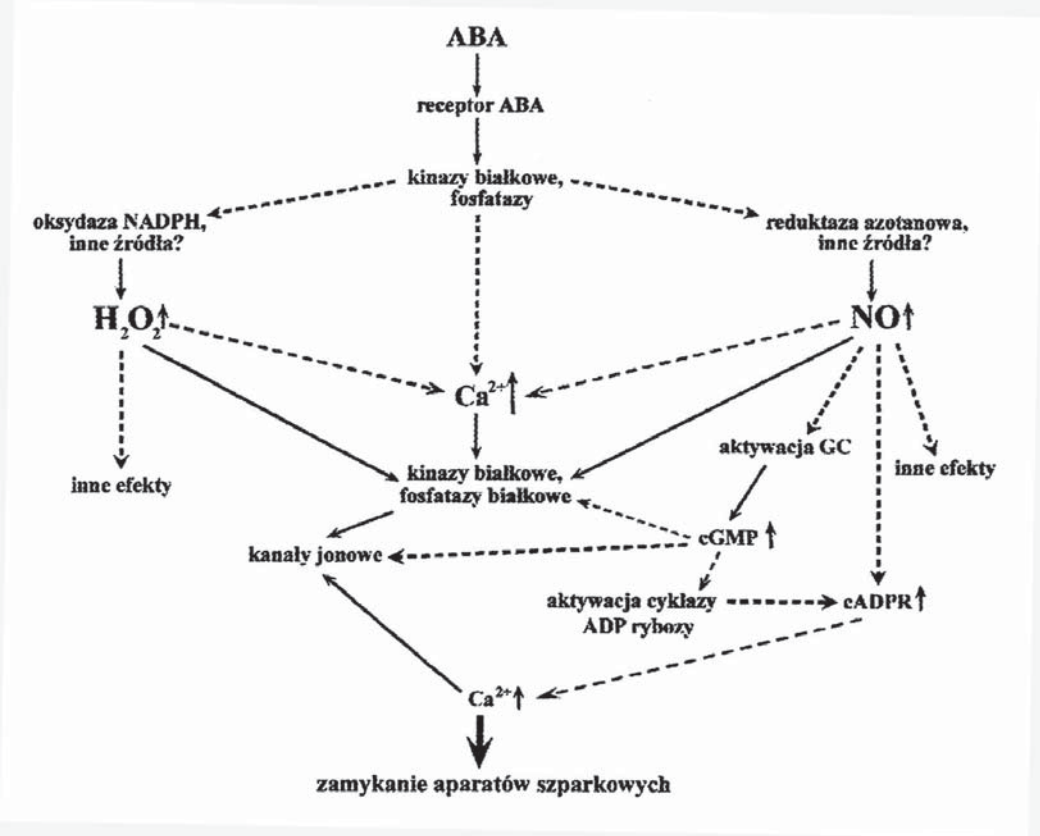
Od kilku lat pojawiają się prace, dotyczące zależności pomiędzy NO a innymi cząsteczkami sygnalnymi, przykładowo pomiędzy NO i auksyną w indukcji tworzenia korzeni, współdziałania NO z etylenem w procesie dojrzewania owoców, interakcji pomiędzy NO i ABA w regulacji ruchów aparatów szparkowych, a także kwasem jasmonowym w reakcji na zranienie [6, 26].

Badania dotyczące mechanizmów sygnalizacji NO w odpowiedzi na czynniki stresowe są prowadzone ze zmiennym powodzeniem od wielu lat. Większość badań była i jest prowadzona na komórkach szparkowych (ryc. 2). Wiadomo, że ABA indukuje zarówno syntezę NO, jak i H_2O_2, a cząsteczki te są zaangażowane w proces regulowanego przez ABA zamykania aparatów szparkowych przez wpływ na regulację kanałów wapniowych. Jednak do tej pory nie udało się stwierdzić, w jaki sposób włączają się one w powyższy proces. Zaobserwowano, że egzogenne podanie H_2O_2 indukuje wzrost stężenia NO w komórkach szparkowych, a procesowi temu towarzyszy aktywność enzymu podobnego do NOS [20, 47]. U *Vicia faba* i *Arabidopsis* zaindukowana zmianami stężenia ABA synteza NO jest zależna od ilości H_2O_2. Usuwanie H_2O_2 z badanego układu przez użycie antyoksydantów lub zahamowanie jego syntezy przez inhibicję aktywności oksydazy NAD(P)H, wpływa hamująco na poziom NO i zamykanie aparatów szparkowych. Analogicznie, usunięcie NO przez aplikację PTIO stymuluje zamykanie szparek indukowane przez H_2O_2 i ABA. W komórkach szparkowych podwójnego mutanta *Atrboh D/F*, który charakteryzuje się obniżoną syntezą H_2O_2, synteza NO jest zredukowana [9].

Pomimo istnienia tak silnych dowodów na indukowaną przez H_2O_2 syntezę NO, istnieją wciąż pewne niezgodności dotyczące tej kwestii. Regulowana przez NO synteza H_2O_2 została opisana w komórkach szparkowych *Vicia faba* [20, 47]. Jednakże prowadząc badania na tym samym materiale inni badacze nie zaobserwowali takiej zależności [9]. Także w komórkach szparkowych *Arabidopsis* tworzenie H_2O_2 nie było zależne od NO. Do tej pory nie wyjaśniono, z czego wynikały te rozbieżności, sugerowano jedynie, że mogą być one przejawem różnic w rodzaju tkanki, jakie wzięto do analiz czy niezauważalnych zmian we wzroście, ponieważ metody wykorzystane do badania były takie same [38].

Analiza elementów biorących udział w transdukcji sygnału i określenie ich lokalizacji w łańcuchu transdukcji jest kluczem do zrozumienia zależności pomiędzy NO i H_2O_2 a regulacją ruchu aparatów szparkowych.

Doświadczenia fizjologiczne z użyciem związków farmakologicznie czynnych sugerują, że białka kinazowe aktywowane mitogenem – MAPK (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinase*) mogą brać udział w zamykaniu aparatów szparkowych



RYCINA 2. Schemat obrazuje współdziałanie NO, ABA i H_2O_2 w ruchach aparatów szparkowych. Ciągła linia – szlaki, których aktywność była eksperymentalnie udowodniona; linia przerywana – prawdopodobne oddziaływania (na podstawie [8], zmodyfikowane)

FIGURE 2. Schematic representation of ABA, H_2O_2 and NO signaling cross-talk in stomatal guard cells. Solid lines represent those signaling pathway for which experimental evidence is available; broken lines indicate predicted pathways (based on [8], modified)

[19]. Wykazano, że H_2O_2 aktywuje MAPK w liściach, kulturach tkankowych i protoplastach *Arabidopsis*. Porównywalnie, SNP, donor NO, także indukuje chwilową aktywację podobnej kinazy [8]. Powyższe dane mogą sugerować, że zarówno ABA, NO, jak i H_2O_2 mogą działać wspólnie na szlaku kinaz MAP w regulacji działania i funkcjonowania aparatów szparkowych. Aktywacja indukowanej przez ABA kinazy OST1 poprzedza pojawienie się H_2O_2 w komórkach szparkowych [37]. Nie wiadomo jednak, czy pojawienie się H_2O_2 musi być poprzedzone indukcją kinazy aktywowanej przez ABA i czy w tym procesie bierze udział NO.

W rozwiązaniu tego problemu pomogła analiza aktywności dwóch fosfataz, tzw. ABI1 i ABI2, które są negatywnymi regulatorami indukowanej przez ABA sygnalizacji w komórkach szparkowych. Badania molekularne dowiodły, że ABI1 działa powyżej, a ABI 2 poniżej miejsca syntezy H_2O_2 w komórkach szparkowych *Arabidopsis* [36]. Wyniki te są jednak sprzeczne z danymi uzyskanymi podczas analizy mutantów *abi1-1* i *abi2-1*, niewrażliwych na ABA [44]. W ich przypadku synteza NO jest zależna od ABA, podczas gdy donor NO (SNP) nie indukował zamykania aparatów szparkowych. Wskazywałoby to, że aktywacja obu białek ABI1 i ABI 2 zachodzi już po syntezie NO.

Udowodniono, że z indukowanym przez ABA zamykaniem aparatów szparkowych z całą pewnością wiąże się podniesienie stężenia cytoplazmatycznego wapnia [48]. Synteza i aktywacja cząsteczek odpowiedzialnych za mobilizowanie Ca^{2+} z wewnątrzkomórkowych magazynów, takich jak cADPR, poprzedza ten proces [28]. Zarówno NO, jak i H_2O_2 biorą udział w aktywacji kanałów wapniowych i inaktywacji kanałów potasowych komórek szparkowych *Arabidopsis* i *Vicia faba* [13, 23]. Doświadczenia fizjologiczne z użyciem nikotynamidu, będącego antagonistą syntezy cADPR, wykazały, że indukowane przez ABA i NO zamykanie aparatów szparkowych jest zależne od obecności cADPR w układzie. Jednak do tej pory brak jest danych na potwierdzenie hipotezy, że NO indukuje wzrost stężenia cADPR czy to w komórkach szparkowych, czy innych typach komórek.

W komórkach zwierzęcych NO reguluje syntezę innej cząsteczki sygnalnej, jaką jest cGMP. W komórkach roślinnych NO także bierze udział w zmianach poziomu cGMP [50]. Zależność pomiędzy poziomem cGMP a NO była opisana w wielu procesach i typach komórek, także w komórkach szparkowych. Traktowanie ODQ inhibitorem syntezy cGMP osłabia indukowane przez ABA i NO zamykanie aparatów szparkowych, a proces ten jest odwracany przez wspólne podanie ODQ i niehydrolizującego analoga cGMP (8-Br-cGMP). Traktowanie samym 8-Br-cGMP nie promuje zamykania szparek sugerując, że synteza cGMP jest istotna, lecz niewystarczająca do zamknięcia szparek lub konieczne są zmiany stężenia cGMP, będące wynikiem współdziałania cyklazy guanylanowej odpowiedzialnej za jego syntezę i fosfodiesterazy odpowiedzialnej za jego inaktywację. W przypadku niehydrolizującego analogu, nie dochodzi do jego rozpadu, a wysoki poziom cGMP utrzymuje się w komórce przez dłuższy czas, co może istotnie wpływać na analizowany proces. W przeciwieństwie do cGMP indukowane przez H_2O_2 zamykanie szparek jest hamowane przez ODQ [8], co sugeruje, że H_2O_2 i NO zależą do 2 niezależnych szlaków transdukcji sygnału, w których cGMP odgrywa doniosłą rolę.

Jak wykazano powyżej, istnieje zbieżność pomiędzy syntezą NO i H_2O_2 w regulowanym przez ABA funkcjonowaniu aparatów szparkowych. Wydaje się, że sygnalizacje ABA/H_2O_2 i ABA/NO w aparatach szparkowych nie są zjawiskami występującym tylko u *Arabidopsis* i *Vicia faba*. Są one elementami całej sieci różnych powiązań i mogą działać wspólnie podczas koordynowania ruchów aparatów szparkowych.

PODSUMOWANIE

Intensywne badania nad występowaniem i rolą fizjologiczną tlenku azotu podjęto w wielu ośrodkach badawczych na świecie po wykazaniu, że wykryty w latach 80 śródbłonkowy czynnik rozkurczający naczynia krwionośne jest w rzeczywistości wolnym rodnikiem – NO.

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat obserwuje się znaczący postęp w badaniach metabolizmu i roli NO u roślin. Obecnie coraz więcej wiemy o źródłach uzyskiwania przez rośliny NO oraz sposobach szybkiego usuwania tych reaktywnych cząsteczek z komórek. Znacznie poszerzyła się również wiedza dotycząca procesów, w których udział NO został udowodniony. Wszystkie one wskazują, że NO w komórkach roślinnych jest uniwersalną cząsteczką zaangażowaną w procesy (pato)fizjologiczne.

Badania przebiegają na różnych płaszczyznach i dotyczą, oprócz wymienionych wyżej, również, a może przede wszystkim, poszukiwania związków pomiędzy sygnalizacją NO a innymi szlakami przesyłania sygnałów w komórce. Staje się bowiem coraz bardziej oczywiste, że różne szlaki sygnałowe, które do tej pory były analizowane niezależnie, stanowią sieć przepływu informacji, a NO odgrywa w nich doniosłe znaczenie. Niedawne odkrycie wskazujące, że indukowana przez ABA synteza NO jest zależna od produkcji H_2O_2, jest tego najlepszym dowodem. Pełne poznanie mechanizmów regulujących metabolizm i funkcjonowanie NO stanowić będzie znaczny wkład w zrozumienie ogólniejszych mechanizmów przenoszenia sygnału w komórce roślinnej.

LITERATURA

[1] AN LZ, LIU YH, ZHANG MX. Effect of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 317–326.

[2] BALL L, ACCOTTO GP, BECHTOLD U. Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in *Arabidopsis. Plant Cell* 2004; **16**: 2448–2462.

[3] BETHKE PC, LIBOUREL IG, AOYAMA N, CHUNG YY, STILL DW, JONES RL. The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* 2007; **143**: 1173–1788.

[4] BETHKE PC, LIBOUREL IG, JONES RL. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis. J Exp Bot* 2006; **57**: 517–526.

[5] COHEN MF, MAZZOLA M, YANASAKI H. Nitric oxide research in agriculture: bridging the plant and bacterial realms. W: Rai AK, Takabe T [red] Abiotic stress tolerance in plants. Springer, The Netherlands 2006: 71–90.

[6] CRAWFORD NM, GUO FQ. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci* 2005; **10**: 195–200.
[7] DELLEDONNE M. NO news is good news for plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 390–396.
[8] DESIKAN R, CHEUNG MK, BRIGHT J, HENSON D, HANCOCK JT, NEILL SJ. ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J Exp Bot* 2004; **55:** 205–212.
[9] DONG L, ZHANG X, JIANG J, AN GY, ZHANG LR, SONG CP. NO may function in the downstream of H_2O_2 in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *J Plant Physiol Mol Biol* 2005; **31**: 62–70.
[10] DÜRNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG D. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328–10333.
[11] FLORYSZAK-WIECZOREK J, ARASIMOWICZ M, MILCZAREK G, JELEN H, JACKOWIAK H. Only an early nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defense responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytol* 2007; **175**: 718–730.
[12] GARCIA-MATA C, GAY R, SOKOLOVSKI S, HILLS A, LAMATTINA L, BLATT MR. Nitric oxide regulated K^+ and Cl^- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 11116–11121.
[13] GARCIA-MATA C, LAMATTINA L. Abscisic acid (ABA) inhibits light induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* 2007; **17**: 143–151.
[14] GARCIA-MATA C, LAMATTINA L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiol* 2001; **126:** 1196–1204.
[15] GNIAZDOWSKA A, BOGATEK R. Regulacyjna rola tlenku azotu w kiełkowaniu nasion. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 431–443.
[16] GNIAZDOWSKA A, KRASUSKA U, CZAJKOWSKA K, WIERZBICKA M, BOGATEK R. Tlenek azotu i hemoglobiny roślinne. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 233–250.
[17] GOULD KS, KLINGUER A, PUGIN A, WENDEHENNE D. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ* 2003; **26**: 1851–1862.
[18] GUO FQ, OKAMOTO M, CRAWFORD NM. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 2003; **302**: 100–103.
[19] GUO FQ. CRAWFORD NM. *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* 2005; **17**: 3436–3450.
[20] HE JM, XU H. SHE XP, SONG XG, ZHAO WM. The role and the interrelationship of hydrogen peroxide and nitric oxide in the UVB- induced stomatal closure in broad bean. *Funct Plant Biol* 2005; **32**: 237–247.
[21] HE YK, TANG RH, YI H, STEVENS RD, COOK CW, AHN SM. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 2004; **305**: 1968–1971.
[22] HUANG X, RAD U, DURNER J. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 2002; **215**: 914–923.
[23] KOHLER B, HILLS A, BLATT MR. Control of guard cell ion channels by hydrogen peroxide and abscisic acid indicates their action through alternate signaling pathways. *Plant Physiol* 2003; **131**: 385–388.
[24] KOPYRA M, GWÓŹDŹ EA. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus. Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 1011–1017.
[25] KOPYRA M, GWÓŹDŹ EA. The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stress. *Acta Physiol Plant* 2004; **26**: 459–472.
[26] LAMOTTE O, COURTOIS C, BARNAVON L, PUGIN A, WENDEHENNE D. Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signaling properties of a fascinating molecule. *Planta* 2005; **221**: 1–4.
[27] LAMOTTE O, GOULD K, LECOURIEUX D, SEQUEIRA-LEGRAND A, LEBRUN- GARCIA A, DURNER J. Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol* 2004; **135**: 516–530.
[28] LECKIE CP, MCAINSH MR, ALLEN GJ, SANDERS D, HETHERINGTON AM. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 15837–15842.
[29] LIBOUREL IG, BETHKE PC, DE MICHELE R, JONES RL. Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* 2006; **223**: 813–820.
[30] MAŁECKA A, TOMASZEWSKA B. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 311–325.
[31] MAŁOLEPSZA U. Biosynteza tlenku azotu w roślinach. *Post Biochem* 2007; **53**: 263–271.
[32] MISHINA TE, LAMB C, ZEIER J. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis. Plant Cell Environ* 2007; **30**: 39–52.

[33] MODOLO LV, AUGUSTO O, ALMEIDA IM, MAGALHAES JR, SALGADO I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae. FEBS Lett* 2005; **579**: 3814–3820.
[34] MODOLO LV, AUGUSTO O, ALMEIDA IM, PINTO-MAGLIO CAF, OLIVEIRA HC, SELIGMAN K. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae. Plant Sci* 2006; **171**: 34–40.
[35] MOREAU M, LEE GI, WANG Y, CRANE BR, KLESSIG DF. AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2008; **283**: 32957–32967.
[36] MURATA Y, PEI ZM, MORI IC, SCHROEDER J. Abscisic acid activation of plasma membrane Ca^{2+} channels in guard cells requires cytosolic NAD(P)H and is differentially disrupted upstream and downstream of reactive oxygen species production in *abi1-1* and *abi2-1* protein phosphatase 2C mutants. *Plant Cell* 2001; **13**: 2513–2523.
[37] MUSTILLI AC, MERLOT S, VAVASSEUR A, FENZI F, GIRAUDAT J. *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 2002; **14**: 3089–3099.
[38] NEILL S, BARROS R, BRIGHT J, DESIKAN R, HANCOCK J, HARRISON J. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J Exp Bot* 2008; **59**: 165–176.
[39] NEILL S, BRIGHT J, DESIKAN R, HANCOCK J, HARRISON J, WILSON I. Nitric oxide evolution and perception. *J Exp Bot* 2008; **59**: 25–35.
[40] PARIS R, LAMATTINA L, CASALONGUE CA. Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiol Biochem* 2007; **45**: 80–86.
[41] PAWŁOWICZ I. Fizjologiczna i molekularna odpowiedź rośliny na stres dehydratacyjny. *Post Biol Kom* 2003; **30**: 201–213.
[42] PEDROSO MC, MAGALHAES JR, DURZAN D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci* 2000; **157**: 173–180.
[43] PERAZZOLLI M, POMERO-PUERTAS MC, DELLEDONNE M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *J Exp Bot* 2006; **57:** 479–488.
[44] QIAO W, FAN L-M. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* 2008; **50**: 1238–1246.
[46]SAKIHAMA Y, NAKAMURA S, YAMASAKI H. Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol* 2002; **43**: 290–297.
[47] SHE XP, SONG XG, HE JM. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba. Acta Bot Sin* 2004; **46**: 1292–1300.
[48] SONG W-Y, ZHANG Z-B, SHAO H-B, GUO X-L, CAO H-X, ZHAO H-B, FU Z-Y, HU X-J. Relationship between calcium decoding elements and plant abiotic-stress resistance. *Int J Biol Sci* 2008; **8:** 116–125.
[49] SZMIDT-JAWORSKA A, JAWORSKI K, KOPCEWICZ J.The involvement of cyclic GMP in phytochrome-controlled flowering of *Pharbitis nil. J Plant Physiol* 2008 **165**: 858–967.
[50] SZMIDT-JAWORSKA A, JAWORSKI K, KOPCEWICZ J. Effect of light on soluble guanylyl cyclase activity in *Pharbitis nil* seedlings. *J Photochem Photobiol B: Biol* 2009; **93**: 9–15.
[51] TIAN QY, SUN DH, ZHAO MG, ZHANG WH. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos. New Phytol* 2007; **174**: 322–331.
[52] TISCHNER R, PLANCHET E, KAISER WM. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana. FEBS Lett* 2004; **576**: 151–155.
[53] UCHIDA A, JAGENDORF AT, HIBINO T, TAKABE T, TAKABE T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 2002; **163:** 515–523.
[54] VRANOVA E, INZE D, VAN BREUSEGEM F. Signal transduction during oxidative stress. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1227–1236.
[55] WENDEHENNE D, DURNER J, KLESSIG DF. Nitric oxide: a new player in plant signaling and defence responses. *Curr Opin Plant Biol* 2004; **7**: 449–455.
[56] WENDEHENNE D, GOULD K. LAMOTTE O, VANDELLE E, LECOURIEUX D, COURTOIS C. NO signaling functions in the biotic and abiotic stress responses. W: Blume Y [red] Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation. Nitric Oxide and Cell Death in Plants, Amsterdam, The Netherlands IOS Press 2006: 190–198.

[57] XING H, TAN L, AN L. ZHAO Z, WNG S, ZHANG C. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. *Plant Growth Regul* 2004; **42**: 61–68.
[58] XU YC, ZHAO BL. The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 833–838.
[59] YAMASAKI H. The NO world for plants: achieving balance in an open system. *Plant Cell Environ* 2005; **28**: 78–84.
[60] YANASAKI H. Nitric oxide research in plant biology: its past and future. W: Magalhaes JR, Singh RP, Passos LP [red] Nitric oxide signaling in higher plants. Studium Press, LLC, Houston, USA 2004: 1–23.
[61] ZEMOJTEL T, FROHLICH A, PALMIERI MC, KOLANCZYK M, MIKULA I, WYRWICZ LS. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 524–525.
[62] ZHANG F, WANG Y, YANG Y, WU H, DI W, LIU J. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica. Plant Cell Environ* 2007; **30**: 775–785.
[63] ZHANG YY, WANG LL, LIU YJ, ZHANG Q, WEI QP, ZHANG WH. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na^+/H^+ antiport in the tonoplast. *Planta* 2006; **224**: 545–555.
[64] ZHAO L, HE J, WANG X, ZHANG L. Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *J Plant Physiol* 2008; **165:** 182–191.
[65] ZHAO MG, TIAN QY, ZHANG WH. Nitric oxide synthase dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis. Plant Physiol* 2007; **144**: 206–217.
[66] ZHAO MG, ZHAO X, WU YX, ZHANG LX. Enhanced sensitivity to oxidative stress in *Arabidopsis* nitric oxide synthesis mutant. *J Plant Physiol* 2007; **164**: 737–745.
[67] ZOTTINI M, FORMENTIN E, SCATTOLIN M, CARIMI F, LOSCHIAVO F, TERZI M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo. FEBS Lett* 2002; **515**: 75–78.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 30.07. 2009 r.
Przyjęto: 10.09. 2009 r.
Adriana Szmidt-Jaworska
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika,
87-100 Toruń, ul. Gagarina 9
Email:asjawors@umk.pl