Uloga dušikova monoksida u biljaka

Ljubić, Sven

Undergraduate thesis / Završni rad

2013

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:933961

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**



Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET

BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA DUŠIKOVA MONOKSIDA U BILJAKA

ROLE OF NITRIC OXIDE IN PLANTS

SEMINARSKI RAD

Sven Ljubić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

Zagreb, 2013.

POPIS KRATICA:

ABA - apscizinska kiselina

cADPR - ciklička ADP-riboza

cGMP - ciklički gvanozin monofosfat

eNOS - endotelna NO-sintaza

GA - giberelinska kiselina

IAA - indol-3-octena kiselina

iNOS - inducibilna NO-sintaza

L-NAME - L-NG-nitroarginin metil ester

nNOS - neuronska NO-sintaza

ni-NOR - nitrit-NO oksidoreduktaza

NO - dušikov monoksid

NR - nitrat reduktaza

PAL - fenilalanin amonijak-lijaza

PR-1 - protein povezan s patogenezom 1

RUBISCO - ribuloza-1,5-bisfosfat karboksilaza oksigenaza

RYR - rianodinski receptor

SA - salicilna kiselina

sGC - topljiva gvanilil ciklaza

SNP - natrijev nitroprusid

XOR - ksantin oksidoreduktaza

SADRŽAJ

1. UVOD ……..……1

2. SINTEZA DUŠIKOVA MONOKSIDA …….2

3. INTERAKCIJA DUŠIKOVA MONOKSIDA I REAKTIVNIH OBLIKA KISIKA (ROS)…….4

4. UKLANJANJE DUŠIKOVA MONOKSIDA …….……...5

5. PERCEPCIJA NO I PRIJENOS SIGNALA…….…..7

6. ULOGA NO TIJEKOM ŽIVOTNOG CIKLUSA BILJAKA ……9

7. DUŠIKOV MONOKSID I BIOTIČKI STRES ….....11

8. DUŠIKOV MONOKSID I ABIOTIČKI STRES …….12

9. ULOGE NO I ROS U STRESNIM UVJETIMA, TE ANALOGIJA S ANIMALNIM SUSTAVIMA……14

10. LITERATURA ……16

11. SAŽETAK ……...20

12. SUMMARY ……..…21

1. UVOD

Dušikov monoksid (NO) bioaktivna je molekula koja sudjeluje u brojnim i različitim aktivnostima kod filogenetički udaljenih vrsta, ali i uzrokuje oprečne efekte u biološki srodnim sustavima. Prvotno je detektirana u sisavaca kao ključna glasnička molekula kardiovaskularnog, imunološkog i neurološkog sustava u kojima igra regulatornu, signalnu, citoprotektivnu, te citotoksičnu ulogu (Ignarro, 1990; Anbar, 1995).

Razlog svestranosti dušikova monoksida krije se u načinu na koji ostvaruje interakcije sa ciljnim molekulama, sudjelujući prvenstveno u redoks procesima, te snažnim aditivnim mehanizmima (Stamler, 1994). Upravo iz tog razloga proteini koji sadrže metale i tiolne skupine predstavljaju glavne mete za NO. Između ostalih to su signalni proteini, receptori, enzimi, te transkripcijski faktori. Također može stvarati direktne interakcije s molekulom DNA.

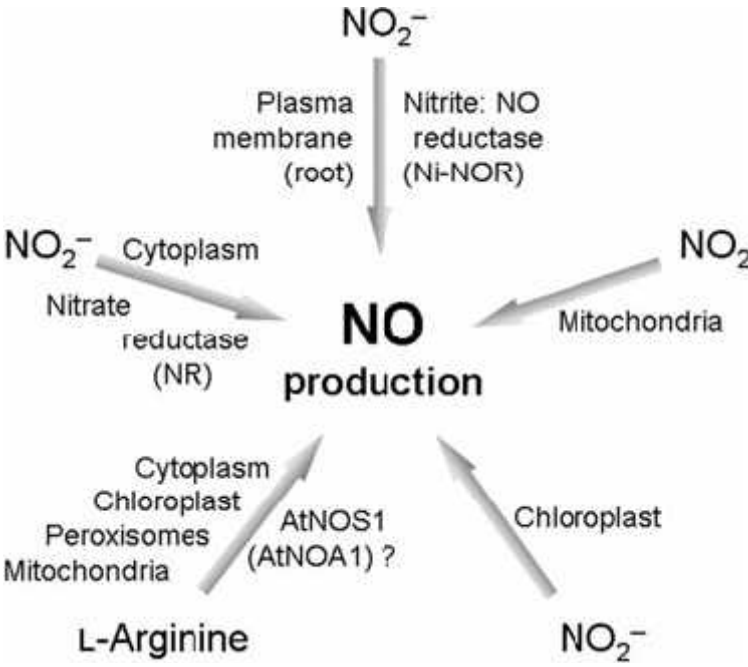
U kemijskom pogledu, NO je mala i vrlo difuzibilna molekula, koja u kratkom vremenskom periodu brzo prolazi kroz stanične membrane, te istovremeno aktivira brojne i različite procese. U tom smislu također može koordinirati i regulirati stanične funkcije mikrosoma (*in vitro*), ali i organela poput mitohondrija.

Sveprisutnost kemijskih reakcija u kojima sudjeluje dušikov monoksid, kao i činjenica da su biokemijski i molekularni mehanizmi brojnih fizioloških procesa visoko očuvani u različitih vrsta, otvorili su mogućnost istraživanja interakcija dušikova monoksida sa brojnim, filogenetski divergentnim, biološkim sustavima. Biljke nisu iznimka. U zadnje vrijeme intenzivno se proučava funkcija dušikova monoksida u biljnim sustavima, koja je dugo bila relativno neistraženo područje. Upotrebom eksperimentalnih metoda iz domena biokemije, molekularne genetike, strukturne biologije, te klasične fiziologije, očekuju se i brojna nova otkrića u narednim godinama.

Istraživanja funkcije dušikova monoksida u biljnim sustavima uglavnom su svedena na tri glavna područja: (i) potraga za NO, odnosno izvorima koji ga generiraju; (ii) proučavanje djelovanja NO korištenjem egzogenih tretmana; te (iii) identifikacija i izolacija molekula analognih spojevima koji sudjeluju u animalnim NO-ovisnim putevima prijenosa signala (npr. cGMP, Ca^{2+}, kalmodulin).

2. SINTEZA DUŠIKOVA MONOKSIDA

Da bi došlo do pravovremene aktivacije jednog ili više NO-ovisnih puteva prijenosa signala potrebna je brza i učinkovita mjesno-specifična sinteza. Iako se dušikov monoksid može stvarati kemijskom katalizom (Neill *et al*., 2003), mnogo je vjerojatnije da nastaje enzimatskom aktivnošću. Prikazan je pregled potencijalnih puteva sinteze dušikova monoksida u biljaka (slika1).



Slika 1. Putevi sinteze dušikova monoksida (NO) u biljnim stanicama (preuzeto iz Wilson *et al*. 2008)

U životinja postoji familija sintaza koju čine konstitutivno eksprimirane eNOS i nNOS, te inducibilna mNOS/iNOS. U sisavaca su u obliku dimernih proteina mase 130-160 kDa, koji kratkim redoks metaboličkim putem konvertiraju L-arginin (preko intermedijera hidroksil-arginina) u L-citrulin pri čemu se simultano otpušta NO. Upravo preko ovoga metaboličkog puta istraživana je vjerojatna homologija s biljnim fiziološkim sustavom. Upotreba molekularnih analoga L-arginina (poput N^G-nitro-L-arginine metil ester (L-NAME) koji efektivno inhibiraju animalne NOS sintaze) u biljnim je sustavima omogućila pretraživanje biljnih homologa navedenih enzima, te njihovu detekciju (Crawford 2006).

Rani dokazi za prisutnost arginin-ovisnih homologa NOS u peroksisomima graška dobiveni su imunokemijskom detekcijom (Del Rio *et al.* 2002), te kemiluminiscencijom i elektromagnetskom rezonancom (Corpas *et al.* 2004). Isti autori su detektirali prisutnost enzimske aktivnosti u korijenu, stabljici i listovima dok je Valderrama *et al.* (2007) dokazao salinitetom induciranu aktivnost u maslinama (transdukcija abiotičkog stresa). Glavni problem predstavljala je identifikacija gena koji kodiraju za navedene enzime, s obzirom na nepostojanje homologa animalnih alela u tada sekvenciranim biljnim genomima.

Analizom homologije genoma puža, Guo, Okamoto & Crawford (2003) predložili su postojanje kodirajućeg gena za NOS u uročnjaku (*Arabidopsis thaliana*) i nazvali ga *AtNOS1*. Daljnjim istraživanjima dokazali su sposobnost genskog produkta da konvertira L-arginin u L-citrulin (insercijski mutant je pokazivao suprimiranu ekspresiju NO). Iako su paralelne studije u početku potvrđivale dobivene rezultate (He *et al.* 2004; Zeidler *et al.* 2004; Bright *et al.* 2006) u zadnje vrijeme isti nisu uspješno reproducirani (Zemojtel *et al.* 2008). Stoga je generalni konsenzus da iako nije NOS u užem smislu, *AtNOS1* predstavlja važan faktor u sintezi i akumulaciji dušikova monoksida. Trenutno nije uspješno kloniran i definitivno identificiran gen koji kodira NOS u domeni biljne fiziologije.

Alternativni izvor biljnog NO rezultat je enzimske aktivnosti nitrat reduktaze (NR). Iako je uglavnom povezan sa asimilacijom dušika, ovaj enzim može stvarati NO iz nitrita u NAD(P)H-ovisnoj reakciji (Dean & Harper 1986; Rockel *et al.* 2002). Uročnjak (*Arabidopsis thaliana*) posjeduje dva gena za NR (*NIA1* i *NIA2*) koji daju vrlo slične proteine (83.5% homologije). Genetičkom analizom dvostrukih mutanata dokazana je uključenost nitrat reduktaze u ABA ovisnoj indukciji NO u stanicama zapornicama puči (Desikan *et al.* 2002). Komparativnom analizom pojedinačnih mutanata utvrđeno je kako glavnu ulogu u dotičnoj ekspresiji ima izoforma kodirana genom *NIA1* (Bright *et al.* 2006), kao odgovor na podražaje koji uzrokuju zatvaranja puči. S obzirom da sudjeluje u signalizacijskim putevima, mora postojati regulacija aktivnosti NR. Istraživanja su pokazala kako je ekspresiju dušikova monoksida putem NR moguće modulirati fosforilacijom konzerviranog serina (Ser_{534} kod uročnjaka) (Rockel *et al.* 2002), odnosno vezivanjem specifičnih transkripcijskih faktora koji reguliraju njegovu proteolizu (Weiner & Kaiser 1999). Inaktivacija navedenih mehanizama dovodi do povišene ekspresije NO. Isti učinak se postiže u uvjetima hipoksije, te prilikom modulacije endogene razine nitrita (Morot-Gaudry-Talarmain *et al.* 2002; Rockel *et al.* 2002).

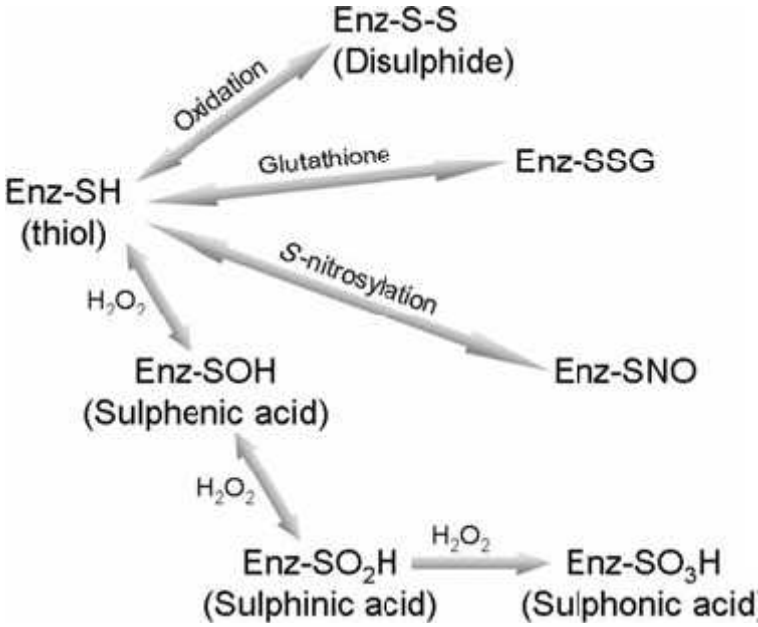
Osim navedenih, u biljaka su pronađeni i alternativni putevi sinteze dušikova monoksida, poput membranske nitrit-NO oksidoreduktaze (Ni-NOR) za koju se smatra da je specifična za korijen (Stohr & Stremlau 2006), te oslobađanja NO u metaboličkim putevima koji se odvijaju u organelima. Primjer je redukcija nitrita u NO posredstvom mitohondrija stanica duhana (Planchet *et al.* (2005), odnosno pretvorba arginina ili nitrita u isti produkt metabolizmom kloroplasta soje (Jasid *et al.* 2006).

3. INTERAKCIJA NO I REAKTIVNIH OBLIKA KISIKA (ROS)

Poput dušikova monoksida, postoje i drugi reaktivni spojevi koji sudjeluju u signalizacijskim putevima kod biljaka. Najbolje proučeni su ROS poput superoksidnog aniona (O_2^-) i vodikova peroksida (H_2O_2). Oni se vrlo često, prostorno i metabolički, eksprimiraju u kombinaciji s NO, a postoje i bifunkcionalni enzimi poput XOR (animalna ksantin oksidoreduktaza) sposobni za sintezu oba spoja (Millar *et al.* 1998). ROS i NO izuzetno učinkovito ostvaruju interakcije. Npr. O_2^- i NO spontano reagiraju i daju vrlo toksičan spoj peroksinitrit ($ONOO^-$) na koji su biljne stanice prilično otporne, a koriste ga kao autonomnu signalnu molekulu (Klotz *et al.* 2002; Minetti *et al*. 2002).

ROS mogu direktno snižavati razinu endogenog NO potrebnog za signalizaciju. Iz tog razloga se smatra da je razina ekspresije dušikova monoksida u biljaka veća nego što se mislilo (Vanin *et al.* 2004). ROS također mogu povećati razinu NO stimulirajući aktivnost NO-sintetizirajućih enzima. Jedna takva studija je demonstrirala potrebu za ekspresijom H_2O_2 kao uvjetom za ABA-ovisnu sintezu dušikova monoksida u stanicama zapornicama puči boba (*Vicia faba*), te uročnjaka (Dong *et al.* 2005; Bright *et al.* 2006). Uklanjanjem H_2O_2 pomoću antioksidansa znatno se reducira akumulacija NO, te dolazi do zatvaranja puči (Kwak *et al.* 2003).

Osim navedenih oblika interakcije, postoji još jedan - kompeticija za NO-vezna mjesta. Ovom tendencijom ROS interferiraju sa mehanizmom signalizacije posredovanim dušikovim monoksidom, baziranim na S-nitrozilaciji tiolnih skupina ciljnih proteina. Prikazani su procesi potaknuti spomenutom kompeticijom, koji u konačnici moduliraju NO-signalizaciju (slika 2).



Slika 2. Kompeticija ROS i NO za tiolne skupine ciljnih proteina (preuzeto iz Wilson *et al*. 2008)

4. UKLANJANJE DUŠIKOVA MONOKSIDA

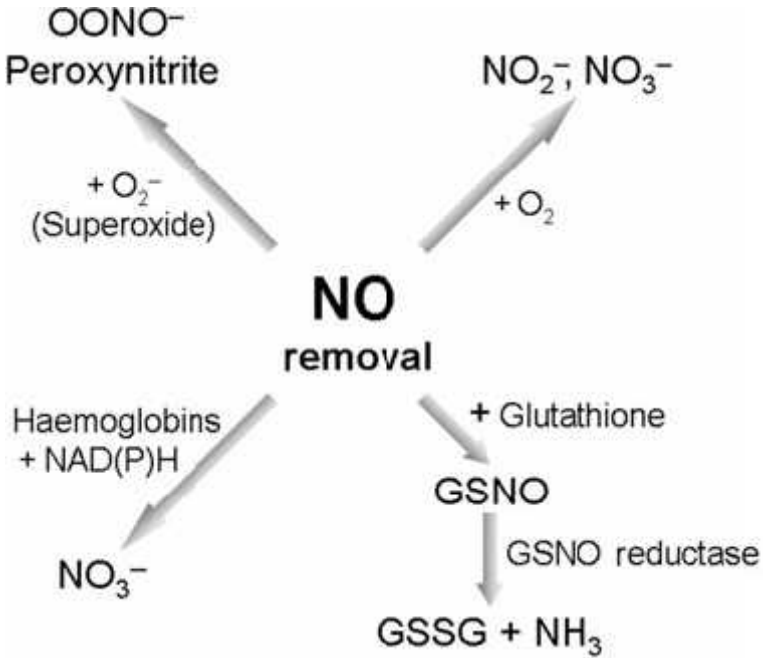
Kako prijenos signala ne bi trajao neograničeno, mora postojati način uklanjanja NO kada se za to stvore uvjeti u stanici. S obzirom da se radi o reaktivnom obliku dušika, NO je inherentno nestabilan, te spremno reagira sa O_2 generirajući pritom nitrit i nitrat. Tako nastali nitrit može biti pretvoren u dodatni NO djelovanjem nitrat reduktaze ili djelovati kao samostalna signalna molekula. U životinja mijenja ekspresiju gena, modulira cGMP signalizaciju, te inhibira aktivnost citokroma P450 (Bryan *et al.* 2005; Gladwin *et al.* 2005; Bryan 2006). Iz navedenoga možemo zaključiti kako uklanjanje samoga NO ne mora nužno zaustaviti prijenos signala i ekvivalentne reakcije, jer produkti poput peroksinitrita i nitrita mogu zadržati aktivnost.

Glutation je tripeptid male molekularne mase koji se u biljnim stanicama može nalaziti u vrlo visokoj koncentraciji (2-3 mM) (Ball *et al.* 2004). Većina je molekula u stanici u reduciranom obliku (GSH), međutim ta ravnoteža je reverzbilna, te se može formirati oksidirano stanje (GSSG). GSH je ključni stanični antioksidans koji održava citoplazmu u reduciranom stanju sa niskim oksidativnim potencijalom (promjena ovoga stanja povezana je sa apoptotskim mehanizmima, Cai & Jones 1998; Kirlin *et al.* 1999). Dušikov monoksid

može reagirati sa GSH i formirati S-nitrozilirani glutation (GSNO) koji tada metabolizira GSNO reduktaza. Ta reakcija ima ulogu u biljnim obrambenim mehanizmima koji se ubrajaju u sistemsku rezistenciju (Rustérucci *et al.* 2007).

Dobro je poznato da NO reagira s hem prostetičkim skupinama raznih proteina. Jedna od važnijih interakcija je ona s hemom guanilil ciklaze, na temelju koje NO modulira puteve prijenosa signala. U kontekstu uklanjanja dušikova monoksida posebnu važnost ima hemoglobin. Nesimbiotski hemoglobini (nsHbs), u NAD(P)H-ovisnoj reakciji, prevode NO u nitrat i tako smanjuju bioraspoloživost (Perazzolli, Romero-Puertas & Delledonne 2006).

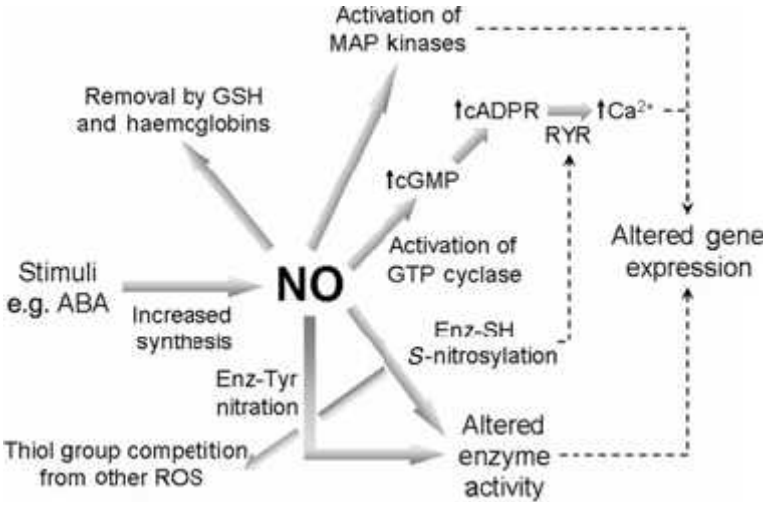
Iz svega navedenog može se zaključiti kako akumulacija dušikova monoksida ne ovisi samo o razini produkcije već i o stopi uklanjanja. Stoga raspoloživa količina NO za staničnu signalizaciju ovisi o ravnoteži između ukupnosti procesa sinteze i eliminacije istog. Opisani su mehanizmi uklanjanja dušikova monoksida (slika 3).



Slika 3. Uklanjanje dušikova monoksida i interakcije sa reaktivnim oblicima kisika (preuzeto iz Wilson *et al.* 2008)

5. PERCEPCIJA NO I PRIJENOS SIGNALA

Biljke definitivno percipiraju i odgovaraju na prisutnost dušikova monoksida, ali sami mehanizmi kojima do toga dolazi i dalje su nerazjašnjeni. Unatoč velikom interesu znanstvene zajednice još uvijek nije identificiran specifični biljni receptor za NO, te sukladno tome sami procesi i nizvodne signalne kaskade nisu u potpunosti istražene. S obzirom da je NO vrlo reaktivna molekula, te može reagirati sa i modificirati brojne proteine, vjerojatno postoje brojni kompleksni putevi percepcije i signalizacije koji tek trebaju biti otkriveni. Prikazano je ono što se trenutno zna o biljnoj signalizaciji posredovanoj NO (slika 4).



Slika 4. Pregled potencijalnih NO signalizacijskih mehanizama u biljaka (preuzeto iz Wilson *et al*. 2008)

Ključni faktor u animalnoj NO-signalizaciji je topljiva guanilil ciklaza (sGC), koja, vezanjem NO na svoju hem prostetičku skupinu, podiže razinu biosinteze cGMP-a što za posljedicu ima aktivaciju mnogobrojnih nizvodnih signalizacijskih procesa. Korištenjem farmakoloških inhibitora sGC-e sisavaca u biljaka, pokazano je kako cGMP djeluje nizvodno od ABA-ovisne NO signalizacije za vrijeme zatvaranja puči (Neill *et al.*, 2003). Drugim riječima, i ABA i NO induciraju povišenu biosintezu cGMP-a u biljaka što je dokazano na stomatalno obogaćenim preparatima uročnjaka. Aplikacijom inhibitora sGC (ODQ), odnosno molekularnog „sakupljača“ NO (PTIO), moguće je inhibirati ovaj dio puta prijenosa signala. S obzirom da kod biljaka još uvijek nije identificirana NO-vezna domena guanilil ciklaze, proces kojim NO stimulira biosintezu cGMP nije razjašnjen.

Direktno nizvodno od cGMP djeluje ključni signalni intermedijer, ciklička ADP-riboza (cADPR), koja u animalnim stanicama stimulira otpuštanje Ca^{2+} kroz intracelularni kalcijev kanal reguliran rianodinskim receptorom (RYR) (Wendehenne *et al.* 2001).

Pretpostavlja se da sličan mehanizam djeluje i kod biljaka. Egzogenom aplikacijom cADPR kod duhana dolazi do povećane akumulacije mRNA za fenilalanin amonijak-lijazu (PAL), te proteina vezanog uz patogenezu 1 (PR-1) (Durner *et al.* 1998). Koaplikacijom RYR inhibitora taj se događaj može spriječiti. Akumulacija spomenutih mRNA također je pod kontrolom NO, dok antagonisti cADPR dokazano utišavaju transkripciju (Klessig *et al.* 2000).

NO dokazano povećava razinu slobodnog Ca^{2+} (Durner *et al.* 1998; Garcia-Mata *et al.* 2003) koji zajedno sa cGMP, te cADPR sudjeluje u regulaciji gibanja puči ovisnih o ABA (Garcia-Mata & Lamattina 2002; Neill *et al.* 2003). Ovaj eksperiment ozbiljno sugerira kako su odgovori na NO usko povezani sa signalnom kaskadom u kojoj zajedno sudjeluju cGMP, cADPR i Ca^{2+}. Poput drugih biljnih hormona, NO također aktivira signalne puteve ovisne o MAP-kinazama koji rezultiraju promijenjenom ekspresijom ciljnih gena (Kumar & Klessig 2000; Pagnussat *et al.* 2004).

S-nitrozilacija regulira niz animalnih signalizacijskih procesa, funkcije strukturnih proteina, te metaboličke puteve i smatra se primarnim mehanizmom post-translacijske modifikacije proteina kod životinja (Wang *et al.* 2006), a u zadnje vrijeme pojavljuju se dokazi kako vjerojatno imaju sličnu ulogu i u biljnoj NO-signalizaciji. Medijator proteinske nitrozilacije može biti i GSNO (Wang *et al.* 2006), čija raspoloživost u stanici određuje aktivnost samog procesa. Sukladno tome, biološka aktivnost NO također se može reflektirati u razini postojećeg GSNO. To je posebno važno za signalne puteve vezane uz stres i patogenezu iz razloga što u takvim uvjetima dolazi do porasta razine endogenog NO, te aktivacije S-nitrozilacijskih mehanizama koji tada imaju bitnu regulatornu ulogu.

Među najmanje razjašnjene signalizacijske puteve spada nitracija tirozinskih bočnih ogranaka posredstvom ROS faktora poput $ONOO^-$ aniona (*in vitro*) ili dušikova dioksida (NO_2) (Radi 2004). Valderrama *et al.* (2007.) su pokazali kako u uvjetima solnog stresa (koje prati pojačana sinteza i akumulacija NO) može doći do jake tirozinske nitracije proteina u lišću masline. Pravu biološku važnost nitracije biljnih proteina tek treba otkriti, te objasniti kako kemijski ireverzibilna reakcija može djelovati kao signalizacijski mehanizam.

6. ULOGA NO TIJEKOM ŽIVOTNOG CIKLUSA BILJAKA

Dušikov monoksid ima snažan utjecaj na biljni metabolizam, pa se iz tog razloga na tom području biljne fiziologije provodi sve više istraživanja. Primarna metoda koja se koristi je egzogena aplikacija NO u širokom rasponu koncentracija na što većem broju različitih biljnih uzoraka. Iako popularna, dotična metoda ima i nedostataka. Kako se radi o plinskoj komponenti, NO se dodaje direktno u medij, te određivanje specifične koncentracije unutar biljnog tkiva nije lak i pouzdan zadatak. Također, egzogenim aplikacijama teško je utvrditi radi li se doista o pravom induciranom fiziološkom efektu ili samo o farmakološkom tretmanu.

Upotrebom NO-donorske smjese KNO_2 i KI/H_2SO_4 na brzo rastuće lišće graška (*Pisum sativum)* dobiven je dvostruki učinak (Leshem & Haramaty 1996). Niske mikromolarne koncentracije NO (5×10^{-6} M) uspješno su stimulirale ekspanziju lišća dok na višim koncentracijama takav učinak nije zabilježen. Sličan eksperiment je potvrdio kako dodatkom ekvivalentnih koncentracija NO donora poput natrijeva nitroprusida (SNP), S-nitrozoglutationa i S-nitrozocisteina dolazi do indukcije rasta i elongacije segmenata korijena kukuruza (*Zea mays*) nerijetko i u većoj mjeri od stimulacije sličnom dozom biljnog hormona indol-3-octene kiseline (IAA) (Gouvêa *et al*. 1997). Sukladno tome, dodatkom metilen-plavog koji veže i inaktivira dušikov monoksid, NO-ovisna stimulacija biva inhibirana, dok IAA i dalje uspješno stimulira elongaciju korijenja.

Dušikov monoksid također ima ulogu u senescenciji, te je u lišću graška koje stari pokazano da se eksprimira zajedno s etilenom (Leshem & Haramaty 1996). S druge strane, zabilježene su niže koncentracije NO u zrelom voću i cvjetovima u kojima je započeo proces starenja, u odnosu na mlađe primjerke (Leshem *et al*. 1998). Primjenom egzogenog NO na cvjetove i plodove raznih vrsta, produžio se životni vijek i odgodila senescencija istih, što je autore navelo na zaključak kako su vjerojatno stehiometrijske interakcije dvaju plinova (etilena i dušikova monoksida) ono što determinira hoće li ili neće doći do senescencije.

Dušikov monoksid također utječe na biljne peroksidaze. One sadrže hem pa su stoga pogodne mete za interakciju s NO). Proučavan je metabolički put kojim gvajakol peroksidaza sintetizira lignin koristeći H_2O_2. Dodatkom egzogenog NO, odnosno donora SNP, zabilježena je snižena stopa ksilemske lignifikacije, odnosno inhibicija aktivnosti gvajakol peroksidaze za oko 52%, pri čemu endogena razina vodikova peroksida ostaje nepromjenjena (Ferrer & Ros Barceló (1999).

Brojna istraživanja su pokazala kako NO i ostali dušikovi oksidi uspješno stimuliraju klijanje sjemenki. Npr. sjemenke *Paulownia tomentosa* trebaju duge periode osvjetljenja kako bi proklijale. Međutim, nakon tretmana s 10 mM KNO_3, dovoljan je bio jedan puls crvene svjetlosti za indukciju klijanja (Grubišić & Konjević 1990). Autori smatraju kako u navedenom procesu glavnu ulogu ima redukcija nitratnih spojeva u NO, odnosno da je fitokromom regulirani prekid dormancije usko povezan s promjenom redoks potencijala.

Smatra se da dušikov monoksid vjerojatno sudjeluje i u procesu de-etiolacije (ozelenjavanja). Radi se o nizu fizioloških i biokemijskih promjena kroz koje prolazi izdanak nakon izlaganja sunčevoj svjetlosti s ciljem pripreme za fotosintezu, što uključuje i razvoj kloroplasta iz etioplasta. U jednom eksperimentu proučavani su klijanci pšenice uzgojeni u tami. Nakon kratkog izlaganja svjetlosti zabilježen je trostruki porast sinteze klorofila kod klijanaca tretiranih sa NO u odnosu na kontrolnu skupinu. Razlika je bila još i veća nakon mehaničkog oštećenja tkiva, te gljivične infekcije, što sugerira moguću povezanost između dušikova monoksida, svjetlosti i puteva prijenosa signala u stresnim uvjetima (Beligni & Lamattina 2000).

Elongacija hipokotila i internodija su procesi koji su također pod utjecajem svjetlosti. U tri različite biljne vrste (*Arabidopsis thaliana, Lactuca sativa, Solanum tuberosum*) uzgojene u mraku ili pri niskom intenzitetu svjetlosti, nanomolarne količine NO su znatno reducirale elongaciju navedenih organa (Beligni & Lamattina 2000).

Preklapanje djelovanja dušikova monoksida i biljnih hormona IAA i GA, otvara pitanje ima li i on hormonska svojstva. Da bismo dobili konačan odgovor potrebno je istražiti još više potencijalnih funkcija NO u biljaka, moguće mehanizme djelovanja, te funkcionalne odnose s receptorima biljnih hormona. Procesi biljnog metabolizma u kojima sudjeluje dušikov monoksid i usporedba s utjecajem biljnih hormona sumarno su prikazani u tablici 1.

Tablica 1. Utjecaj NO na različite faze biljnog razvoja, te preklapanje s utjecajima biljnih hormona (preuzeto i prilagođeno iz Beligni & Lamattina 2001)

Proces	Utjecaj NO	Djelovanje hormona
Rast i diferencijacija	Niska conc. : indukcija (rast listova i korijena) Visoka conc. : inhibicija rasta	Indukcija: auksini i citokinini
Senescencija	Odgoda starenja	Stimulacija: etilen
Klijanje sjemenki	Stimulacija klijanja	Stimulacija: giberelini
De-etiolacija	Stimulacija ozelenjavanja	Stimulacija: giberelini i citokinini
Elongacija hipokotila	Inhibicija elongacije	Inhibicija: giberelini

7. DUŠIKOV MONOKSID I BIOTIČKI STRES

Sposobnost djelovanja dušikova monoksida kao anti-stresnog faktora proučavana je na različitim biljnim vrstama izloženima biotičkom stresu (napadu patogena). Tretiranjem gomolja krumpira donorom dušikova monoksida NOC-18 (1-10 mM) dolazi do nakupljanja fitoaleksina rishitina, endogene obrambene tvari. Komponente stijenki hifa gljivice *Phytophthora infestans* također stimuliraju akumulaciju rishitina, te pokazuju aditivni efekt sa NOC-18. S obzirom da tretmani spojevima koji vežu i inaktiviraju NO nisu inhibirali indukciju fitoaleksina uzrokovanu komponentama hifa gljivice, vjerojatno se radi o paralelnim putevima prijenosa signala (Noritake *et al*. 1996).

Niske koncentracije (10-100 µM SNP) NO održavaju razinu intaktnog klorofila u lišću krumpira zaraženog istim patogenom (Beligni *et al*. 1997). Niže koncentracije pokazale su se neučinkovitima, a više su dovele do raspada klorofila. Važna popratna pojava djelovanja donora NO jest porast transkripcije za tri ključna enzima koji sudjeluju u biljnim obrambenim mehanizmima tijekom interakcije s patogenima: fenilalanin amonijak-lijazu (PAL), β-1,3-glukanazu, te gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (Beligni *et al*. 1997).

Interakcije NO i ROS vrlo su izražene i u biljnim i u životinjskim organizmima. Kod interakcija biljaka i patogenih organizama količina ROS je povišena, te pokazuju signalizacijski i toksični učinak (Sutherland 1991; Levine *et al*. 1994). Sukladno tome, NO u određenoj mjeri može suzbiti toksične procese nastale tijekom interakcije krumpira i *P. infestans*, a uzrokovane djelovanjem ROS, poput fragmentacije DNA, curenja iona u međustanične prostore, te u konačnici i smrti same stanice (Beligni & Lamattina 1999).

U duhana inficiranog bakterijom *Pseudomonas solanacearum*, donori NO uspješno su inducirali hipersenzitivan odgovor (HR) (Huang & Knopp 1997), koji karakterizira brza apoptoza biljnih stanica na području infekcije. Posljedica toga je ograničavanje rasta i razvoja patogena, što onemogućava njegovo širenje na druge dijelove biljke. Okidač ovog mehanizma je nagla, sporadična superprodukcija ROS (Hammond-Kosack & Jones 1996). Dodatak NOS-inhibitora blokira HR, te uzrokuje pojavu kloroze i apoptozu što je bilo demonstrirano na lišću *Arabidopsis* (Delledonne *et al*. 1998).

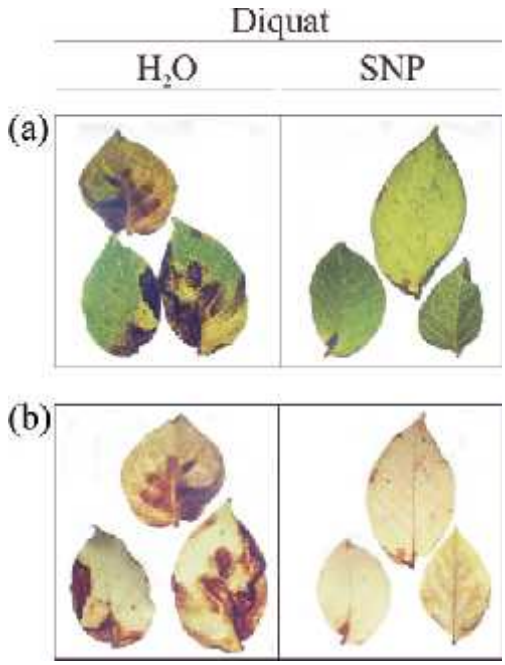
Dodatkom donora NO (ili rekombinantnih NO sintaza) u staničnu suspenziju duhana postiže se uspješna ekspresija proteina povezanog sa patogenezom (PR-1) i PAL, a dolazi i do porasta razine endogene salicilne kiseline (SA), biljne signalne molekule uključene u odgovor na biotički stres. SA stimulira akumulaciju PR-1, ali ne i PAL, što uzrokuje H_2O_2. Takvo opažanje sugerira da je dušikov monoksid uključen u SA-ovisne ali i neovisne biljne obrambene mehanizme (Van Camp *et al*. 1998).

8. DUŠIKOV MONOKSID I ABIOTIČKI STRES

Kao i kod biotičkih, dušikov monoksid se oslobađa i za vrijeme abiotičkih stresnih uvjeta. Tako je detektirana produkcija NO za vrijeme vodnog, te kratkoročnog toplotnog stresa (Leshem & Haramaty 1996; Leshem *et al*. 1998). Kako je većina biljnih odgovora na okolišne stresne signale povezana s porastom endogenog etilena, nameće se hipoteza o odnosu i interakciji NO i etilena, te njihovom sudjelovanju u mehanizmima odgovora na stres.

Međutim, tretiranje lišća graška visokom koncentracijom NO dovelo je do pojave simptoma koji su jasno sugerirali stres (Leshem *et al*. 1998). Upotrebom spoja SNAP koji oslobađa NO, povećava se fluorescencija klorofila što sugerira narušeni prijenos elektrona kroz fotosistem II (PSII), fenomen koji ukazuje na prisutnost stresa. SNAP također uzrokuje porast površinske napetosti dijela lipida tilakoidnih membrana zaduženih za održavanje fluidnosti lipidnog dvosloja (Carruthers & Melchior 1986). Dodatni učinak SNAP jest i inhibicija aktivnosti lipoksigenaza (LOX), heterogene skupine enzima sa regulatornom ulogom u sintezi obrambenih spojeva. Svi ovi rezultati zajedno upućuju da NO, u višim koncentracijama, također može predstavljati stres-inducirajući faktor u biljaka.

U eksperimentu autora Beligni & Lamattina (1999), ROS su umjetno stvoreni tretmanima sa diquatom i paraquatom, herbicidima koji generiraju superoksidne anione (O_2^-) u kloroplastu (Dodge 1994). Niže koncentracije NO (0,1 -1 μM) u određenoj mjeri uspješno su ublažile simptome herbicidnog djelovanja poput gubitka klorofila, curenja iona, nekroze, te otpadanja lišća. Dodatne vrlo štetne posljedice utjecaja diquata, npr. lipidna peroksidacija, gubitak RUBISCO-a i D1 proteina i degradacija mRNA, također su znatno smanjene djelovanjem dušikova monoksida, a narušeni transport elektrona u tilakoidnim membranama vraćen je na standardnu razinu. Svi ovi događaji posljedica su redukcije slobodnih ROS posredstvom NO (slika 5).



Slika 5. Dušikov monoksid (NO) smanjuje količinu reaktivnih oblika kisika (ROS) a) smeđi precipitat na dijelovima listova u kojima je prisutan H_2O_2 b) dekolorizacija sa 100%-tnim etanolom radi bolje vizualizacije (preuzeto iz Beligni & Lamattina 2001)

Dobiveni rezultati sugeriraju da NO ima ulogu i u antioksidativnom staničnom sustavu. Gotovo svi oblici stresnih okolišnih uvjeta, dovode do oksidativnog stresa u biljnim stanicama. U dva odvojena slučaja, NO je uspješno reducirao oksidativni stres izazvan djelovanjem šušnih uvjeta na klijance pšenice, te UV-B radijacije na lišće krumpira, i stoga se smatra relevantnom biljnom anti-stresnom komponentom (García-Mata *et al*. 2000).

9. ULOGE NO I ROS U STRESNIM UVJETIMA, TE ANALOGIJA S ANIMALNIM SUSTAVIMA

Iz dosadašnjih istraživanja, vidljiva je jasna kontradikcija između situacije u kojoj se dušikov monoksid suprotstavlja djelovanju ROS, te one u kojoj djeluju zajedno ili čak sinergistički.

Vrlo izraženo svojstvo NO u životinja je sposobnost da istovremeno ima citotoksične i citoprotektivne uloge („NO paradoks“). NO je reaktivni oblik dušika i stoga može uzrokovati lančane reakcije koje oštećuju stanicu. To se često događa kada se NO pojačano biosintetizira, uglavnom tijekom antimikrobnog djelovanja ili uklanjanja tumorskih stanica posredstvom makrofaga (Nathan 1995).

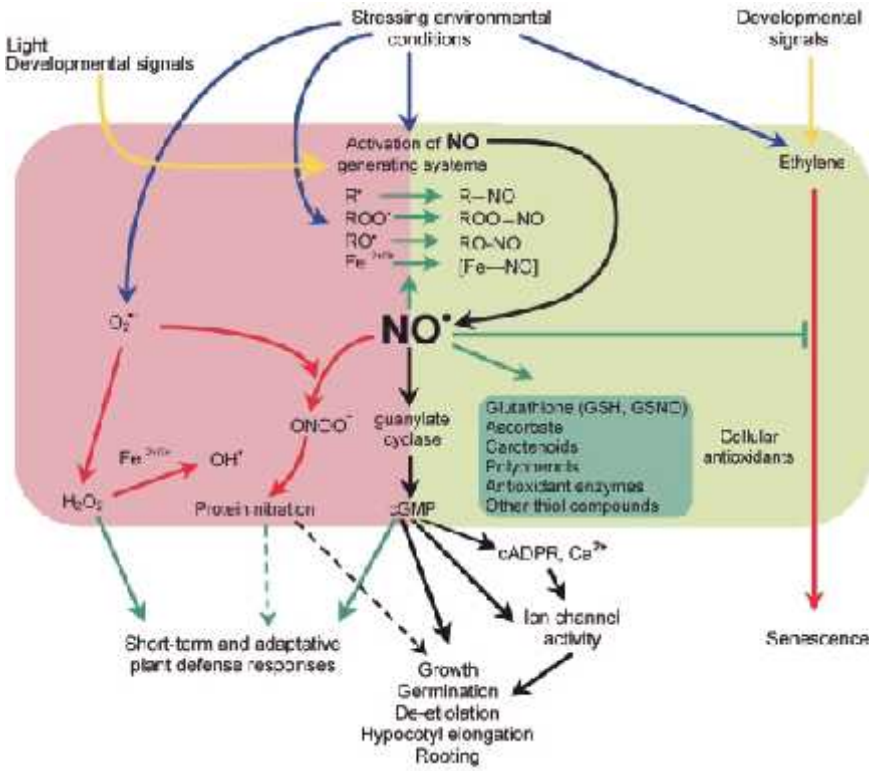
Jedna od najbržih reakcija u biološkim sustavima je interakcija NO s ROS, proces koji može biti vrlo toksičan ili imati zaštitnu ulogu. U životinja, visoke koncentracije NO-donora (npr. 0,5-1 mM SNP) imaju toksični učinak i u kombinaciji s malom količinom superoksidnog aniona (O_2^-) formiraju peroksinitrit ($ONOO^-$) koji narušava strukturu lipida, proteina i DNA (Lipton *et al*. 1993). U ovim situacijama NO može imati zaštitni učinak, prekinuti lanac štetnih reakcija i tako spriječiti dodatna oštećenja.

Dušikov monoksid pokazuje dvojnu ulogu i u signalizacijskim mehanizmima. Tako na primjer, može spriječiti apoptozu određenih stanica sisavaca inhibirajući djelovanje prisutnih kaspaza (Kim *et al*. 1997). Generalno gledano, način na koji NO djeluje ovisi o njegovoj koncentraciji, biološkom sustavu u kojem je prisutan, te mehanizmima prijenosa signala i uvjetima koji vladaju u stanici. Dualnost dušikova monoksida zapravo je posljedica njegove kemijske reaktivnosti, pa se stoga očekuje da je funkcionalno prisutna i u biljaka (Beligni & Lamattina 1999).

Može se zaključiti da nijedna uloga nije isključujuća, odnosno važnija od druge, već, ovisno o uvjetima u stanici, NO može biti letalan, ali stanica može i preživjeti ukoliko dođe do uspostavljanja učinkovitog mehanizma obrane od stresa. Štoviše, hipersenzitivni odgovor i

apoptoza u interakcijama biljaka i patogena smatraju se oblicima obrambenog odgovora, iako postoje organizmi koji ubijaju stanice domaćina da bi preživjeli, te im ovaj mehanizam donekle olakšava posao (McDowell & Dangl 2000). U tom je pogledu NO sličan ROS, jer može biti signal za aktivaciju anti-stresnih mehanizama, dok u isto vrijeme, veće količine mogu drastično oštetiti stanicu (Levine *et al*. 1994).

Kako bismo mogli pravilno interpretirati rezultate djelovanja reaktivnih oblika kisika, te precizno definirati pojedine uloge dušikova monoksida, potrebno je vrlo dobro razumjeti fiziološke mehanizme istraživanih bioloških sustava. S obzirom da niti mehanizam biosinteze, a niti uloga NO u putevima prijenosa signala još nisu u cijelosti istraženi, potrebna su daljnja istraživanja kako bismo dobili potpuniju sliku o navedenim procesima. Prikazani su potencijalni NO-ovisni putovi zaštite i toksičnosti u biljaka (slika 6).



Slika 6. Shematski prikaz djelovanja dušikova monoksida u biljaka (preuzeto iz Beligni & Lamattina 2001)

10. LITERATURA

Anbar M. (1995) Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger. *Experientia* **51,** 545–550.

Ball L., Accotto G.P., Bechtold U. (2004) Evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defence gene expression in *Arabidopsis. The Plant Cell* **16,** 2448–2462.

Beligni M.V. & Lamattina L. (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell and Environment* **24,** 267-278.

Beligni M.V. & Lamattina L. (2000) Nitric oxide induces 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) Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Sciences* **4,** 299–300.

Bryan N.S., Fernandez B.O., Bauer S.M., Garcia-Saura M.F., Milsom A.B.,Rassaf T., Maloney R.E., Bharti A., Rodriguez J. & Feelisch M. (2005) Nitrite is a signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. *Nature Chemical Biology* **1,** 290–297.

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_2O_2 synthesis. *The Plant Journal* **45,** 113–122.

Carruthers A. & Melchior D.L. (1986) How bilayer lipids effect membrane protein activity. *Trends in Biochemical Sciences* **11,** 331–335.

Corpas F.J., Barroso J.B., Carreras A. (2004) Cellular and subcellular localisation of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136,** 2722–2733.

Crawford N.M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **57,** 471–478.

Dean J.V. & Harper J.E. (1986) Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during the *in vivo* nitrate reductase assay. *Plant Physiology* **82,** 718–723.

Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A. & Lamb C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394,** 585–588.

Del Rio L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gomez M. & Barroso J.B. (2002) Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany* **53,** 1255–1272.

Desikan R., Griffiths R., Hancock J. & Neill S.J. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99,** 16314–16318.

Dong L., Zhang X., Jiang J., An G.Y., Zhang L.R. & Song C.P. (2005) NO may function in the downstream of H_2O_2 in ABA-induced stomatal closure in *Vicia faba* L. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* **31,** 62–70.

Dodge A. (1994) Herbicide action and effects on detoxification processes. In *Causes of Photoactive Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants* (eds C.H. Foyer & P.M. Mullineaux), pp. 219–236. CRC, Boca Raton, FL, USA.

Durner J., Wendehenne D. & Klessig D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclicADPribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95,** 10328–10333.

Ferrer M.A. & Ros Barceló A. (1999) Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H_2O_2 production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant, Cell and Environment* **22,** 891–897.

Garcia-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L. & Blatt M.R. (2003) Nitric oxide regulates K+ and Cl- channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100,** 11116–11121.

Garcia-Mata C. & Lamattina L. (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology* **128,** 790–792.

García-Mata C., Beligni M.V. & Lamattina L. (2000) Nitric oxide fights against plant stress.

Gladwin M.T., Schechter A.N., Kim-Shapiro D.B. (2005) The emerging biology of the nitrite anion. *Nature Chemical Biology* **1,** 308–314.

Gouvêa C.M.C.P., Souza J.F., Magalhães A.C.N. & Martins I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* **21,** 183–187.

Grubišic D. & Konjević R. (1990) Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Planta* **181,** 239–243.

Guo F., Okamoto M. & Crawford N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302,** 100–103.

Hammond-Kosack K.E. & Jones J.D.G. (1996) Resistance gene dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8,** 1773–1791.

He Y., Tang R.H., Hao Y. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305,** 1968–1971.

Huang J.S. & Knopp J.A. (1997) Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum* induced hypersensitive reaction in tobacco. In *Proceedings of the Second International Wilt Symposium* (eds P. Prior, J. Elphinstone & C. Allen). INRA,Versailles, France.

Ignarro L.J. (1990) Biosynthesis and metabolism of endothelium derived nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **30,** 535–560.

Jasid S., Simontacchi M., Bartoli C.G. & Puntarulo S. (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology* **142,** 1246–1255.

KimY.-M.,Talanian R.V. & Billiar T.R. (1997) Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* **272,** 31138–31148.

Klessig D.F., Durner J., Noad R. (2000) Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97,** 8849–8855.

Klotz L.O., Schroeder P. & Sies H. (2002) Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways. *Free Radical Biology & Medicine* **33,** 737–743.

Kumar D. & Klessig D.F. (2000) Differential induction of tobacco MAP kinases by the defense signals nitric oxide, salicylic acid, ethylene, and jasmonic acid. *Molecular Plant Microbe Interactions* **3,** 347–351.

Kwak J.M., Mori I.C., Pei Z.M., Leonhardt N., Torres M.A., Dangl J.L., Bloom R.E., Bodde S., Jones J.D. & Schroeder J.I. (2003) NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROSdependent ABA signalling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* **22,** 2623–2633.

Leshem Y.Y., Wills R.B.H. & Veng-Va Ku 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 Physiology and Biochemistry* **36,** 825–833.

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,** 258–263.

Levine A., Tenhaken R., Dixon R. & Lamb C. (1994) H_2O_2 from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell and Developmental Biology* **79,** 583–593.

Lipton S.A.,Yun-Beom Ch., Pan Z.-H., Le S.Z.,Vincent Chen H.- S., Sucher N.J., Loscalzo J., Singel D.J. & Stamler J.S. (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364,** 626–632.

McDowell J.M. & Dangl J.L. (2000) Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences* **25,** 79–82.

Millar T.M., Stevens C.R., Benjamin N., Eisenthal R., Harrison R. & Blake D.R. (1998) Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Letters* **427,** 225–228.

Minetti M., Mallozzi C. & Di Stasi A.M. (2002) Peroxynitrite activates kinases of the src family and upregulates tyrosine phosphorylation signaling. *Free Radical Biology & Medicine* **33,** 744–754.

Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T., Quilleré I., Leydecker M.T., Kaiser W.M. & Morot-Gaudry J.F. (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signalling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215,** 708–715.

Nathan C. (1995) Natural resistance and nitric oxide. *Cell* **82,** 873–876.

Neill S.J., Desikan R. & Hancock J.T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* **159,** 11–35.

Noritake T., Kawakita K. & Doke N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant and Cell Physiology* **37,** 113–116.

Pagnussat G.C., Lanteri M.L., Lombardo M.C. & Lamattina L. (2004) Nitric oxide mediates the indole-acetic acid activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root formation. *Plant Physiology* **135,** 279–286.

Perazzolli M., Romero-Puertas M.C. & Delledonne M. (2006) Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **57,** 479–488.

Planchet E., Gupta K.J., Sonoda M. & Kaiser W.M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* **41,** 732–743.

Radi R. (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101,** 4003–4008.

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*. *Journal of Experimental Botany* **53,** 103–110.

Rustérucci C., Espunya M.C., Díaz M., Chabannes M. & Martínez M.C. (2007) *S*-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically. *Plant Physiology* **143,** 1282–1292.

Stamler J.S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related targets interactions of nitric oxide. *Cell* **78,** 931–936

Stohr C. & Stremlau S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57,** 463–470.

Sutherland M.W. (1991) The generation of oxygen radicals during host plant responses to infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **39,** 79–94.

Valderrama R., Corpas F.J., Carreras A., Fernandez-Ocana A., Chaki M., Luque F., Gomez-Rodriguez M.V., Colmenero-Varera P., Rio L.A. & Barroso J.B. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* **581,** 453–461

Van Camp W., Van Montagu M. & Inzé D. (1998) H_2O_2 and NO: redox signals in disease resistance. *Trends in Plant Sciences* **3,** 330–334.

Vanin A.F., Svistunenko D.A., Mikoyan V.D., Serezhenkov V.A., Fryer M.J., Baker N.R. & Cooper C.E. (2004) Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *Journal of Biological Chemistry* **279,** 24100–24107.

Wang Y., Yun B.W., Kwon E.J., Hong J.K., Yoon J.Y. & Loake G.J. (2006) *S*-nitrosylation: an emerging redox-based posttranslational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* **57,** 1777–1784.

Weiner H. & Kaiser W.M. (1999) 14-3-3 Proteins control proteolysis of nitrate reductase in spinach leaves. *FEBS Letters* **455,** 75–78.

Wendehenne D., Pugin A., Klessig D.F. & Durner J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* **6,** 177–183.

Wilson I. D., Neill S. J. & Hancock J. T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**, 622-631.

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 of the United States of America* **101,** 15811– 15816.

Zemojtel T., Fröchlich A., Palmieri M.C. (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends in Plant Science* **11,** 524–525.

11. SAŽETAK

Poput svih organizama, tako i biljke moraju biti sposobne odgovoriti na široki raspon okolišnih čimbenika. Sukladno tome, pojedinačne biljne stanice trebaju mehanizme primanja podražaja i odgovora na veliki broj unutarnjih i vanjskih signala.

Dušikov monoksid jedna je od signalnih molekula koje biljka aktivno koristi za vrijeme rasta, razvoja i prevladavanja stresnih uvjeta. Dosadašnji eksperimentalni podaci pokazali su da je NO uključen u reproduktivne procese, kontrolu pojedinih etapa životnog ciklusa, te regulaciju fizioloških odgovora poput zatvaranja puči.

Iako su signalizacijski procesi i sama sinteza dušikova monoksida dobro proučeni u animalnim sustavima, u biljaka preostaju brojna neriješena fundamentalna pitanja na koja znanost tek treba dati odgovore.

NO je relativno reaktivna molekula, te stoga nije uvijek jednostavna za istraživanje. Također, njenu biološku aktivnost treba promatrati u kontekstu interakcije s drugim aktivnim spojevima poput reaktivnih oblika kisika (ROS), koji snažno utječu na akumulaciju i funkciju spojeva na koje djeluju.

Postoji znatan interes za daljnjim istraživanjima uloge NO na području biljne fiziologije iz razloga što jedino odgovori koji nedostaju mogu u potpunosti objasniti širok spektar korisnih i štetnih učinaka koje ova molekula izaziva u biljaka.

12. SUMMARY

Like all organisms, plants have to be able to respond to a wide range of environmental factors. Accordingly, single plant cells require perception and responsiveness mechanisms for a variety of inner and outer signals.

Nitric oxide is one of the signal molecules actively used by plants during growth, development and survival of stressful conditions. Recent experimental data has revealed that NO is involved in reproductive processes, control of certain life cycle periods and regulation of physiological responses such as stomatal closure.

Although signalization pathways and mechanisms of nitric oxide synthesis are well studied in animal systems, there still remain many fundamental questions regarding plants that need to be resolved.

NO is a relatively reactive molecule, and thus not always easy to study. Additionally, its biological activity needs to be observed in regard to interaction with other volatile compounds such as reactive oxygen species (ROS), which have the ability to strongly modulate accumulation and function of affected substances.

A great deal of interest remains regarding further explorations of NO role in the domain of plant physiology since only the missing answers can help explain the complex network of reactions leading to adverse or beneficial effects in plants.