ФИЗИОЛОГИЯ РАСТЕНИЙ, 2015, том 62, № 4, с. 459–473

ЛЕКЦИИ В ЖУРНАЛЕ

УДК 581.1

РЕГУЛЯТОРНАЯ РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА У РАСТЕНИЙ

© 2015 г. А. С. Мамаева*, А. А. Фоменков*, А. В. Носов*, И. Е. Мошков*, Л. А. Дж. Мур, М. А. Холл**, Г. В. Новикова***

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН, Москва*

***Институт биологии, экологии и сельского хозяйства, Университет Уэльса, Аберистви, Великобритания*

Поступила в редакцию 14.01.2015 г.

За последние годы получены результаты, позволяющие утверждать, что оксид азота (NO) – внутриклеточная сигнальная молекула, при помощи которой регулируются физиологические процессы на всех этапах жизненного цикла растений. Между тем, некоторые крайне важные аспекты биологии NO далеки от понимания. Так, существуют различные точки зрения в вопросе образования и утилизации NO у растений. Не до конца изучены механизмы восприятия и пути передачи сигнала NO, а также пока нет сведений о том, как обеспечивается специфичность, необходимая для координированного включения ответов на NO. Ответы на сформулированные вопросы представляется целесообразным искать, основываясь на знаниях, полученных при изучении особенностей функционирования NO у животных. Такой сравнительный анализ позволит выявить аналогии и подчеркнуть различия в современном понимании роли NO у растений. Рассмотрению этих аспектов посвящена данная лекция.

Ключевые слова: *растения – оксид азота – модификация белков – передача сигнала – стресс – фитогормоны*

DOI: 10.7868/S0015330315040132

ВВЕДЕНИЕ

Знания последних лет, безусловно, указывают, что оксид азота (NO) – биологически активная молекула, участвующая в регуляции физиологических процессов у представителей разных филогенетических групп. Число исследований биологической роли NO значительно возросло, начиная с конца 1980-х, когда впервые появились сведения о действии NO как вторичного внутриклеточного регулятора сердечнососудистой, нервной и иммунной систем млекопитающих [1]. Эти данные стали основанием для предположения о значимости NO в качестве сигнальной молекулы в клетках животных. Первые сведения о возможной сигнальной роли NO у растений появились в 1998 г. [2, 3].

С этого времени выполнено большое количество работ, результаты которых позволяют утверждать, что NO – внутриклеточная сигнальная молекула, при помощи которой регулируются физиологические процессы на всех этапах жизненного цикла растений. Оксид азота регулирует прорастание семян, рост боковых корней и корневых волосков, цветение и созревание плодов, а также участвует в формировании системы защиты от стрессоров различной природы. Хотя за последние 15 лет достигнуты впечатляющие успехи в изучении NO у растений, некоторые крайне важные аспекты биологии NO далеки от понимания. Так, существуют различные точки зрения в вопросе образования NO у растений, в том числе о том, когда и где образуется NO. Решение этого вопроса в большой степени зависит от того, насколько корректно определено содержание NO в клетках. Сейчас применяется несколько способов определения NO, однако их точность часто вызывает сомнение, особенно в связи с наличием тканевой специфичности синтеза NO. Не до конца изучены механизмы восприятия и пути

Сокращения: CuAO – Cu-аминооксидаза; cPTIO – 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксид; COX – цитохром *c*-оксидаза; DAF – диаминофлуоресцеин; DCF – дихлорофлуоресцеин; GSNO – *S*-нитрозоглутатион; GSNOR – *S*-нитрозоглутатионредуктаза; Ni-NOR – нитрит-NO-редуктаза; NOS – NO-синтаза; NR – нитратредуктаза; nsHb – несимбиотические гемоглобины; SNP – нитропруссид натрия; XOR – ксантиноксидоредуктаза; рГЦ – растворимая гуанилатциклаза.

Адрес для корреспонденции: Новикова Галина Викторовна. 127276 Москва, Ботаническая ул., 35. Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. Факс: 07 (499) 977-80-18; электронная почта: gv.novikova@mail.ru

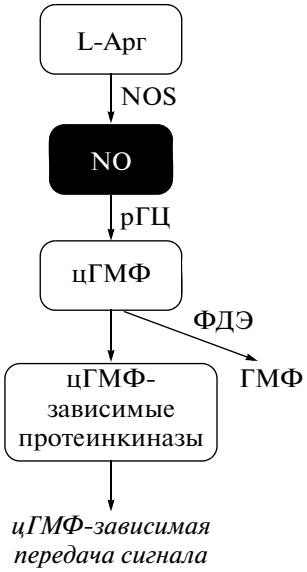


Рис. 1. Канонический путь передачи сигнала NO в клетках животных.
NOS – NO-синтаза; рГЦ – растворимая гуанилатциклаза; ФДЭ – фосфодиэстераза.

передачи сигнала NO, а также пока нет сведений о том, как обеспечивается специфичность, необходимая для координированного включения ответов на NO. На настоящем этапе исследований передачи сигналов NO у растений имеющиеся схемы включают определенную долю спекуляций. Однако такие аспекты, как строгий контроль биосинтеза NO и его утилизации, вероятно, становятся едва ли не ключевыми для объяснения способности NO отвечать за регуляцию у растений самых разнообразных физиологических программ.

Нам представляется целесообразным искать ответы на сформулированные вопросы, основываясь на знаниях, полученных при изучении особенностей функционирования NO у животных. Такой сравнительный анализ позволит выявить аналогии и подчеркнуть различия в современном понимании роли NO у растений.

НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ БИОЛОГИИ ОКСИДА АЗОТА У ЖИВОТНЫХ

Первое упоминание о биологической значимости NO относится еще к середине XIX столетия, когда впервые был синтезирован нитроглицерин, который, как показали дальнейшие исследования, обладал сосудорасширяющими свойствами (см. обзор [4]). Регулярные исследования NO у животных начались в середине 1970-х. Показано, что азид натрия, нитроглицерин и газообразный NO могут активировать гуанилатциклазу с образованием цГМФ [5]. Позднее было установлено, что в ответ на обработку ацетилхолином эндотелиальные клетки выделяли так называемый “эндотелиальный фактор релаксации”. Несколько лет спустя две группы исследователей независимо друг от друга выяснили, что эндотелиальным фактором релаксации является NO, который синтезируется из L-Арг [6–8]. С тех пор возникновение многих заболеваний, в том числе человека, стали связывать с NO, и в настоящее время трудно найти такое заболевание, которое бы не ассоциировалось с нарушением гомеостаза NO. Вероятно, вследствие этого в 1992 г. журнал “Science” назвал NO молекулой года, а в 1998 г. R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad получили Нобелевскую премию по физиологии и медицине за открытие роли NO как сигнальной молекулы в регуляции сердечнососудистой системы.

Оксид азота синтезируется энзиматически различными клетками и тканями. У млекопитающих в результате дезаминирования L-Арг синтазой оксида азота (NO-синтаза или NOS) образуются цитруллин и NO (рис. 1). У животных выделяют три изоформы NOS: нейрональные NOS (nNOS), эндотелиальные NOS (eNOS) и индуцибельные NOS (iNOS) [9]. Все NOS содержат N-концевой оксигеназный и C-концевой редуктазный домены. Оксигеназный домен включает цитохром P450-подобный гем-связывающий центр, а также сайт связывания тетрагидробиоптерина. В составе редуктазного домена присутствуют сайты связывания НАДФ·Н, ФАД и ФМН. Все NOS активны в виде гомодимеров, которые окисляют L-Арг в присутствии НАДФ·Н и кислорода. Активаторами этой реакции могут быть катионы кальция (для nNOS и eNOS), тогда как iNOS конститутивно связывает катионы кальция и кальмодулин.

Кроме NOS ткани млекопитающих могут производить NO посредством восстановления NO_2^- комплексом III или цитохром *c*-оксидазой (комплексом IV) электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий или при помощи ксантиноксидоредуктазы.

Оксид азота, образовавшийся в результате работы NOS, способен диффундировать от места синтеза и взаимодействовать со своей мишенью – растворимой гуанилатциклазой (рГЦ), которая превращает ГТФ в цГМФ и пирофосфат. Чувствительность рГЦ к NO лежит в диапазоне наномолярных концентраций, указывая, что рГЦ – первичная мишень NO [10]. Изоформы рГЦ представляют собой гетеродимеры, состоящие из α ($\alpha1$ или $\alpha2$) и β ($\beta1$) субъединиц; каждая субъединица содержит гем и каталитические домены, отвечающие за синтез цГМФ. Показано, что связывание NO с катионами железа в активном центре рГЦ, ведет к ее существенной активации (почти на два порядка) и росту уровня цГМФ, который, будучи вторич-

ным посредником, вовлекается в различные сигнальные процессы [11].

Образовавшийся цГМФ регулирует работу цГМФ-зависимых протеинкиназ, которые фосфорилируют свои белки-субстраты. Поскольку цГМФ-зависимые протеинкиназы могут транслоцироваться в ядро, то предполагается, что они могут участвовать в активации экспрессии генов [12]. Кроме того, цГМФ может регулировать работу циклонуклеотидзависимых ионных каналов, т.е. влиять на поддержание в клетке баланса катионов калия и кальция. Передача сигнала NO с участием цГМФ терминируется посредством функционирования фосфодиэстераз цГМФ (ФДЭ), которые у млекопитающих составляют многочисленное семейство белков. Таким образом, передача сигнала NO с участием рГЦ (рис. 1), генерирующей цГМФ, который в свою очередь активирует цГМФ-зависимые протеинкиназы, представляет собой канонический путь, регулирующий работу сердечнососудистой и нервной систем, контролирующий релаксацию гладкой мускулатуры, передачу нервного импульса, а также агрегацию тромбоцитов.

В последнее время накопилось много доказательств существенной роли NO у растений. Поскольку животные и растения различаются по организации их тканей и органов, неудивительно, что у растений имеются как сходства, так и особенности биохимии NO. Вместе с тем, следует подчеркнуть, что крайне опрометчиво применять парадигмы, пригодные для клеток животных, при исследовании действия NO на растения. Далее мы покажем, чем отличаются механизмы синтеза, восприятия и передачи сигнала NO у растений и животных.

ОБРАЗОВАНИЕ И УТИЛИЗАЦИЯ ОКСИДА АЗОТА В КЛЕТКАХ РАСТЕНИЙ

Как сказано выше, у животных NO образуется из L-Арг при помощи NOS. В аннотированных геномах растений, в том числе *Arabidopsis thaliana*, отсутствуют гены, гомологичные генам *NOS* животных [13]. Среди фотосинтезирующих организмов только у одноклеточной зеленой водоросли *Ostreococcus tauri* обнаружена функционально активная NOS, которая на 45% гомологична NOS человека [14].

До идентификации NOS у *O. tauri* поиск NOS-зависимого синтеза NO у растений не привел к получению сколько-нибудь значимых результатов. Так, в 2003 г. появилась работа, в которой сообщалось о мутанте *A. thaliana Atnos1* со сниженным синтезом NO [15]. Клонирование мутантного гена показало, что белок AtNOS1 – гомолог NOS *Helix pomatia*. Однако дальнейшие исследования не выявили непосредственного отношения AtNOS1 к синтезу NO [16]. Установлено, что ген *AtNOS1* кодирует ГТФазу, которая напрямую не связана с синтезом NO. Вследствие этого AtNOS1 получил новое название: AtNOA1 (NO-Associated1) [17]. Изучение структуры, возможных функций и внутриклеточной локализации AtNOA1 позволило заключить, что этот белок не только локализован в пластидах, но может участвовать в регуляции синтеза белка в хлоропластах [18]. Нельзя исключить, что пониженная продукция NO у мутантов *Atnos1* – результат нарушений в работе хлоропластов из-за потери AtNOA1 его функций, а хлоропласты могут играть важную роль в регуляции уровня NO в клетках растений.

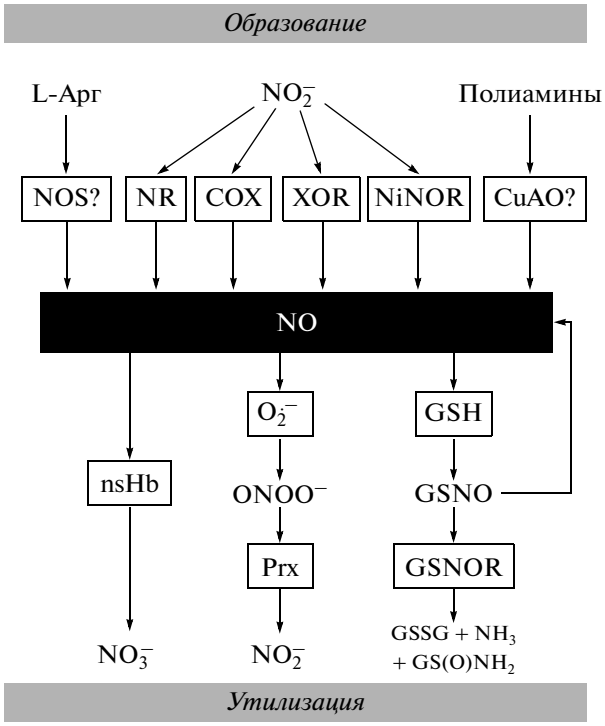


Рис. 2. Пути образования и утилизации NO у растений. CuAO – Cu-аминооксидаза; COX – цитохром *c*-оксидаза; GSH – глутатион; GSNO – S-нитрозоглутатион; GSNOR – *S*-нитрозоглутатионредуктаза; $GS(O)NH_2$ – глутатионсульфинамид; GSSG – глутатиондисульфид; Ni-NOR – нитрит-NO-редуктаза; NOS – NO-синтаза; NR – нитратредуктаза; nsHb – несимбиотические гемоглобины; $ONOO^-$ – пероксинитрит; Prx – пероксиредоксин; XOR – ксантиноксидоредуктаза.

Сейчас известно и/или предполагается несколько способов образования NO у растений (рис. 2). Последовательность биохимических превращений, в результате которых образуется NO, можно разделить на окислительный и восстановительный пути синтеза NO. К окислительному пути относится синтез NO при помощи не идентифицированного NOS-подобного фермента, а также синтез NO из полиаминов. По восстановительному энзиматическому пути NO синтезируется при

помощи нитратредуктазы (NR) или нитрит-NO-редуктазы (Ni-NOR). Кроме того, в этом пути могут работать синтезирующие NO из нитрита пероксисомная ксантиноксидоредуктаза (XOR), а также митохондриальная цитохром *c*-оксидаза (COX). Далее рассмотрим подробнее особенности работы обоих путей синтеза NO у растений.

Окисление полиаминов

Известно, что в ответ на абиотические и биотические стрессоры у растений усиливается синтез полиаминов и увеличивается продукция NO. Обработка проростков *A. thaliana* экзогенными полиаминами также ведет к увеличению выделения NO, а среди исследованных полиаминов спермин наиболее активно стимулирует выделение NO [19]. Физиологическое значение, а также точные биохимические механизмы синтеза NO из полиаминов изучены недостаточно. Однако предполагается, что у *A. thaliana* за синтез NO из полиаминов, образование которых возрастало, например, после обработки растений экзогенной АБК, может отвечать Cu-аминооксидаза (CuAO) [20]. Другой возможный кандидат – участвующая в деградации полиаминов полиаминоксидаза, активность которой снижалась в присутствии ингибитора NOS L-NAME (N(G)-nitro L-arginine methyl ester) [21].

Восстановление нитрита до NO нитратредуктазой

Наиболее хорошо понимаемый и подробно изученный механизм образования NO у растений связан с работой NR, которая локализована в цитоплазме и катализирует реакцию восстановления нитрата до нитрита с использованием НАД·Н в качестве донора электронов. Кроме этой основной реакции, NR может катализировать восстановление нитрита до NO.

У *A. thaliana* NR кодируют два гена *NIA1* и *NIA2*, а ферментативная активность белка контролируется на нескольких уровнях: активность NR увеличивается по мере роста уровня мРНК, при взаимодействии с 14-3-3 белками, а также благодаря посттрансляционным модификациям [22]. При исследовании двойных мутантов *A. thaliana nia1nia2*, у которых и уровень L-Arg, и NR-активность существенно снижены, показано, что NR отвечает за синтез NO при АБК-индуцированном закрывании устьиц [23], дефиците кислорода [24], а также при ответе растений на низкотемпературный стресс [25, 26]. Важно подчеркнуть, что NR участвует в аккумуляции NO не только в ответ на абиотические стрессоры, но также и в ответах на некротрофные патогены [27].

Нельзя забывать, что NR имеет высокую аффинность к нитрату, но может переключаться на использование низкоаффинного субстрата нитрита. Восстановление нитрита NR в нормальных условиях составляет только около 1% от восстановления нитрата, однако оно усиливается в том случае, когда возникает недостаток кислорода, избыток нитрита, а также снижается pH [28]. Таким образом, образование NO при помощи NR можно регулировать на уровне поступления нитрата через нитратные каналы, при помощи посттрансляционной модификации NR, посредством влияния на доступность нитрита и при изменении величины pH и уровня кислорода.

Нитрит-NO-редуктаза (Ni-NOR) катализирует внеклеточное образование NO

Этот фермент локализован в плазматической мембране, в частности клеток корня, и так же, как NR, катализирует восстановление нитрита до NO. Оптимум pH Ni-NOR (~6.1) близок к значениям pH апопласта. Нитрит, произведенный NR, либо поступивший извне, восстанавливается Ni-NOR до NO, который легко проникает в клетку. Описанная последовательность событий, как предполагается, может служить сигналом о доступности нитрата в почве [29].

Цитохром c-оксидаза (COX) восстанавливает нитрит до NO в митохондриях

В митохондриях растительных клеток при гипоксии может наблюдаться синтез NO из нитрита [30]. На выделенных митохондриях растений ячменя и риса установлено, что восстановление нитрита до NO нарушается под действием ингибиторов альтернативной оксидазы, а также ингибиторов комплексов III и IV ЭТЦ митохондрий. Эти данные указывают на вовлеченность ЭТЦ митохондрий в синтез NO [30, 31]. Сейчас принято считать, что одним из основных пунктов синтеза NO в митохондриях является COX.

Ксантиноксидоредуктаза катализирует восстановление нитрита до NO в пероксисомах

Ксантиноксидоредуктаза (XOR), отвечающая у животных за образование NO из нитрита, содержит атом молибдена, ФАД и два Fe_2S_2 центра. Этот фермент кодируется одним геном в форме ксантиндегидрогеназы (XDH), так что в клетках XOR существует главным образом в виде XDH. Однако в результате обратимого окисления аминокислотных остатков Цис и/или ограниченного протеолиза XDH конвертируется в ксантиноксидазу (XOD) [32]. У растений гороха XOR обнаружена в пероксисомах листьев, где преобладающей формой фермента является XOD [33]. У животных при дефиците кислорода в присутствии нитрита XOR катализирует образование NO, ис-

пользуя НАД·Н или ксантин в качестве доноров электронов. В аэробных условиях в присутствии ФАД образуется супероксид-анион радикал, который может реагировать с NO с образованием пероксинитрита. Таким образом, у растений посредством АФК и NO, которые функционируют как сигнальные молекулы, пероксисомы могут обмениваться информацией с другими клеточными компартментами.

Принимая во внимание локализацию перечисленных ферментов, можно заключить, что у растений NO может образовываться в митохондриях, пероксисомах, цитозоле и апопласте. Такое разнообразие ферментов и способов синтеза NO может указывать на возможность тонкой регуляции синтеза и накопления NO при возникновении различных ситуаций в жизни растения.

Рассматривая пути синтеза NO, было бы неправильно не сказать о том, что работы, направленные на поиск у растений ферментов, способных осуществлять Арг-зависимый синтез NO, не потеряли актуальность. Однако подчеркнем, что необходимо критически оценивать получаемые результаты, особенно в тех случаях, когда о синтезе NO судят по количеству цитруллина, который может образовываться как в результате работы NOS, так и аргининсукцинат-лиазы [34].

У растений, как и у других организмов, наиболее значимым резервуаром NO является *S*-нитрозоглутатион (GSNO). Оксид азота может реагировать с глутатионом (GSH) с образованием GSNO, который в свою очередь может снова служить донором NO в клетке (рис. 2). Отметим, что GSNO способен либо спонтанно расщепляться с выделением NO, либо при помощи GSNOR метаболизироваться с образованием окисленного глутатиондисульфида (GSSG), NH_3 и глутатионсульфинамида ($GS[O]NH_2$) [13]. *S*-Нитрозоглутатион может транспортироваться из клетки в клетку, играя у растений роль “транспортного средства” для NO. Важно отметить, что контролируемый *gsnor* уровень GSNO представляет собой способ, посредством которого передача сигнала NO может подавляться, что показано при изучении GSNOR мутантов [13]. Таким образом, одна и та же молекула (GSNO) может служить как средством утилизации, так и вторичным донором NO.

Поскольку содержание NO в тканях зависит не только от скорости образования, но и от эффективности удаления NO, следует рассмотреть альтернативный GSNOR способ утилизации NO (рис. 2).

В детоксикации NO у растений участвуют несимбиотические гемоглобины (nsHb). Они отличаются от леггемоглобинов (идентичность нуклеотидных последовательностей кодирующих их генов не выше 40%), не содержат НАДФ и флавинового доменов (в отличие от флавогемоглобинов бактерий и дрожжей) и обнаруживаются во многих органах растений: корнях, листьях, цветках и симбиотических клубеньках [35]. У растений выделяют три класса nsHb, причем наибольший вклад в утилизацию NO вносят nsHb первого класса. Для этих белков характерно крайне высокое сродство к кислороду (K_M около 2 нМ), что позволяет им выполнять свои функции и в условиях гипоксии. Связанный с кислородом nsHb становится способным реагировать с NO, что приводит к образованию нитрата и метгемоглобина, который затем должен быть восстановлен, например, цитозольной монодегидроаскорбатредуктазой [36].

Таким образом, итоговая концентрация NO в клетке зависит не только от работы путей синтеза NO, но и от его утилизации при помощи nsHb, доступности глутатиона и активности GSNOR. Вместе все эти механизмы позволяют изменять концентрацию, органную и внутриклеточную локализацию, скорость накопления и время жизни NO, что позволяет растениям проявлять весьма разнообразные ответы на NO.

РАСТЕНИЯ И ОКСИД АЗОТА

Наиболее широко известна роль NO при заражении растения бактериями и грибами. Установлено, что при заражении растения образуется NO, причем это справедливо как для биотрофных, так и для некротрофных патогенов. Например, показано образование NO в растениях джута при заражении его некротрофом *Macrophomina phaseolina* [37]. На примере *A. thaliana* исследовано образование NO, индуцированное разными биотрофами: *Golovinomyces orontii*, эффективно поражающим растение, и *Erysiphe pisi*, к которому растения *A. thaliana* устойчивы [27]. Выявлено, что при заражении растения *G. orontii* содержание NO в клетках резко возрастает, после чего довольно быстро возвращается к прежнему уровню, тогда как при заражении *E. pisi* отмечали более продолжительное увеличение количества NO. На основании этих данных авторы [27] высказали соображения о том, что с этим эффектом связана более высокая устойчивость *A. thaliana* к *E. pisi*, чем к *G. orontii*. Они предположили, что сам патоген (*G. orontii*) имеет защитные механизмы, удаляющие NO или ингибирующие его накопление. Для проверки этого предположения они исследовали влияние доноров NO на заражение растений *G. orontii* и наблюдали, что доноры NO замедляют развитие болезни.

При заражении растения NO способен индуцировать работу защитных систем – вплоть до программируемой клеточной смерти, поэтому у некоторых патогенов, например, *Erwinia chrisanthemi*, существуют способы борьбы с накоплением NO. Мы уже отмечали, что за утилизацию NO

в живых системах отвечают гемоглобины (флавогемоглобины бактерий и nsHb растений), которые окисляют NO до NO_3^-. Показано, что нарушение синтеза флавогемоглобина HmpX у бактерий *E. chrisanthemi* приводило к накоплению NO у инфицированного растения. В свою очередь у растения-хозяина наблюдалась реакция гиперчувствительности, что вело к потере бактериями патогенности [38]. Однако в случае заражения растения некротрофами гибель клеток не является помехой для распространения патогена. Возможно, именно поэтому некоторые грибы, например, *M. phaseolina,* способны сами продуцировать значительные количества NO [37].

Известно, что NO может играть важную роль и при абиотическом стрессе. Показано стимулирующее действие NO на закрывание устьиц листьев пшеницы при засухе, которое сопровождалось снижением уровня транспирации и повышением устойчивости растений [39].

Оксид азота необходим для адаптации растений к низким температурам [25]. Судя по тому, что двойной мутант по генам *NR nia1nia2* хуже выдерживал низкие температуры и при этом не продуцировал повышенного количества NO, как это делали растения дикого типа, накопление NO при понижении температуры обуславливает NR.

Адаптация к повышенной концентрации тяжелых металлов также может быть связана с NO. Выявлено, что кинетика накопления NO в корнях пшеницы чувствительного и устойчивого к избытку алюминия сортов различается: в корнях устойчивых растений увеличение концентрации NO наблюдали уже через 3 ч воздействия, тогда как у чувствительных – только через 12 ч. Кроме того, обработка донором NO приводила к уменьшению таких проявлений фитотоксичности алюминия, как укорочение корней, образование каллозы, синтез АФК и накопление МДА у растений обоих сортов [40].

Вместе с тем нельзя обойти вниманием и тот факт, что NO в растении синтезируется не только в ответ на воздействия стрессоров [41–43]. Это означает, что его влияние распространяется гораздо шире одного лишь участия в приспособлении растений к неблагоприятным условиям. На примере томатов показано, что обработка донором NO стимулировала образование и рост боковых корней, ингибируя при этом рост главного корня. При добавлении скавенджера NO – 2-(4-карбоксифенил)-4,4,5,5-тетраметилимидазолин-1-оксил-3-оксида (cPTIO) – обнаруженный эффект снижался [41]. При помощи флуоресцентной микроскопии выявлено локальное увеличение концентрации NO в примордиях боковых корней томатов. Таким образом, NO – внутриклеточный регулятор, влияющий на архитектуру корневой системы, которая становится более короткой и разветвленной [41].

Оксид азота способен модулировать проявление физиологических реакций, зависящих от света. В темноте NO стимулировал прорастание семян салата (*Lactuca sativa*), индуцировал синтез хлорофилла в листьях пшеницы, ингибировал удлинение гипокотилей салата и картофеля [44].

В реализации процесса самонесовместимости при опылении также участвует NO. При самоопылении самонесовместимых растений оливы возрастали концентрации NO и супероксид-анион радикала в пыльцевых зернах, что вызывало образование пероксинитрита, нитрирование белков и программируемую клеточную смерть пыльцевых зерен [43].

Оксид азота может накапливаться и при образовании клубеньков. Например, показано увеличение концентрации NO в образующихся клубеньках *Medicago truncatula*, индуцированных *Sinorhizobium meliloti* [42]. Искусственное снижение концентрации NO в корнях как при помощи cPTIO, так и посредством усиления экспрессии генов бактериальных флавогемоглобинов под контролем специфичного для клубеньков промотора, задерживало образование клубеньков. На основании этих данных можно сделать вывод, что NO необходим и при установлении симбиотических отношений.

Таким образом, NO образуется и выполняет важные регуляторные функции не только при воздействии различных типов абиотического и биотического стресса, но и на разных стадиях развития растительного организма, а также при взаимодействии растения с симбионтами. Следовательно, в онтогенезе растений NO вовлекается в ответы на стрессоры различной природы, но наиболее важно то обстоятельство, что NO – непременный участник реализации физиологических программ и в отсутствие стрессов.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОКСИДА АЗОТА

Подобно всем регуляторам роста растений концентрация NO важна для проявления его действия [45]. В связи с этим актуальной проблемой, требующей внимания, является адекватность применяемых для определения NO методов. Однако почти все подходы, практикуемые в настоящее время, не лишены недостатков.

Одним из наиболее старых способов определения NO является метод, основанный на использовании реактива Грисса. В этом случае NO окисляется до NO_2^-, который реагирует с сульфаниловой кислотой и нафтиламином при низких значениях pH, образуя азокраситель – стабильное водорастворимое вещество с максимумом поглощения

при 540 нм, которое можно определять спектрофотометрически [45, 46]. Чувствительность этого метода невелика, однако может быть повышена путем применения "проточной системы", когда NO, выделяемый растением или культурой клеток, попадает в принимающий сосуд, в котором протекает реакция Грисса, и азокраситель накапливается по мере поступления NO в сосуд [47].

Другим способом измерения концентрации NO является использование оксигемоглобина, который взаимодействует с NO с образованием метгемоглобина, что приводит к смещению максимума поглощения [46]. Предел чувствительности данного метода лежит в области наномолярных концентраций NO, однако его существенным недостатком является способность оксигемоглобина реагировать с АФК, что снижает точность измерения и привносит ошибки в определение содержания NO.

Очень популярным и коммерчески доступным методом определения газообразного NO является хемилюминесцентный метод [45, 46, 48]. Этот метод основан на взаимодействии NO с озоном. В результате этой реакции образуется диоксид азота (NO_2^*), который в возбужденном состоянии испускает фотон в ходе релаксации до основного состояния. Так как каждый фотон соответствует одной молекуле NO, концентрация NO может быть определена путем измерения интенсивности света. Хотя хемилюминесцентный метод не отличается высокой специфичностью, тем не менее, он широко используется благодаря очень высокой чувствительности.

Существуют и другие инструментальные методы измерения NO, например, основанные на использовании лазеров [48]. Две системы, которые часто используются для измерения NO в газовой фазе – это лазерная фотоакустическая детекция (Laser Photoacoustic Detection, LPAD) и настраиваемая диодная лазерная абсорбционная спектроскопия (Tunable Diode Laser Absorption Spectroscopy, TDLAS). Однако ни одна из них сейчас коммерчески не доступна. Обе эти технологии основаны на использовании самой сильной полосы в спектре поглощения NO ($\lambda = 5.3$ мкм). В этих системах применяются CO-газовый лазер, квантовый каскадный лазер (Quantum Cascade Laser, QCL) или межполосный каскадный лазер (Interband Cascade Laser, ICL). В сравнении с другими методами, технологии, основанные на использовании лазеров, напрямую измеряют NO и являются чрезвычайно специфичными.

В LPAD поглощенные NO вспышки лазера приводят к изменениям давления в фотоакустической ячейке, что генерирует звук, который детектируется микрофоном, расположенным внутри ячейки. Для таких LPAD-систем требуются источники света высокой мощности и поэтому они неудобны, тогда как компактные QCL неспособны обеспечить высокую чувствительность определения.

Самый большой потенциал для миниатюризации и коммерциализации имеют TDLAS-системы. Вместе с термоэлектрически охлаждаемым QCL ключевой частью TDLAS-системы является многопроходная абсорбционная ячейка, где свет претерпевает многочисленные отражения между двумя зеркалами, что обеспечивает существенное (до 76 м) увеличения длины светового пути. Такое увеличение оптического пути позволяет определять NO в крайне низкой концентрации и за короткое время измерения.

Каждая из названных систем дает возможность осуществлять многочисленные измерения продукции NO растениями в режиме реального времени, но и у них существуют некоторые важные недостатки. Описанным методом сложно установить взаимосвязь между концентрацией NO в растении и его выделением в атмосферу. Трудно измерить тканеспецифичную генерацию NO и невозможно определить продукцию NO в органеллах.

Наиболее широко применяемый метод определения NO связан с использованием диаминофлуоресцеинов (DAF) – флуоресцентных красителей, которые доступны для исследователей. Красители такой химической природы реагируют с N_2O_3 – продуктом окисления NO. Это приводит к значительному усилению флуоресценции, что позволяет оценить содержание NO. Чувствительность DAF к NO достаточно высока (предел обнаружения до 5 нМ), а также DAF высокоспецифичны в отношении NO, поскольку флуоресценция не усиливается в присутствии NO_2^-, NO_3^-, H_2O_2 и $ONOO^-$ [45, 46].

Модифицированные DAF, а именно DAF-FM, – представляют собой еще более чувствительные флуоресцентные зонды с пределом обнаружения NO ниже 3 нМ. Диацетилированные производные этих красителей используются для определения внутриклеточного содержания NO. Ацетаты отщепляются внутриклеточными эстеразами, после чего краситель становится способным взаимодействовать с N_2O_3 с образованием интенсивно флуоресцирующего продукта. Использование описанных красителей вместе с конфокальной микроскопией дает возможность надежно определять места образования NO, без чего невозможно понять роль NO как в развитии растения, так и при взаимодействии растения и микроорганизма.

Сейчас разработаны новые флуоресцентные зонды, которые пока еще не столь широко используются [45]. Например, родамин B, флуоресценция которого возрастает с ростом продукции NO и его производных. Тот факт, что флуоресценция родамина B может повышаться в присутствии

гидроксильного радикала, ограничивает использование этого красителя для определения NO.

В последние годы широко ведется поиск флуоресцентных зондов, позволяющих определять образующийся в клетках пероксинитрит. Пероксинитрит – производное NO, обладающее свойствами сильного окислителя, при накоплении которого может происходить нитрирование белков. Пероксинитрит образуется в клетке в результате взаимодействия NO и супероксид-анион радикала, поэтому возможность независимого определения концентраций NO, АФК и пероксинитрита представляется крайне важной, хотя и трудно реализуемой задачей. Известно, что ряд флуоресцентных красителей, используемых для определения АФК, в том числе и широко известный дихлорофлуоресцеин (DCFH), также реагируют с пероксинитритом. Несколько лет назад появилось предложение использовать для определения пероксинитрита в растениях новую группу флуоресцентных красителей, содержащих боронаты [49]. Эти соединения напрямую и с 80–85% выходом реагируют с пероксинитритом, но не взаимодействуют ни с супероксид-анион радикалом, ни с NO, что является большим преимуществом боронатов. Однако данные соединения реагируют с пероксидом водорода, хотя гораздо медленнее, чем с пероксинитритом (часы по сравнению с миллисекундами). Следовательно, если экспонировать образец с красителем в течение 10–20 мин, то временем его взаимодействия с пероксидом водорода можно пренебречь. Гораздо более широкое применение для определения пероксинитрита нашли аминофенилфлуоресцеин (APF) и гидроксифенилфлуоресцеин (HPF) в силу их высокой чувствительности и специфичности [50].

В целом флуоресцентные красители находят применение, если необходимо выяснить внутриклеточную локализацию NO/активных форм азота или обнаружить изменения их уровня после различных воздействий и/или при различных состояниях биологической системы. Большим минусом такого подхода является трудность количественной оценки исследуемого вещества в абсолютных единицах, а также зависимость интенсивности флуоресценции и распределения красителя, например, от величины pH. Большое внимание следует уделять также специфичности выбранного красителя и уровню “фоновой” флуоресценции. Так, красители с красной флуоресценцией для фотосинтезирующих тканей могут применяться с большими ограничениями.

Для оценки специфичности действия NO часто используют cPTIO или ингибиторы NOS млекопитающих, которые работают как аналоги Arg. Использование ингибиторов NOS, например, L-NAME или L-NMMA (N(G)-monomethyl L-arginine), при изучении растений представляется не очень корректным, так как NOS у высших растений, как мы уже отмечали, до сих пор не обнаружены. Один из традиционно используемых скавенджеров NO – cPTIO – быстро реагирует с NO с образованием NO_2-радикала и cPTI, стехиометрия этой реакции 2:1. Благодаря этому свойству cPTIO иногда используют и как ЭПР-ловушку для NO. Широкому применению cPTIO способствует и то, что он быстро проникает в клетки. Однако имеются данные о том, что cPTIO также достаточно активно утилизируется клетками [51]. Так, при помощи ЭПР показано, что содержание cPTIO в клетках растений падало в два раза уже за первые 10 мин эксперимента. Эти особенности следует принимать во внимание при использовании cPTIO.

Таким образом, существует несколько наиболее активно используемых в биологических экспериментах подходов для измерения NO, однако каждый из них обладает рядом недостатков. Например, при помощи LPAD и TDLAS можно достоверно и с высокой специфичностью определить NO, выделяемый растением в атмосферу, тогда как количественно оценить накопление NO в отдельных органеллах практически невозможно. Следовательно, выбирая способ определения NO, необходимо учитывать не только селективность метода и недостатки химических агентов, поглощающих NO, но и обращать внимание на особенности объекта исследования, а также на характер решаемых в каждом случае конкретных задач.

ЭКЗОГЕННЫЕ ДОНОРЫ ОКСИДА АЗОТА, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

Необходимость точных измерений продукции NO важна и в связи с широко распространенным использованием химических доноров NO. Существует много коммерчески доступных доноров NO. В качестве доноров NO используются спермидин- или диэтиламин-NONOаты (NONOаты), *S*-нитрозо-*N*-ацетилпеницилламин (SNAP), *S*-нитрозоглутатион (GSNO) и нитропруссид натрия (SNP) [45].

NONOаты состоят из диолатной группы [N(O-)N=O], связанной с первичным или вторичным амином, либо с полиамином через атом азота [52]. Спонтанно расщепляясь при физиологических значениям pH и температурах, NONOаты продуцируют две молекулы NO. Так как эта реакция описывается кинетикой первого порядка, то можно рассчитать скорость образования NO. Время полужизни такого соединения зависит от структуры нуклеофила и составляет от нескольких секунд до нескольких часов.

Довольно часто как донор NO используется SNP [45]. Нитропруссид натрия является фото-

чувствительным соединением, которое разлагается на свету с образованием NO. В отличие от GSNO и SNAP, применение SNP в темноте не приводит к активному выделению NO [53]. Вопреки распространенному мнению, SNP относительно стабилен в физиологических условиях. Однако при использовании SNP в качестве донора NO необходим дополнительный контроль. В качестве контроля следует применять "истощенный донор", то есть раствор, содержащий образовавшиеся на свету продукты разложении SNP, а именно: феррицианид (Fe(III)CN) и ферроцианид (Fe(II)CN), которые работают как генераторы цианида (CN).

В качестве "чистого" донора NO нередко применяется GSNO, поскольку серьезных проблем при его использовании не обнаружено. Действительно, образование NO из GSNO происходит в результате спонтанного гомолитического разрыва S-NO связи у цистеина.

Концентрация NO очень важна для его действия, но было сделано мало попыток оценки кинетики образования NO в растении при использовании доноров NO [45]. Тем не менее, имеется несколько исследований, в которых изучалось образование NO в растениях, обработанных различными донорами NO. Так, обработка растений такими донорами NO, как диэтиламин-NONOат (DEANO) и SNAP, приводила к кратковременному увеличению концентрации NO. Самым короткоживущим донором NO оказался SNAP, время его полужизни не превышало трех часов. В случае GSNO концентрация NO увеличивалась в течение более длительного периода: максимальная концентрация NO достигалась через пять часов, а время полужизни составляло семь часов. Наиболее постоянный характер выделения NO демонстрировал SNP: максимальная концентрация NO достигалась через два часа, а время полужизни было не менее 12 ч [53]. Полученные результаты представляются крайне важными, так как они показывают, насколько внимательно надо подходить к выбору донора NO. Ясно, что используя различные доноры NO, можно моделировать разные ситуации в жизни растения.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ОКСИДА АЗОТА

В исследованиях физиологии животных и растений существенные усилия направлены на решение вопроса о восприятии и передаче сигнала NO. Идея о наличии собственного белкового рецептора/сенсора NO не является новой, так как, например, для этилена – газообразного фитогормона с простым молекулярным строением – белковые рецепторы существуют [54]. Вследствие очень высокой реакционной способности NO его мишенями могут быть многие белки, которые, тем не менее, нельзя рассматривать в качестве рецепторов NO. Наиболее изученной первичной мишенью NO у животных, как уже отмечалось, является рГЦ, отсутствующая у растений. Вместе с тем, было бы несправедливым не сказать, что еще десять лет назад впервые появились сведения о наличии у *A. thaliana* растворимого белка AtGC1 (*Arabidopsis thaliana* Guanylyl Cyclase 1), аминокислотная последовательность которого включает мотивы, характерные для каталитических доменов аннотированных рГЦ цианобактерий, высших и низших эукариот [55]. Структурное сходство AtGC1 и рГЦ стало основанием для поиска ответа на вопрос об участии AtGC1 в NO-зависимом синтезе цГМФ. Результаты тщательно проведенных анализов привели к получению отрицательного ответа: белок AtGC1 не обладает ни чувствительностью к NO, ни способностью связывать NO [55].

В отсутствие сведений о наличии белка-рецептора NO основное внимание уделяется исследованию белков, которые NO модифицирует на посттрансляционном уровне. Биологически значимыми NO-зависимыми посттрансляционными модификациями являются нитрозилирование переходных металлов (Fe, Zn, Cu) в составе белков, ковалентная модификация аминокислотных остатков цистеина – *S*-нитрозилирование, а также нитрирование аминокислотных остатков тирозина (рис. 3) [56]. Эти модификации могут влиять на активность белков, их стабильность, внутриклеточную локализацию и взаимодействие с белками-партнерами, а также на другие посттрансляционные модификации, например, на фосфорилирование белков [57, 58]. Среди белков, способных подвергаться NO-зависимым модификациям, уже выявлены ряд антиоксидантных ферментов (каталаза, пероксидаза, супероксиддисмутаза), белки цитоскелета (α- и β-тубулин, актин 2/7), гистон-связывающие белки (деацетилаза, метилтрансфераза), РБФК/О, H^+-АТФаза, Е3-убиквитин лигаза, ДНК-топоизомераза [57, 59].

Для протекания реакции нитрирования тирозина в клетке важно поддерживать баланс АФК, так как эта реакция происходит не напрямую с NO, а с пероксинитритом ($ONOO^-$) – нитрирующим агентом, который образуется при реакции NO с супероксид-анион радикалом. Пероксинитрит крайне токсичен для клеток животных из-за повреждения липидов и нуклеиновых кислот, тогда как клетки растений, по-видимому, менее чувствительны к пероксинитриту. Пероксинитрит может взаимодействовать с ОН-группой в *орто*-положении ароматического кольца тирозина, что оказывает стерический эффект и изменяет конфигурацию белка. Предполагается, что нитрирование тирозина может, например, блокировать в белке сайты фосфорилирования [60], что в

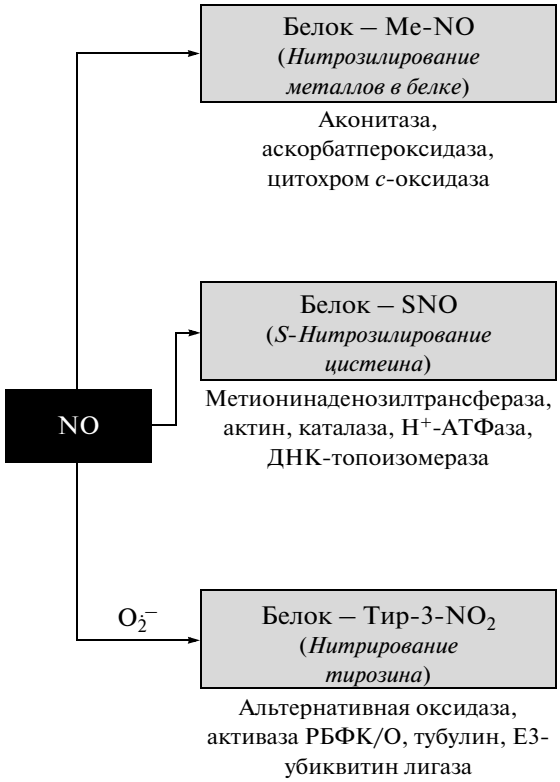


Рис. 3. Биологически значимые посттрансляционные модификации белков, осуществляемые NO в клетках растений.
Перечислены белки, которые подвергаются указанным посттрансляционным модификациям.

свою очередь может вызывать изменения в функционировании протеинкиназ, для которых модифицированные белки являются субстратами. Следует отметить, что не всякий тирозин может подвергаться подобной модификации, поскольку для нитрирования необходимо особое микроокружение тирозина, а также его пространственное расположение в молекуле белка [61]. Наличие в белке металла-кофактора или порфиринового комплекса также увеличивает вероятность такой модификации [62].

В отличие от нитрирования, *S*-нитрозилирование аминокислотных остатков цистеина является обратимым, что вносит дополнительные возможности для регуляции NO "активности" белков [58]. Денитрозилирование может быть как неферментативным (под действием ионов железа и меди, света, температуры, разных восстанавливающих агентов), так и ферментативным, осуществляемым денитрозилазами и транснитрозилазами.

Известно, что в условиях стресса изменяется спектр и увеличивается количество нитрированных и *S*-нитрозилированных белков [60, 63]. Однако стали появляться сведения о наличии таких посттрансляционных модификаций и в нормальных условиях [57, 60, 64]. Большинство NO-модифицируемых белков, идентифицированных к настоящему времени, относятся к ферментам первичного метаболизма, но это может быть связано с несовершенством методов определения, которые не позволяют выявить нитрирование или *S*-нитрозилирование минорных белков. Таким образом, возникает вопрос о значении NO-зависимых посттрансляционных модификаций в качестве физиологических регуляторов работы сигнальных путей.

Наиболее известным примером нитрозилирования атомов металла в молекуле белка может служить активация рГЦ, которая у млекопитающих является наиболее подробно изученной мишенью NO, запускающей цГМФ-зависимый путь передачи сигнала NO. Гомолог этого фермента у растений до сих пор не найден, так что у растений в цепи, связывающей NO и цГМФ, по-прежнему остаются неизвестные звенья [65].

К сказанному следует добавить, что аминокислотные остатки цистеина в белках могут не только нитрозилироваться, но еще и окисляться, и глутионилироваться, причем разным модификациям может подвергаться один и тот же остаток цистеина [66]. Эти обстоятельства, на наш взгляд, необходимо принимать во внимание, обсуждая последствия модификации аминокислотных остатков цистеина в белках, которые могут приводить к дифференциальной регуляции их функциональной активности.

Таким образом, NO-зависимые посттрансляцинные модификации белков являются важнейшим механизмом действия NO, и их изучение может пролить свет на формирование многих эффектов NO в растении.

АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И АЗОТА

Сейчас нет оснований сомневаться, что такие вторичные посредники, как АФК, наряду с фитогормонами могут выполнять функцию внутриклеточных регуляторов. В последние годы стало ясно, что ситуация осложняется влиянием NO, а именно: состояние клетки зависит от баланса между АФК и NO. Например, в одних случаях добавление NO может приводить к программируемой клеточной смерти, а в других, наоборот, работа NO может быть направлена на снижение содержания АФК и "спасение клетке жизни" [67, 68]. Показано, что в ответ на обработку SNP в каллусах *Nitraria tangutorum* увеличивались концентрации пероксида водорода и супероксид-анион радикала, что сопровождалось снижением жизнеспособности клеток [69]. Напротив, обработка листьев *Ipomoea batatas* донором NO ингибировала гибель клеток, вызванную поранением, тогда как cPTIO усиливал клеточную смерть [70].

Пока не очень понятно, каким образом происходит такая регуляция. Действительно, картина осложняется тем, что как NO, так и АФК, во-первых, могут образовываться в разных клеточных компартментах: хлоропластах, митохондриях, пероксисомах, цитоплазме и апопласте [71]. Во-вторых, АФК могут напрямую взаимодействовать с NO с образованием сильного нитрирующего агента. В таком случае возможно, что образующийся супероксид-анион радикал успевает прореагировать с NO до того, как превратиться в пероксид водорода, увеличение содержания которого может стать причиной гибели клеток [72]. В-третьих, образование NO может приводить к нитрированию и *S*-нитрозилированию белков, в том числе антиоксидантной защиты. Поскольку обе названные модификации влияют на энзиматическую активность, то нельзя исключить изменений уровня АФК. Для ряда ферментов метаболизма АФК известна их способность подвергаться NO-зависимым модификациям как *in vivo*, так и *in vitro*. Среди них альтернативная оксидаза, аскорбатпероксидаза, супероксиддисмутаза и каталаза [57, 73, 74]. Следует отметить, что тип NO-зависимой посттрансляционной модификации поразному может сказываться на функционировании белков. Показано, что нитрирование рекомбинантной аскорбатпероксидазы гороха снижало ее ферментативную активность, тогда как *S*-нитрозилирование, наоборот, повышало [75].

С другой стороны, NO может влиять на содержание АФК и посредством изменения экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты. Например, после поранения растений *I. batatas* обработка донором NO ингибировала программируемую клеточную смерть вследствие стимуляции транскрипции Cu/Zn-супероксиддисмутазы и аскорбатпероксидазы [70].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ОКСИДА АЗОТА И ФИТОГОРМОНОВ

Ранее мы рассмотрели работы, результаты которых указывают, что NO участвует в регуляции многих физиологических процессов у растений. Из этого перечисления видно, что NO вовлекается в регуляцию тех программ, которые контролируются фитогормонами – признанными внутриклеточными сигнальными молекулами. Не вызывает сомнений, что фитогормоны, осуществляя свои функции, активно “взаимодействуют” как между собой, так и с другими эндогенными сигнальными молекулами, в том числе с NO.

Охарактеризовать сигнальные функции NO оказалось более сложной задачей, чем предполагалось первоначально. На основании химических свойств NO можно было ожидать необычного механизма восприятия как собственно присутствия NO, так и его уровня. Так, вместо наличия уникального рецептора или нескольких рецепторов (как для газообразного фитогормона этилена) для NO характерно взаимодействие с набором мишеней. Хотя сведения о взаимодействии NO и фитогормонов весьма ограничены, тем не менее совокупность имеющихся данных указывает, что взаимодействие NO и фитогормонов может обеспечиваться при помощи следующих механизмов. Во-первых, NO может модифицировать факторы транскрипции, т.е. влиять на экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в метаболизме фитогормонов, их транспорте или передаче гормональных сигналов. Во-вторых, NO или его производные на посттрансляционном уровне могут модифицировать эти белки. В-третьих, NO или его производные могут напрямую модифицировать фитогормоны (см. обзор [76]).

Поскольку даже для классических фитогормонов пока нельзя нарисовать картину их взаимодействия с NO на всех перечисленных уровнях, то ограничимся теми примерами, которые относятся к разным фитогормонам.

Недавние исследования показали, что NO вмешивается в проявление некоторых эффектов цитокининов, например, в активацию экспрессии гена *CYCD3;1* (циклин D3;1) в ходе стимуляции пролиферации клеток [77]. Синергическое действие NO и цитокининов наблюдали при исследовании старения, программируемой клеточной смерти, адаптации фотосинтетического аппарата к засухе (см. обзор [76]). Показано, что *транс*-зеатин может подвергаться нитрированию как *in vitro*, так и *in vivo*. Преобладающим продуктом такой реакции в физиологических условиях является 8-нитро-*транс*-зеатин, биологическая активность которого ниже, чем биологическая активность *транс*-зеатина [78].

Оксид азота способен модифицировать не только сам цитокинин, но и некоторые компоненты пути передачи его сигнала. Показано, например, что в молекуле фосфотрансмиттера AHP1 (Arabidopsis Histidine Phosphotransfer Protein1) аминокислотный остаток Цис115 может подвергаться *S*-нитрозилированию. По этой причине передача информации о связывании рецепторами цитокинина не происходит, и как результат – ответ на цитокинин не проявляется [79].

Хорошо известно, что у *A. thaliana* АБК индуцирует и закрывание устьиц, и синтез NO в замыкающих клетках. Действительно, в присутствии cPTIO закрывания устьиц под действием АБК не происходило [80], т.е. NO способен вмешиваться в передачу сигнала АБК при регуляции закрывания устьиц. Известно также, что в действие таких абиотических стрессоров, как УФ облучение и озон, АБК вовлечена через посредство NO. Предполагается, что в этом случае вместе с АБК и NO работает еще и пероксид водорода.

Оксид азота может ослаблять эффект АБК, например, при прорастании семян *A. thaliana* [81]. В этом случае NO вызывает понижение концентрации АБК за счет увеличения количества как транскриптов, так и самого белка АБК-8′-гидролазы, отвечающего за катаболизм этого фитогормона.

Установлено, что в корнях растений огурца биосинтез NO индуцируется ауксином, причем NO необходим как для роста главного корня, так и для образования боковых корней [82]. Показано, что присутствие NO необходимо для активации делений в культуре клеток *Medicago sativa* под действием ауксина [83]. Кроме того, NO нарушает акропетальный транспорт ауксина в корнях *A. thaliana* за счет снижения количества белка PIN1 (PIN-formed1) – переносчика ауксина [84]. Сейчас стал понятен механизм, посредством которого NO модулирует передачу ауксинового сигнала. Оказалось, что NO стимулирует передачу сигнала ауксина за счет *S*-нитрозилирования рецептора ауксина белка TIR1 [85].

Имеются сведения, что NO задерживает вызываемую гиббереллином программируемую смерть клеток в алейроновом слое семян [67]. Гибель этих клеток индуцируется АФК, а NO, как предполагается, запускает работу системы антиоксидантной защиты. Другим примером “противодействия” гиббереллинов и NO является фотоморфогенез. Недавно выявлен механизм этого “противодействия”. Оксид азота способствует накоплению белка DELLA, что снижает экспрессию регулируемых гиббереллинами генов. Поскольку деградация DELLA по 26S-протеосомному пути зависит от взаимодействия DELLA с рецептором гиббереллина GID1 (GA Insensitive Dwarf1) и Е3-убиквитинлигазой SLY1 (Sleepy1), то вызванная NO аккумуляция DELLA и снижение уровня SLY1 ведет к дерепрессии регулируемых гиббереллинами генов [86].

Известно, что NO может блокировать некоторые эффекты этилена. Так, при обработке газообразным NO дозревающих плодов персиков наблюдалось снижение выделения этилена и интенсивности дыхания, что замедляло размягчение плодов [87]. В культивируемых клетках *A. thaliana* донор NO GSNO также ингибировал выделение этилена [88]. Далее удалось установить, что по крайней мере *in vitro*, этот эффект NO – результат *S*-нитрозилирования Цис114 в молекуле метионинаденозилтрансферазы1 (MAT1). Эта NO-зависимая модификация вызывала снижение энзиматической активности MAT1, что приводило к снижению синтеза этилена [88].

Таким образом, с одной стороны, NO способен активно вмешиваться в работу путей передачи сигналов всех классических фитогормонов. С другой стороны, от гормонов может зависеть синтез NO. Механизмы такого взаимного влияния различны и работают при регуляции разнообразных процессов в жизни растения, не ограничиваясь только процессами адаптации к стрессовым условиям.

Сейчас имеется много разрозненных фактов, относящихся к синтезу, молекулярным механизмам действия и роли NO у растений, однако все еще невозможно собрать их в единую картину. Хотя объединив отдельные кусочки NO-головоломки, можно утверждать наверняка: NO – важный регулятор жизни растения не только при стрессе, но и в нормальных условиях их роста и развития.

В качестве заключения стоит сказать о результатах самого последнего времени, которые, по нашему мнению, открывают новое направление в исследованиях молекулярного механизма действия NO. Ранее мы говорили о том, что NO-зависимые посттрансляционные модификации белков могут влиять на их стабильность. Авторы работы [89] показали, что в основе механизма восприятия NO может лежать избирательная деградация факторов транскрипции ERF (Ethylene Response Factors) седьмой группы, осуществляемая по правилу N-конца (N-end rule pathway) [90]. Согласно этому правилу, стабильность белка (время его жизни) определяется тем, остаток какой аминокислоты располагается во втором положении молекулы полипептида. Представители ERF седьмой группы *A. thaliana* характеризуются наличием консервативного N-концевого домена, включающего Мет-Цис. В отсутствие NO эти факторы транскрипции стабильны. В присутствии NO происходит *S*-нитрозилирование ERF по аминокислотному остатку Цис2, который после окисления аргинилируется Арг-тРНК протеин-трансферазой, становясь доступным для убиквитинирования, что приводит к деградации ERF. В результате, NO влияет на экспрессию ERF-зависимых генов. Насколько универсальным окажется этот механизм, покажет время. Однако можно не сомневаться, что нас ждут впечатляющие открытия в области изучения молекулярных механизмов действия NO у растений.

Работа выполнена при частичной поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 14-04-00333 для А.В. Носова и А.А. Фоменкова) и Российского научного фонда (грант № 14-24-00020 для Г.В. Новиковой, грант № 14-14-00904 для А.С. Мамаевой).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Palmer R.M., Ferrige A.G., Moncada S.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor // Nature. 1987. V. 327. P. 524–526.
2. *Durner J., Wendehenne D., Klessig D.F.* Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and

cyclic ADF-ribose // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. P. 10 328–10 333.

3. *Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C.* Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance // Nature. 1998. V. 394. P. 585–588.
4. *Marsh N., Marsh A.* A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2000. V. 27. P. 313–319.
5. *Arnold W.P., Mittal C.K., Katsuki S., Murad F.* Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3′:5′-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977. V. 74. P. 3203–3207.
6. *Gryglewski R.J., Palmer R.M., Moncada S.* Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor // Nature. 1986. V. 320. P. 454–456.
7. *Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., Chaudhuri G.* Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. V. 84. P. 9265–9269.
8. *Palmer R.M., Ashton D.S., Moncada S.* Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine // Nature. 1988. V. 333. P. 664–666.
9. *Forstermann U., Sessa W.C.* Nitric oxide synthases: regulation and function // Eur. Heart J. 2012. V. 33. P. 829–837.
10. *Russwurm M., Koesling D.* NO activation of guanylyl cyclase // EMBO J. 2004. V. 23. P. 4443–4450.
11. *Friebe A., Koesling D.* Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase // Circ. Res. 2003. V. 93. P. 96–105.
12. *Casteel D.E., Zhang T., Zhuang S., Pilz R.B.* cGMP-dependent protein kinase anchoring by IRAG regulates its nuclear translocation and transcriptional activity // Cell. Signal. 2008. V. 20. P. 1392–1399.
13. *Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., van Dongen J.T.* On the origins of nitric oxide // Trends Plant Sci. 2011. V. 16. P. 160–168.
14. *Foresi N., Correa-Aragunde N., Parisi G., Calo G., Salerno G., Lamattina L.* Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent // Plant Cell. 2010. V. 22. P. 3816–3830.
15. *Guo F.Q., Okamoto M., Crawford M.J.* Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling // Science. 2003. V. 302. P. 100–103.
16. *Moreau M., Lindermayr C., Durner J., Klessig D.F.* NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? // Physiol. Plant. 2010. V. 138. P. 372–383.
17. *Zemojtel T., Frohlich A., Palmieri M.C., Kolanczyk M., Mikula I., Wyrwicz L.S., Wanker E.E., Mundlos S., Vingron M., Martasek P., Durner J.* Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? // Trends Plant Sci. 2006. V. 11. P. 524–525.
18. *Flores-Perez U., Sauret-Gueto S., Gas E., Jarvis P., Rodriguez-Concepcion M.* A mutant impaired in the production of plastome-encoded proteins uncovers a mechanism for the homeostasis of isoprenoid biosynthetic enzymes in Arabidopsis plastids // Plant Cell. 2008. V. 20. P. 1303–1315.
19. *Tun N.N., Santa-Catarina C., Begum T., Silveira V., Handro W., Iochevet E., Floh S., Scherer G.F.E.* Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings // Plant Cell Physiol. 2006. V. 47. P. 346–354.
20. *Wimalasekera R., Villar C., Begum T., Scherer G.F.* COPER AMINE OXIDASE1 (CuAO) of *Arabidopsis thaliana* contributes to abscisic acid- and polyamine-induced nitric oxide biosynthesis and abscisic acid signal transduction // Mol. Plant. 2001. V. 4. P. 663–678.
21. *Flores T., Todd C.D., Tovar-Mendez A., Dhanoa P.K., Correa-Aragunde N., Hoyos M.E., Brownfield D.M., Mullen R.T., Lamattina L., Polacco J.C.* Arginase-negative mutants of Arabidopsis exhibit increased nitric oxide signaling in root development // Plant Physiol. 2008. V. 147. P. 1936–1946.
22. *Lillo C., Meyer C., Lea U.S., Provan F., Oltedal S.* Mechanisms and importance of post-translational regulation of nitrate reductase // J. Exp. Bot. 2004. V. 55. P. 1275–1282.
23. *Desikan R., Griffiths R., Hancock J., Neill S.* A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. P. 16 314–16 318.
24. *Dordas C., Hasinoff B.B., Rivoal J., Hill R.D.* Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures // Planta. 2004. V. 219. P. 66–72.
25. *Zhao M.G., Chen L., Zhang L.L., Zhang W.H.* Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in Arabidopsis // Plant Physiol. 2009. V. 151. P. 755–767.
26. *Cantrel C., Vazquez T., Puyaubert J., Reze N., Lesch M., Kaiser W.M., Dutilleul C., Guillas I., Zachowski A., Baudouin E.* Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana* // New Phytol. 2011. V. 189. P. 415–427.
27. *Schlicht M., Kombrink E.* The role of nitric oxide in the interaction of *Arabidopsis thaliana* with the biotrophic fungi, *Golovinomyces orontii* and *Erysiphe pisi* // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. doi 10.3389/fpls.2013.00351
28. *Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M.* Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro* // J. Exp. Bot. 2002. V. 53. P. 103–110.
29. *Stohr C., Strube F., Marx G., Ullrich W.R., Rockel P.* A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite // Planta. 2001. V. 212. P. 835–841.
30. *Gupta K.J., Kaiser W.M.* Production and scavenging of nitric oxide by barley root mitochondria // Plant Cell Physiol. 2010. V. 51. P. 576–584.
31. *Stoimenova M., Igamberdiev A.U., Gupta K.J., Hill R.D.* Nitrite-driven anaerobic ATP synthesis in barley and rice root mitochondria // Planta. 2007. V. 226. P. 465–474.
32. *Cantu-Medellin N., Kelley E.E.* Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: insights regarding where, when and how // Nitric Oxide. 2013. V. 34. P. 19–26.
33. *Corpas F.J., Palma J.M., Sandalio L.M., Valderrama R., Barroso J.B., del Rio L.A.* Peroxisomal xanthine oxidoreductase: characterization of the enzyme from pea

(*Pisum sativum* L.) leaves // J. Plant Physiol. 2008. V. 165. P. 1319–1330.

34. *Tischner R., Galli M., Heimer Y.M., Bielefeld S., Okamoto M., Mack A., Crawford N.M.* Interference with the citrulline-based nitric oxide synthase assay by argininosuccinate lyase activity in Arabidopsis extracts // FASEB J. 2007. V. 274. P. 4238–4245.
35. *Hill R.D.* Non-symbiotic haemoglobins: what's happening beyond nitric oxide scavenging? // AoB PLANTS. 2012. doi 10.1093/aobpla/pls004
36. *Igamberdiev A.U., Bykova N.V., Hill R.D.* Scavenging of nitric oxide by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase mediated ascorbate reduction of methemoglobin // Planta. 2006. V. 223. P. 1033–1040.
37. *Sarkar T., Biswas P., Ghosh S.K., Ghosh S.* Nitric oxide production by necrotrophic pathogen *Macrophomina phaseolina* and the host plant in charcoal rot disease of jute: complexity of the interplay between necrotroph–host plant interactions // PLoS ONE. 2014. V. 9. doi 10.1371/journal.pone.0107348
38. *Boccara M., Mills C.E., Zeier J., Anzi Ch., Lamb Ch., Poole R.K., Delledonne M.* Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host // Plant J. 2005. V. 43. P. 226–237.
39. *Garcia-Mata C., Lamattina L.* Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress // Plant Physiol. 2001. V. 126. P. 1196–1204.
40. *Sun Ch., Lu L., Liu L., Liu W., Yu Y., Liu X., Hu Y., Jin Ch., Lin X.* Nitrate reductase-mediated early nitric oxide burst alleviates oxidative damage induced by aluminum through enhancement of antioxidant defenses in roots of wheat (*Triticum aestivum*) // New Phytol. 2014. V. 201. P. 1240–1250.
41. *Correa-Aragunde N., Graziano M., Lamattina L.* Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato // Planta. 2004. V. 218. P. 900–905.
42. *Del Giudice J., Cam Y., Damiani I., Fung-Chat F., Meilhoc E., Bruand C., Brouquisse R., Puppo A., Boscari A.* Nitric oxide is required for an optimal establishment of the *Medicago truncatula–Sinorhizobium meliloti* symbiosis // New Phytol. 2011. V. 191. P. 405–417.
43. *Serrano I., Romero-Puertas M.C., Rodríguez-Serrano M., Sandalio L. M., Olmedilla A.* Peroxynitrite mediates programmed cell death both in papillar cells and in self-incompatible pollen in the olive (*Olea europaea* L.) // J. Exp. Bot. 2012. V. 63. P. 1479–1493.
44. *Beligni M.V., Lamattina L.* Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants // Planta. 2000. V. 210. P. 215–221.
45. *Mur L.A.J., Mandon J., Persijn S., Cristescu S.M., Moshkov I.E., Novikova G.V., Hall M.A., Harren F.J.M., Hebelstrup K., Gupta K.J.* Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge // AoB PLANTS. 2013. V. 5. doi 10.1093/aobpla/pls052
46. *Mur L.A.J., Mandon J., Cristescu S.M., Harren F.J.M., Prats E.* Methods of nitric oxide detection in plants: a commentary // Plant Sci. 2011. V. 181. P. 509–519.
47. *Vitecek J., Reinohl V., Jones R.L.* Measuring NO production by plant tissues and suspension cultured cells // Mol. Plant. 2008. V. 1. P. 270–284.
48. *Cristescu S.M., Persijn S.T., te Lintel Hekkert S., Harren F.J.M.* Laser-based system for trace gas detection in life sciences // Appl. Phys. B. 2008. V. 92. P. 343–349.
49. *Sikora A., Zielonka J., Lopez M., Joseph J., Kalyanaraman B.* Direct oxidation of boronates by peroxynitrite: mechanism and implications in fluorescence imaging of peroxynitrite // Free Radic. Biol. Med. 2009. V. 47. P. 1401–1407.
50. *Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T.* Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 3170–3175.
51. *D'Alessandro S., Posocco B., Costa A., Zahariou G., Lo Schiavo F., Carbonera D., Zottini M.* Limits in the use of cPTIO as nitric oxide scavenger and EPR probe in plant cells and seedlings // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. doi 10.3389/fpls.2013.00340
52. *Miller M.R., Megson I.L.* Recent developments in nitric oxide donor drugs // Brit. J. Pharmacol. 2007. V. 151. P. 305–321.
53. *Floryszak-Wieczorek J., Milczarek G., Arasimowicz M., Ciszewski A.* Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? // Planta. 2006. V. 224. P. 1363–1372.
54. *Merchante C., Alonso J.M., Stepanova A.N.* Ethylene signaling: simple ligand, complex regulation // Curr. Opin. Plant Biol. 2013. V. 16. P. 554–560.
55. *Ludidi N., Gehring C.* Identification of a novel protein with guanylyl cyclase activity in *Arabidopsis thaliana* // J. Biol. Chem. 2003. V. 278. P. 6490–6494.
56. *Astier J., Lindermayr C.* Nitric oxide-dependent post-translational modification in plants: an update // Int. J. Mol. Sci. 2012. V. 13. P. 15 193–15 208.
57. *Lozano-Juste J., Colom-Moreno R., Leon J. In vivo* protein tyrosine nitration in *Arabidopsis thaliana* // J. Exp. Bot. 2011. V. 62. P. 3501–3517.
58. *Marozkina N.V., Gaston B. S*-Nitrosylation signaling regulates cellular protein interactions // Biochim. Biophys. Acta. 2012. V. 1820. P. 722–729.
59. *Astier J., Kulik A., Koen E., Besson-Bard A., Bourque S., Jeandroz S., Lamotte O., Wendehenne D.* Protein *S*-nitrosylation: what's going on in plants? // Free Radic. Biol. Med. 2012. V. 53. P. 1101–1110.
60. *Corpas F.J., Palma J.M., del Rio L.A., Barroso J.B.* Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. doi 10.3389/fpls.2013.00029
61. *Ischiropoulus H.* Protein tyrosine nitration – an update // Arch. Biochem. Biophys. 2009. V. 484. P. 117–121.
62. *Abello N., Kerstjens H.A.M., Postma D.S., Bischoff R.* Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins // J. Proteome Res. 2009. V. 8. P. 3222–3238.

63. *Kato H., Takemoto D., Kawakita K.* Proteomic analysis of *S*-nitrosylated proteins in potato plant // Physiol. Plant. 2013. V. 148. P. 371–386.

64. *Begara-Morales J.C., Chaki M., Sanchez-Calvo B., Mata-Pérez C., Leterrier M., Palma J.M., Barroso J.B., Corpas F.J.* Protein tyrosine nitration in pea roots during development and senescence // J. Exp. Bot. 2013. V. 64. P. 1121–1134.

65. *Baudouin E.* The language of nitric oxide signaling // Plant Biol. 2011. V. 13. P. 233–242.

66. *Spadaro D., Yun B.W., Spoel S.H., Chu C., Wang Y.Q., Loake G.J.* The redox switch: dynamic regulation of protein function by cysteine modifications // Physiol. Plant. 2010. V. 138. P. 360–371.

67. *Beligni M.V., Fath A., Bethke P.C., Lamattina L., Jones R.L.* Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 1642–1650.

68. *Wang Y., Loake G.J., Chu C.* Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. doi 10.3389/fpls.2013.00314

69. *Yang F., Ding F., Duan X., Zhang J., Li X., Yang Y.* ROS generation and proline metabolism in calli of halophyte *Nitraria tangutorum* Bobr. to sodium nitroprusside treatment // Protoplasma. 2014. V. 251. P. 71–80.

70. *Lin C.C., Jih P.J., Lin H.H., Lin J.S., Chang L.L., Shen Y.H., Jeng S.T.* Nitric oxide activates superoxide dismutase and ascorbate peroxidase to repress the cell death induced by wounding // Plant Mol. Biol. 2011. V. 77. P. 235–249.

71. *Grob F., Durner J., Gaupels F.* Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses // Front. Plant Sci. 2013. doi 10.3389/fpls.2013.00419

72. *Molassiotis A., Fotopoulos V.* Oxidative and nitrosative signaling in plants. Two branches in the same tree? // Plant Signal. Behav. 2011. V. 6. P. 210–214.

73. *Chaki M., Valderrama R., Fernandez-Ocana A.M., Carreras A., Lopez-Jaramillo J., Luque F., Palma J.M., Pedrajas J.R., Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Gomez-Rodriguez M.V., Corpas F.J., Barroso J.B.* Protein targets of tyrosine nitration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) hypocotyls // J. Exp. Bot. 2009. V. 60. P. 4221–4234.

74. *Fares A., Rossignol M., Peltier J.-B.* Proteomics investigation of endogenous *S*-nitrosylation in Arabidopsis // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2011. V. 416. P. 331–336.

75. *Begara-Morales J.C., Sanchez-Calvo B., Chaki M., Valderrama R., Mata-Perez C., Lopez-Jaramillo J., Padilla M.N., Carreras A., Corpas F.J., Barroso J.B.* Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and *S*-nitrosylation // J. Exp. Bot. 2014. V. 65. P. 527–538.

76. *Freschi L.* Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives // Front. Plant Sci. 2013. V. 4. doi 10.3389/fpls.2013.00398

77. *Shen Q., Wang Y., Tian H., Guo F.* Nitric oxide mediates cytokinin functions in cell proliferation and meristem maintenance in *Arabidopsis* // Mol. Plant. 2013. V. 6. P. 1214–1225.

78. *Liu W.Z., Kong D.D., Gu X.X., Gao H.B., Wang J.Z., Xia M., Gao Q., Tian L.L., Xu Z.H., Bao F., Hu Y., Ye N.S., Pei Z.M., He Y.K.* Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in *Arabidopsis* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. P. 41 548–41 553.

79. *Feng J., Wang C., Chen Q., Chen H., Ren B., Li X., Zuo J.* S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling // Nat. Commun. 2013. V. 4. doi 10.1038/ncomms2541

80. *Bright J., Desikan R., Hancock J.T., Weir I.S., Neill S.J.* ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H_2O_2 synthesis // Plant J. 2006. V. 45. P. 113–122.

81. *Liu Y., Shi L., Ye N., Liu R., Jia W., Zhang J.* Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis* // New Phytol. 2009. V. 183. P. 1030–1042.

82. *Pagnussat G.C., Simontacchi M., Puntarulo S., Lamattina L.* Nitric oxide is required for root organogenesis // Plant Physiol. 2002. V. 129. P. 954–956.

83. *Otvos K., Pasternak T.P., Miskolczi P., Domoki M., Dorjgotov D., Szucs A., Bottka S., Dudits D., Feher A.* Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures // Plant J. 2005. V. 43. P. 849–860.

84. *Fernandez-Marcos M., Sanza L., Lewis D.R., Muday G. K., Lorenzo O.* Nitric oxide causes root apical meristem defects and growth inhibition while reducing PIN-FORMED 1 (PIN1)-dependent acropetal auxin transport // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011. V. 108. P. 18 506–18 511.

85. *Terrile M.C., Paris R., Calderon-Villalobos L.I.A., Iglesias M.J., Lamattina L., Estelle M., Casalongue C.A.* Nitric oxide influences auxin signaling trough *S*-nitrosylation of the Arabidopsis TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1 auxin receptor // Plant J. 2012. V. 70. P. 492–500.

86. *Lozano-Juste J., Leon J.* Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis* // Plant Physiol. 2011. V. 156. P. 1410–1423.

87. *Flores F.B., Sanchez-Bel P., Valdenegro M., Romojaro F., Martinez-Madrid M.C., Egea M.I.* Effects of a pretreatment with nitric oxide on peach (*Prunus persica* L.) storage at room temperature // Eur. Food Res. Technol. 2008. V. 227. P. 1599–1611.

88. *Lindermayr C., Saalbach G., Bahnweg G., Durner J.* Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein *S*-nitrosylation // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. P. 4285–4291.

89. *Gibbs D.J., Md Isa N., Movahedi M., Lozano-Juste J., Mendiondo G.M., Berckhan S., Marín-de la Rosa N., Conde J.V., Correia C.S., Pearce S.P., Bassel G.W., Hamali B., Talloji P., Tomé D.F.A., Coego A., Beynon J., Alabadí D., Bachmair A., León J., Gray J.E., Theodoulou F.L., Holdsworth M.J.* Nitric oxide sensing in plants is mediated by proteolytic control of group VII ERF transcription factors // Mol. Cell. 2014. V. 53. P. 369–379.

90. *Varshavsky A.* The N-end rule pathway and regulation by proteolysis // Protein Sci. 2011. V. 20. P. 1298–1345.