

DOI: 10.5846/stxb201306241770

夏海威, 施国新, 黄敏, 吴娟. 一氧化氮对植物重金属胁迫抗性的影响研究进展. 生态学报, 2015, 35(10): 3139-3147.

Xia H W, Shi G X, Huang M, Wu J. Advances on effects of nitric oxide on resistances of plants to heavy metal stress. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(10): 3139-3147.

一氧化氮对植物重金属胁迫抗性的影响研究进展

夏海威, 施国新*, 黄敏, 吴娟

南京师范大学生命科学学院 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 南京 210023

摘要: 一氧化氮(NO)作为一种重要的信号分子,在调节植物重金属胁迫抗性方面起着非常重要的作用。综述了 NO 在植物体内的产生途径,重金属胁迫下植物体内内源 NO 含量的变化以及外源 NO 与内源 NO 对植物重金属胁迫抗性的影响。大量研究表明外源 NO 能够增强植物对重金属胁迫的抗性,一方面是通过增强植物细胞的抗氧化系统或直接清除活性氧,另一方面是通过影响植物对重金属的吸收以及重金属在植物细胞内的分布。然而内源 NO 在调节植物重金属胁迫抗性上的功能角色仍存在争议。有些研究表明内源 NO 是有益的,能够缓解重金属胁迫诱导的毒性;但是也有证据表明内源 NO 是有害的,能够通过促进植物对重金属的吸收以及对植物螯合素进行 S-亚硝基化弱化其解毒功能,从而参与重金属诱导的毒害反应和细胞凋亡过程。
关键词: 外源 NO; 内源 NO; 重金属胁迫; 抗性

Advances on effects of nitric oxide on resistances of plants to heavy metal stress

XIA Haiwei, SHI Guoxin*, HUANG Min, WU Juan

Jiangsu Key Laboratory of Biodiversity and Biotechnology, College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

Abstract: Heavy metal pollution has become an increasingly serious environmental problem because heavy metal can be easily taken up by plants, leading to inhibition of plant growth and development. Hence, it is necessary to investigate resistances of plants to heavy metal stress. As an important signaling molecule, nitric oxide (NO) is involved in the regulation of multiple plant responses to a variety of abiotic and biotic stresses. Recently, an increasing number of articles have reported the effects of NO on resistances of plants to heavy metal stress. However, studies which systematically summarize the molecular mechanisms of NO on resistances of plants to heavy metal stress are quite limited. This research mainly reviews the pathways of NO production, changes of endogenous NO contents under heavy metal stress and influences of exogenous and endogenous NO on resistances to heavy metal stress. The sources of NO production in plants involve not only enzymatic reaction pathways which include nitric oxide synthase (NOS), nitrate reductase (NR), nitrite reductase (Ni-NOR) pathways and etc. but also non-enzymatic reaction pathways. Many authors have noted discrepant reports on the effects of heavy metal stress on endogenous NO content in plants and the observed differences in endogenous NO accumulation are frequently ascribed to the use of different duration of treatment, heavy metal concentrations, species and genotypes of plants and varieties of plant tissues. Interestingly, all plant cell suspensions show a visible increase in endogenous NO accumulation under heavy metal stress, which is attributed to the fact that they are lacking of network regulation between cells and cells. Meanwhile, it has been demonstrated that exogenous NO could enhance antioxidant defence system of plant cells, act as an antioxidant promoting direct scavenging of reactive oxygen species, induce metallothioneins (MTs) gene expression by displacing heavy metal bound to MTs, and affect the uptake of heavy metal into

基金项目:江苏高校优秀学科建设工程资助项目(164320H106)

收稿日期:2013-06-24; 网络出版日期:2014-05-30

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: gxshi@njnu.edu.cn

plants and the distribution of heavy metal in plant cells though regulating the metabolism of cell wall composition, consequently relieve heavy metal toxicity and enhance resistances of plants to heavy metal stress. However, the functional roles of endogenous NO in regulating resistances of plants to heavy metal stress are controversial. Some research show that endogenous NO is helpful for alleviating heavy metal-induced toxicity. On the contrary, some evidences indicate that endogenous NO is harmful, and participates in heavy metal-induced cell toxicity and programmed cell death through accelerating the absorption of heavy metal and S-nitrosylation of phytochelatin. These conflicting data suggest that NO may have a dual effect on resistances to heavy metal stress, but great efforts are required in order to clarify this speculation. Finally, interrelated perspectives are also discussed to further study the relationship between NO and resistances to heavy metal stress.

Key Words: exogenous NO; endogenous NO; heavy metal stress; resistances

一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是一种广泛存在于生物体内的水溶性和脂溶性气体小分子信号物质,在植物体内参与多种生理过程,如诱导种子萌发^[1]、抑制种子休眠^[2],调节植物光合作用^[3]、花的形成^[4]以及植物的根向地性生长^[5],延缓植物的衰老过程^[6]等。同时,NO也参与调节植物对一系列非生物和生物胁迫的抗性,在非生物胁迫抗性方面,NO能够增强植物抗盐性,抗旱性,抗涝性,抗极端温度,抗紫外线辐射等^[7];在生物胁迫抗性方面,NO能通过增加3'5'-环-磷酸鸟苷(cGMP)和水杨酸(SA)的水平来增强植物的抗病性^[8]。

对重金属胁迫抗性而言,已有大量文献表明NO能够调节植物对重金属胁迫抗性,但对NO在植物重金属胁迫抗性方面的具体机制做系统总结和概括的研究较少并且对内源NO在调节植物重金属胁迫抗性上的功能角色也很少涉及。本文结合国内外最新的研究进展,综述了NO调节植物重金属胁迫抗性的相关机制,为研究植物重金属胁迫抗性机制提供了参考。

1 植物体内NO的产生途径

1.1 酶促反应途径

1.1.1 一氧化氮合酶(NOS)途径

在动物体内,NO主要通过NOS以L-精氨酸、O₂及NADPH为底物催化而成,FAD、FMN、血红素、四氢叶酸、Ca²⁺/CaM和Zn²⁺为NOS的辅基^[9]。在植物体内也有类似的NOS,Neill等^[7]发现植物能够通过氧化L-精氨酸形成瓜氨酸而产生NO,并且动物NOS抑制剂L-硝基精氨酸甲酯(L-NAME)能够抑制拟南芥NOS活性并减少NO的产生^[10],另外人们已经在植物组织如豌豆的根、茎、叶中^[11]以及各种细胞器如过氧化物酶体^[12]和叶绿体^[13]中都检测到了NOS活性。然而植物NOS的基因和蛋白序列与动物却并不相同,如最近发现的绿藻(*Ostreococcus tauri*)中的NOS蛋白序列已经被鉴定出来,结果其与动物的NOS蛋白序列仅有45%的相似性,而其结构模型与动物的反应区域却高等相似^[14],另外Guo等发现拟南芥中AtNOS1基因编码的蛋白与蜗牛中参与NO合成的蛋白有相似序列,但这一蛋白与典型的动物NOS蛋白序列没有相似性^[15],并且体外重组的AtNOS1也没有NOS活性^[16],实际上AtNOS1是一种GTPase而不是NOS,因而命名为AtNOA1^[17],该蛋白可能参与线粒体核糖体的生物合成以及翻译过程,并在此过程中间接参与NO的合成^[16]。

1.1.2 硝酸还原酶(NR)和亚硝酸还原酶(Ni-NOR)途径

在植物体内除了NOS途径以外,细胞质的硝酸还原酶(NR)和根部特有的质膜亚硝酸还原酶(Ni-NOR)也参与NO的生成,NR和Ni-NOR以NAD(P)H作为电子供体进行还原反应将亚硝酸盐(NO₂⁻)还原生成NO。已经在多种植物体内检测到了NR的活性,如黄瓜^[18]、向日葵、菠菜和玉米^[19]等。Stöhr等在烟草根系中证实了Ni-NOR途径的存在^[20]。

1.1.3 其他酶促途径

另外,植物体内还有其他的酶也参与NO的产生,如辣根过氧化物酶^[21]、黄嘌呤氧化酶(XOR)以及黄嘌呤

呤脱氢酶(XDH)^[22]、细胞色素 P450^[23]等。

1.2 非酶促途径

植物体内还可通过非酶促反应途径合成 NO,如类胡萝卜素和光可以催化 NO₂⁻ 转化成 NO^[24],另外在酸性或者还原条件下,质外体能够通过非酶促反应将亚硝酸盐还原为 NO^[25]。另外,研究发现多胺也能够诱导 NO 的产生^[26]。

2 重金属胁迫下植物体内内源 NO 含量的变化

重金属胁迫下,植物细胞内源 NO 含量往往会发生显著变化,然而内源 NO 含量的变化却有众多的影响因素。

如 100 μmol/L 的铜(Cu)、镉(Cd)、锌(Zn)短期处理 24 h 以后,豌豆根内的内源 NO 含量升高^[27],而 100 μmol/L 的 Cu、Cd、Zn 长期处理 14 d 以后,豌豆根内的内源 NO 含量却下降^[28],说明重金属处理时间的长短能够影响植物体内内源 NO 含量的变化。

Leterier 等用不同浓度的砷(As)对拟南芥处理 7 d 以后发现,当砷浓度小于 250 μmol/L 时,拟南芥根内的 NO 含量没有增加,甚至在 250 μmol/L 时出现了下降;而当砷浓度超过 500 μmol/L 时,拟南芥根内的 NO 含量大幅增加,并且在 500 μmol/L 时达到最大^[29],表明植物体内内源 NO 含量的变化与重金属的浓度有关。

100 μmol/L 的 Cd 处理 24 h 以后,水稻根内的 NO 含量下降^[30],而在同样的 100 μmol/L 的 Cd 处理 24 h 以后豌豆根内的 NO 却增加^[27];另外,Chen 等在研究大麦的两种基因型 weishuobuzhi 和 dong17 对 5 μmol/L 的 Cd 胁迫反应时发现,两种基因型大麦体内的 NO 含量变化不同,其中 weishuobuzhi 型大麦根内的 NO 含量在第 1 天达到最大值,而后随着处理时间的延长,NO 含量迅速下降,而对 Cd 敏感的 dong17 型大麦根内的 NO 含量在第 10 天达到最大,另外,weishuobuzhi 和 dong17 叶内的 NO 含量都在第 1 天达到最大^[31]。这些发现说明重金属胁迫下,植物体内内源 NO 含量的变化与植物的种类以及基因型和植物组织类型有关。

尽管大量研究证明植物在重金属胁迫下内源 NO 含量的变化受植物种类与基因型,重金属浓度以及处理时间等因素的影响,然而对植物悬浮细胞而言,重金属胁迫下其内源 NO 含量总会增加^[32-35],出现这一现象的原因可能是植物悬浮细胞缺少细胞与细胞之间的网络调控。

3 外源 NO 增强植物对重金属胁迫的抗性

3.1 外源 NO 缓解重金属对植物细胞造成的氧化胁迫

活性氧(ROS)包括单线态氧(¹O₂)、超氧阴离子(O₂⁻)、过氧化氢(H₂O₂)、羟自由基(·OH)等。在正常生长过程中,植物细胞会产生 ROS 参与生理代谢,如光合作用和呼吸作用^[36]。然而在包括重金属胁迫在内的胁迫条件下,植物细胞会产生过量的 ROS,造成氧化胁迫,从而导致膜脂过氧化,蛋白质变性以及 DNA 和 RNA 的损伤等^[37-39]。植物细胞内有一系列的抗氧化系统能够有效地清除 ROS,抗氧化系统包括抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)以及谷胱甘肽还原酶(GR)等,还包括抗氧化剂小分子如抗坏血酸(ASA)、谷胱甘肽(GSH)、脯氨酸(Pro)和类胡萝卜素(Car)等^[40],近年来研究发现多胺(PAs)也属于抗氧化剂,能够有效地清除 ROS^[41]。

一方面外源 NO 能够提高植物细胞抗氧化系统,增强其清除 ROS 的能力,从而缓解重金属对植物细胞造成的氧化伤害。外源 NO 能够增强大豆悬浮细胞的抗氧化酶特别是 SOD 的活性,抑制 Cd 诱导产生的 O₂⁻ 和 H₂O₂ 的过量积累^[32];增强番茄 SOD、CAT 和 POD 的活性,减少过量 Cu 诱导的氧化胁迫^[42];增加水稻抗氧化酶 CAT、GR、POD 和 SOD 的活性,并抑制 Cd 诱导的 ASA 和 GSH 含量的升高,从而增强水稻对 Cd 胁迫的抗性^[43];增加向日葵叶内的 SOD、CAT、APX、GPX 和 GR 活性以及 GSH 含量,缓解 Cd 对向日葵造成的氧化胁迫^[44];提高 CAT、APX 和 GPX 的活性以及 Pro 含量,抑制镍(Ni)对油菜的氧化胁迫^[45];提高人参根部抗氧化酶 SOD、CAT、POD、APX 和 GR 活性,缓解过量 Cu 造成的 O₂⁻ 和 H₂O₂ 积累以及膜脂过氧化,并大幅降低细胞

死亡率^[46]。Xu 等发现在 Cd 胁迫下,苜蓿根内的 GSH 和 Pro 含量都下降,而外源 NO 处理能够显著增加 Pro 和 GSH 的含量并抑制 Cd 诱导的苜蓿根细胞 K^+ 和 Ca^{2+} 的损失,缓解 Cd 对苜蓿造成的氧化损伤^[47]。研究还发现外源 NO 能够通过调节苜蓿 PAs 代谢酶以及 Pro 代谢酶活性增加 PAs 和 Pro 含量^[48],增加 Cd 胁迫下小麦体内亚精胺(Spd)和精胺(Spm)的含量^[49],并且增强吡咯啉-5-羧酸合成酶(P5CS)的活性,增加 Cu 胁迫下衣藻对 Pro 的合成^[50]。由此可见,外源 NO 能够增强植物体内的抗氧化系统,从而显著降低重金属对植物的毒害,增强植物对重金属胁迫的抗性。

另一方面,NO 能够直接清除 ROS,显著抑制重金属诱导的 ROS 的积累,从而缓解重金属对植物造成的氧化损伤。如外源 NO 能够减少 Cd 诱导的 H_2O_2 和膜脂过氧化产物丙二醛(MDA)的积累,缓解 Cd 对小麦根部造成的氧化胁迫,并阻止 Cd 诱导的抗氧化酶 SOD、CAT、GPX 和 GR 等活性的升高^[51];能够抑制 As 诱导水稻体内的 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 和 MDA 的积累以及抗氧化酶 SOD、CAT、APX 和 GPX 活性的升高^[52];能够逆转锰(Mn)胁迫诱导水稻体内 GSH 和 ASA 含量的下降以及抗氧化酶 SOD、CAT、APX、GPX 和 GR 活性的升高,并减少 Mn 诱导的 H_2O_2 的积累和反应膜脂过氧化程度的硫代巴比妥酸反应物(TBARS)水平的升高^[53];还能够逆转 Cd 诱导水稻的抗氧化酶 SOD、CAT、APX、GPX 和 GR 活性的升高以及 ASA 和 GSH 含量的下降,并抑制 H_2O_2 的积累,叶绿素和蛋白质的降解,缓解 Cd 对水稻的氧化胁迫^[54]。以上发现说明外源 NO 能够直接降低重金属诱导的 ROS 的积累,原因可能是 NO 能够直接与 $O_2^{\cdot-}$ 结合形成过氧化亚硝酸盐($ONOO^-$)^[55],而 $ONOO^-$ 对动物细胞有极大毒性但对植物细胞代谢并不具有毒害作用^[56],并且 $ONOO^-$ 又能够与 H_2O_2 相互作用产生 $NO_2^{\cdot}$ 和 $O_2^{\cdot-}$ ^[57],因此 NO 能够与 ROS 直接结合,从而减少重金属诱导的 ROS 造成的细胞毒性。另外,重金属胁迫下植物体内的抗氧化系统的能力大幅提高是因为重金属胁迫诱导产生了大量的 ROS,而 ROS 能够显著激活抗氧化酶活性^[58],因此外源 NO 显著降低抗氧化系统能力的原因可能是 NO 能够直接清除 ROS,使 ROS 水平大幅降低,从而抑制了抗氧化系统能力的升高。

金属硫蛋白(Metallothioneins, MTs)是一种小分子的富含半胱氨酸的金属结合蛋白,通过巯基与重金属结合形成无毒或低毒络合物,从而避免有害重金属对植物体的潜在毒性^[59]。在动物细胞中,有研究发现在肝细胞中添加 NO 的供体 V-PYRRO/NO,能够大幅增强 MTs 基因的表达,从而减弱 Cd 的毒性,增强肝细胞对 Cd 胁迫的抗性^[60]。原因可能是 NO 能够替换与 MTs 结合的重金属^[61-62],并且释放的重金属能够进一步促进 MTs 基因的表达^[62]。在植物细胞中可能也存在类似的机制,Wang 等研究发现外源 NO 能够提高 MTs 的含量并增强番茄对 Cu 胁迫的抗性,而对 MTs 敏感型番茄而言,外源 NO 并不能明显地增强番茄对 Cu 胁迫的抗性,表明 MTs 在介导 NO 缓解重金属胁迫上起着至关重要的作用^[42]。

3.2 外源 NO 影响植物对重金属的吸收以及重金属在植物体内的分布

研究发现外源 NO 能够影响植物对重金属的吸收,从而调节植物对重金属胁迫的抗性。如外源 NO 能够减少苜蓿对 Cd 的吸收^[47],减少小麦和豌豆对 Zn 的过量积累^[63],抑制决明对铝(Al)的吸收^[64]。但也有研究表明外源 NO 缓解重金属胁迫并不是通过抑制植物对重金属的吸收。如外源 NO 缓解过量 Cu 对小麦种子萌发的抑制作用,并且通过增强 SOD 和 CAT 的活性缓解过量 Cu 对小麦种子造成的氧化胁迫,然而外源 NO 并不能抑制小麦种子对 Cu 的吸收^[65];外源 NO 能够缓解过量 Cu 对人参造成的毒害作用,但并不能显著降低人参根细胞对 Cu 的吸收^[46];外源 NO 供体硝普钠(SNP)处理能够缓解铅(Pb)对拟南芥的毒害,但不能减少拟南芥对 Pb 的积累^[66]。Xu 等在研究中发现,对 Cd 的超富集植物龙葵而言,Cd 胁迫能够诱导显著的生长抑制,促进 H_2O_2 的积累并破坏膜的完整性,而添加外源的 NO 供体亚硝基谷胱甘肽(GSNO)能够增强 SOD 和 CAT 的活性,增加 Pro 含量,抑制 H_2O_2 的积累,提高膜的完整性,从而缓解 Cd 对龙葵的毒害,并且添加 NO 清除剂 c-PTIO 后能够加重 Cd 对龙葵的毒害作用,这表明外源 NO 能够缓解 Cd 胁迫对龙葵造成的伤害,增强龙葵对 Cd 胁迫的抗性。但另一方面添加 NO 清除剂 c-PTIO 能够减少龙葵对 Cd 的吸收,添加外源的 NO 供体 GSNO 能够增加龙葵对 Cd 的吸收,说明 NO 促进龙葵根部对 Cd 的吸收^[67],这些研究暗示了外源 NO 可能存在相应的调节机制调节重金属在植物体内的分布。

面对重金属胁迫,植物细胞也有一系列的防御机制,以最大程度减少重金属可能造成的伤害,其中作为抗重金属胁迫的第一道屏障,细胞壁对吸收的重金属具有束缚作用^[68]。研究表明进入水稻细胞的 Al 80%—85%分布在细胞壁,从而有效地阻止 Al 进入水稻细胞的细胞质^[69],因此重金属在植物细胞壁的沉积是一种十分重要的重金属抗性机制。纤维素、半纤维素和果胶等是细胞壁的主要组成成分,研究发现外源 NO 能够调节植物细胞细胞壁成分的代谢,如低浓度的 NO 供体 SNP 能够促进番茄根部细胞壁纤维素的合成^[70],增加土豆嫩叶胼胝质的积累和沉积,而高浓度的 NO 却起相反的效果^[71];另外外源 NO 能够减少烟草 BY-2 悬浮细胞细胞壁果胶、半纤维素和纤维素的含量^[72],这些研究都暗示了外源 NO 可能通过调节植物细胞壁成分含量进而调节植物细胞对重金属胁迫的抗性。实际上,Xiong 等证实了在 Cd 胁迫下,外源 NO 能够增加水稻根细胞细胞壁果胶和半纤维素的含量,增加 Cd 在根和茎细胞壁中的积累,减少 Cd 在叶片可溶性成分中的分布,从而增强水稻对 Cd 胁迫的抗性^[73];Zhang 等也发现外源 NO 能够逆转 Al 胁迫诱导的水稻根细胞细胞壁果胶和半纤维素含量的增加,并且显著降低 Al 在水稻根尖和水稻幼苗细胞壁中的积累,从而减少 Al 胁迫诱导的根的生长抑制和膜脂过氧化,增强水稻对 Al 胁迫的抗性^[74];另外外源 NO 能够降低小麦和黑麦根尖细胞细胞壁对 Al 的吸附,增强 Al 胁迫抗性^[75]。因此上述的外源 NO 缓解重金属胁迫,但并不减少植物对重金属的吸收可能是因为外源 NO 能够调节植物细胞细胞壁成分,促进了重金属在细胞壁的分布,减少了在细胞可溶性成分中的分布,但总体上并没有减少植物体内的重金属,但也可能是因为存在其他的调节机制。

4 内源 NO 参与调节植物重金属胁迫抗性

尽管大量的研究表明低浓度的外源 NO 能够缓解重金属胁迫对植物造成的伤害,增强植物对重金属胁迫的抗性,然而内源 NO 在调节植物重金属胁迫抗性上的功能角色仍存在争议。有研究发现内源 NO 是有益的,能够缓解重金属胁迫诱导的毒性,如 Tian 等发现 Al 胁迫能够减少芙蓉葵体内的内源 NO 含量,并且抑制芙蓉葵根的伸长,添加 NO 的供体 SNP 能够缓解 Al 对根的伸长抑制,而 NO 清除剂 c-PTIO、NOS 抑制剂 L-NAME 以及 NR 抑制剂钨酸盐 (Tungstate) 却能够加重 Al 的抑制作用或者抑制外源 NO 的缓解作用,表明内源 NO 能够促进根的伸长,增强 Al 胁迫抗性^[76];Qiu 等研究发现微波处理能够提高小麦抗氧化酶 SOD、POD、CAT、APX、GPX 和 GR 活性以及 GSH、ASA 和 Car 含量,缓解 Cd 胁迫对小麦的氧化伤害,而 NO 清除剂 c-PTIO 则能够逆转微波的缓解效果,表明内源 NO 能够增强小麦体内的抗氧化系统,参与微波增强植物对重金属胁迫的抗性反应^[77];Talukdar 等发现内源 NO 与外源 NO 都能缓解 As 对菜豆造成的生长抑制和氧化胁迫,增强菜豆 As 胁迫抗性^[78];在荠菜中也有类似的发现,即外源 NO 与内源 NO 都能够缓解 Cd 诱导的膜质过氧化,增强荠菜对 Cd 胁迫的抗性^[79]。

然而,近年来也有研究表明植物细胞内源 NO 是有害的,并参与重金属诱导的毒害反应和细胞凋亡过程。如 100 $\mu\text{mol/L}$ Cd 能够显著抑制小麦和拟南芥根的生长,而添加 NO 清除剂 c-PTIO 都能够缓解这种抑制作用,表明内源 NO 参与 Cd 诱导的小麦和拟南芥根的生长抑制^[49, 80];100 $\mu\text{mol/L}$ 或者 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd 能够诱导 NO 的大量产生,并导致拟南芥悬浮细胞凋亡,而添加 NOS 抑制剂 L-NMMA 以后,显著抑制其细胞凋亡^[33];研究还发现添加 NO 清除剂 c-PTIO 能够减少 Cd 诱导产生的 O_2^- 和 H_2O_2 的积累,减少黄羽参豆根细胞对 Cd 的吸收,并显著抑制 Cd 诱导产生的细胞凋亡^[81];150 $\mu\text{mol/L}$ Cd 能够诱导烟草悬浮细胞产生大量的 NO,并且诱导明显的细胞凋亡,而 NOS 抑制剂 L-NAME 和 NO 清除剂 c-PTIO 能够减少烟草细胞对 Cd 的吸收并且显著降低烟草悬浮细胞的细胞凋亡^[35],这些发现表明重金属胁迫下,植物体内源的 NO 是有害,并且参与重金属诱导的毒害反应和细胞凋亡。另外,30 $\mu\text{mol/L}$ Cd 能够促进拟南芥内源 NO 的大量释放并且促进 Cd 在拟南芥根部的大量积累,从而显著诱导拟南芥根的生长抑制,而添加 NOS 抑制剂 L-NAME 以后,拟南芥根部积累的 Cd 大量减少,并显著缓解了 Cd 胁迫诱导的根的生长抑制,表明 Cd 胁迫诱导的内源 NO 是有害的,促进拟南芥根部对 Cd 的吸收,进而促进 Cd 对拟南芥细胞造成的毒性^[30];caspase-3 是一种半胱氨酸蛋白酶,是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶,在细胞凋亡中起着不可替代的作用,研究发现 100 $\mu\text{mol/L}$ Cd 诱

导 NO 的大量合成,显著激活拟南芥 caspase-3 的活性,从而诱导拟南芥细胞凋亡,而添加 NO 清除剂 c-PTIO 能够显著抑制 caspase-3 的活性,减少其细胞凋亡,表明内源 NO 参与 Cd 诱导拟南芥的细胞凋亡过程^[80],以上研究进一步证明了内源 NO 是有害的,并参与重金属诱导的毒害反应和细胞凋亡过程。

植物螯合素(Phytochelatins, PCs)是一种由半胱氨酸、谷氨酸和甘氨酸组成的含巯基螯合多肽,GSH 是植物螯合素的前体,在植物螯合素合成酶催化下合成植物螯合素,植物螯合素能够与进入细胞内的重金属离子螯合,并把重金属隔离在液泡内,从而减轻重金属对细胞质中活性物质的毒害,增强植物对重金属胁迫的抗性^[59]。NO 能够促进 γ -ecs 和 gshs 基因的表达,从而增加苜蓿根内 GSH 的含量^[82],而 GSH 是植物螯合素的前体,因此可以推断出 NO 也可能促进植物螯合素的合成,但事实并非如此,在 100 μ mol/L 和 150 μ mol/L Cd 胁迫下,拟南芥悬浮细胞内的植物螯合素含量大幅升高,而添加 NOS 抑制剂 L-NAME 后,植物螯合素含量进一步升高,表明内源 NO 抑制植物螯合素含量的升高,进一步研究发现是因为 Cd 诱导的内源 NO 能够通过 s-亚硝基化作用与植物螯合素的半胱氨酸残基(Cys)结合形成 NO-PC₂、NO-PC₃ 和 NO-PC₄,从而弱化植物螯合素对 Cd 的解毒作用,促进拟南芥悬浮细胞的细胞凋亡^[33],Elviri 等也证实了 NO 与植物螯合素的 s-亚硝基化结合^[83]。由此可见,内源 NO 能够使植物螯合素 s-亚硝基化,减弱植物螯合素对重金属胁迫的解毒功能,从而促进重金属对植物的毒害。

5 研究展望

尽管国内外已对 NO 在调节植物重金属胁迫抗性方面做了大量研究,但是 NO 的具体作用机制仍然不是很清楚。建议未来相关研究应该加强以下几个方面的工作:

(1) 重视 NO 与其他信号分子如 Ca²⁺、茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)和乙烯(ET)等存在的交叉调控。研究表明其他的信号分子也参与调节植物重金属胁迫抗^[84],并且 NO 可能与其他信号分子共同作用来调节植物重金属胁迫抗性,因此加强 NO 与其他信号分子的交叉调控尤为必要。

(2) 加强对 NO 靶标分子的研究。NO 作为一种信号分子,必然通过刺激靶标分子而发挥作用,而 NO 正是通过靶标分子进而调节植物对重金属胁迫的抗性,因此加强对 NO 靶标分子的研究很有意义。

(3) 加强对内源 NO 作用机制的探讨。重金属胁迫下,内源 NO 对植物重金属胁迫抗性起着更为重要的作用,并且研究发现内源 NO 对重金属胁迫具有双重作用,因此内源 NO 在重金属胁迫抗性上具体的功能角色有待研究。

参考文献(References):

- [1] Zheng C F, Jiang D, Liu F L, Dai T B, Liu W C, Jing Q, Cao W X. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 67(1): 222-227.
- [2] Bethke P C, Libourel I G L, Jones R L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(3): 517-526.
- [3] Takahashi S, Yamasaki H. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, 2002, 512(1/3): 145-148.
- [4] He Y K, Tang R H, Yi H, Stevens R D, Cook C W, Ahn S M, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson R B, Crawford N M, Pei Z M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 2004, 305(5692): 1968-1971.
- [5] Hu X, Neill S J, Tang Z, Cai W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology*, 2005, 137(2): 663-670.
- [6] Guo F Q, Crawford N M. *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *The Plant Cell*, 2005, 17(12): 3436-3450.
- [7] Neill S J, Desikan R, Hancock J T. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 2003, 159(1): 11-35.
- [8] Hong J K, Yun B W, Kang J G, Raja M U, Kwon E, Sorhagen K, Chu C, Wang Y, Loake G J. Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(2): 147-154.
- [9] Nathan C, Xie Q W. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 1994, 78(6): 915-918.
- [10] Asai S, Ohta K, Yoshioka H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell*, 2008, 20(5): 1390-1406.
- [11] Corpas F J, Barroso J, Carreras A, Valderrama R, Palma J, León A, Sandalio L, Del Río L A. Constitutive arginine-dependent nitric oxide

- synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. *Planta*, 2006, 224(2): 246-254
- [12] Del Rio L A, Corpas F J, Sandalio L M, Palma J M, Gomez M, Barroso J B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(372): 1255-1272.
- [13] Jasid S, Simontacchi M, Bartoli C G, Puntarulo S. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiology*, 2006, 142(3): 1246-1255.
- [14] Eckardt N A. A functional nitric oxide synthase in *Ostreococcus tauri*. *The Plant Cell*, 2010, 22(11): 3507-3507.
- [15] Guo F Q, Okamoto M, Crawford N M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 2003, 302(5642): 100-103.
- [16] 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 in Plant Science*, 2006, 11(11): 524-525.
- [17] Moreau M, Lee G I, Wang Y, Crane B R, Klessig D F. AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(47): 32957-32967.
- [18] de la Haba P, Agüera E, Benitez L, Maldonado J M. Modulation of nitrate reductase activity in cucumber (*Cucumis sativus*) roots. *Plant Science*, 2001, 161(2): 231-237.
- [19] 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*. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(366): 103-110.
- [20] Stöhr C, Ullrich W R. Generation and possible roles of NO in plant roots and their apoplastic space. *Journal of Experimental Botany*, 2002, 53(379): 2293-2303.
- [21] Huang J, Sommer E M, Kim-Shapiro D B, King S B. Horseradish peroxidase catalyzed nitric oxide formation from hydroxyurea. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, 124(13): 34733480.
- [22] Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, 33(6): 774-797.
- [23] Mansuy D, Boucher J L. Oxidation of N-hydroxy-guanidines by cytochromes P450 and NO-synthases and formation of nitric oxide. *Drug Metabolism Reviews*, 2002, 34(3): 593-606.
- [24] Cooney R V, Harwood P J, Custer L J, Franke A A. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. *Environmental Health Perspectives*, 1994, 102(5): 460-462.
- [25] Wendehenne D, Durner J, Klessig D F. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(4): 449-455.
- [26] Tun N N, Santa-Catarina C, Begum T, Silveira V, Handro W, Floh E I S, Scherer G F E. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(3): 346-354.
- [27] Bartha B, Kolbert Z, Erdei L. Nitric oxide production induced by heavy metals in *Brassica juncea* L. Czern. and *Pisum sativum* L.. *Acta Biologica Szegediensis*, 2005, 49(1/2): 9-12.
- [28] Rodríguez-Serrano M, Romero-Puertas M C, Pazmiño D M, Testillano P S, Risueño M C, Del Río L A, Sandalio L M. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 229-243.
- [29] Leterrier M, Airaki M, Palma J M, Chaki M, Barroso J B, Corpas F J. Arsenic triggers the nitric oxide (NO) and S-nitrosoglutathione (GSNO) metabolism in *Arabidopsis*. *Environmental Pollution*, 2012, 166: 136-143.
- [30] Besson-Bard A, Gravot A, Richaud P, Auroy P, Duc C, Gaymard F, Taconnat L, Renou J P, Pugin A, Wendehenne D. Nitric oxide contributes to cadmium toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to iron uptake. *Plant Physiology*, 2009, 149(3): 1302-1315.
- [31] Chen F, Wang F, Sun H Y, Cai Y, Mao W H, Zhang G P, Vincze E, Wu F B. Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 2010, 29(4): 394-408.
- [32] Kopyra M, Stachoń-Wilk M, Gwóźdz E A. Effects of exogenous nitric oxide on the anti-oxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2006, 28(6): 525-536.
- [33] Michele R D, Vurro E, Rigo C, Elviri L, Valentin M D, Careri M, Zottini M, Sanità di Toppi L, Schiavo F L. Nitric oxide is involved in cadmium-induced programmed cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiology*, 2009, 150(1): 217-228.
- [34] Balestrazzi A, Macovei A, Testoni C, Raimondi E, Donà M, Carbonera D. Nitric oxide biosynthesis in white poplar (*Populus alba* L.) suspension cultures challenged with heavy metals. *Plant Stress*, 2009, 3(1): 1-6.
- [35] Ma W W, Xu W Z, Xu H, Chen Y S, He Z Y, Ma M. Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Planta*, 2010, 232(2): 325-335.
- [36] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Breusegem F V. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498.
- [37] Ammar W B, Nauairi I, Zarrouk M, Jamel F. Cadmium stress induces changes in the lipid composition and biosynthesis in tomato (*Lycopersicon*

- esculentum* Mill.) leaves. *Plant Growth Regulation*, 2007, 53(2): 75-85.
- [38] Romero-Puertas M C, Palma J M, Gomez M, Del Rio L A, Sandalio L M. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell and Environment*, 2002, 25(5): 677-686.
- [39] Britt A B. Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends in Plant Science*, 1999, 4(1): 20-25.
- [40] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2010, 48(12): 909-930.
- [41] Papadakis A K, Roubelakis-Angelakis K A. Polyamines inhibit NADPH oxidase-mediated superoxide generation and putrescine prevents programmed cell death induced by polyamine oxidase-generated hydrogen peroxide. *Planta*, 2005, 220(6): 826-837.
- [42] Wang L N, Yang L M, Yang G J, Li X G, Song Y P, Wang X F, Hu X Y. Involvements of H_2O_2 and metallothionein in NO-mediated tomato tolerance to copper toxicity. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(15): 1298-1306.
- [43] Panda P, Nath S, Chanu T T, Sharma G D, Panda S K. Cadmium stress-induced oxidative stress and role of nitric oxide in rice (*Oryza sativa* L.). *Acta Physiologiae Plantarum*, 2011, 33(15): 1737-1747.
- [44] Laspina N V, Groppa M D, Tomaro M L, Benavides M P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science*, 2005, 169(2): 323-330.
- [45] Kazemi N, Khavari-Nejad R A, Fahimi H, Saadatmand S, Nejad-Sattari T. Effects of exogenous salicylic acid and nitric oxide on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in leaves of *Brassica napus* L. under nickel stress. *Scientia Horticulturae*, 2010, 126(3): 402-407.
- [46] Tewari R K, Hahn E J, Paek K Y. Modulation of copper toxicity-induced oxidative damage by nitric oxide supply in the adventitious roots of *Panax ginseng*. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(1): 171-181.
- [47] Xu J, Wang W Y, Yin H X, Liu X J, Sun H, Min Q. Exogenous nitric oxide improves antioxidative capacity and reduces auxin degradation in roots of *Medicago truncatula* seedlings under cadmium stress. *Plant and Soil*, 2010, 326(1/2): 321-330.
- [48] Filippou P, Antoniou C, Fotopoulos V. The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 56: 172-183.
- [49] Groppa M D, Rosales E P, Iannone M F, Benavides M P. Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry*, 2008, 69(14): 2609-2615.
- [50] Zhang L P, Mehta S K, Liu Z P, Yang Z M. Copper-Induced proline synthesis is associated with nitric oxide generation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 2008, 49(3): 411-419.
- [51] Singh H P, Batish D R, Kaur G, Arora K, Kohli R K. Nitric oxide (as sodium nitroprusside) supplementation ameliorates Cd toxicity in hydroponically grown wheat roots. *Environmental and Experimental Botany*, 2008, 63(1/3): 158-167.
- [52] Singh H P, Kaur S, Batish D R, Sharma V P, Sharma N, Kohli P K. Nitric oxide alleviates arsenic toxicity by reducing oxidative damage in the roots of *Oryza sativa* (rice). *Nitric Oxide*, 2009, 20(4): 289-297.
- [53] Srivastava S, Dubey R S. Nitric oxide alleviates manganese toxicity by preventing oxidative stress in excised rice leaves. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(2): 819-825.
- [54] Hsu Y T, Kao C H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation*, 2004, 42(3): 227-238.
- [55] Caro A, Puntarulo S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. *Physiologia Plantarum*, 1998, 104(3): 357-364.
- [56] Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(23): 13454-13459.
- [57] Martinez G R, Mascio P D, Bonini M G, Augusto O, Briviba K, Sies H, Maurer P, Röthlisberger U, Herold S, Koppeno W H. Peroxynitrite does not decompose to singlet oxygen ($^1\Delta_g O_2$) and nitroxyl (NO^-). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(19): 10307-10312.
- [58] Thompson J E, Legge R L, Barber R F. The role of free radicals in senescence and wounding. *New Phytologist*, 1987, 105(3): 1044-1047.
- [59] Zhang H Y, Xu W Z, Guo G B, He Z Y, Ma M. Coordinated responses of phytochelatin and metallothioneins to heavy metals in garlic seedlings. *Plant Science*, 2005, 169(6): 1059-1065.
- [60] Qu W, Liu J, Fuquay R, Shimoda R, Sakurai T, Saavedra J E, Keefer L K, Waalkes M P. The nitric oxide prodrug, V-PYRRO/NO, protects against cadmium toxicity and apoptosis at the cellular level. *Nitric Oxide*, 2005, 12(2): 114-120.
- [61] Misra R R, Hochadel J F, Smith G T, Cook J C, Waalkes M P, Wink D A. Evidence that nitric oxide enhances cadmium toxicity by displacing the metal from metallothionein. *Chemical Research in Toxicology*, 1996, 9(1): 326-332.
- [62] Katakai K, Liu J, Nakajima K, Keefer L K, Waalkes M P. Nitric oxide induces metallothionein (MT) gene expression apparently by displacing zinc bound to MT. *Toxicology Letters*, 2001, 119(2): 103-108.
- [63] Abdel-Kader D E Z. Role of nitric oxide, glutathione and sulfhydryl groups in zinc homeostasis in plants. *American Journal of Plant Physiology*, 2007, 2(2): 59-75.
- [64] Wang Y S, Yang Z M. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L.. *Plant and Cell*

- Physiology, 2005, 46(12): 1915-1923.
- [65] Hu K D, Hu L Y, Li Y H, Zhang F Q, Zhang H. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regulation*, 2007, 53(3): 173-183.
- [66] Phang I C, Leung D W M, Taylor H H, Burritt D J. The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic level of Pb is not linked to avoidance of Pb uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(5): 1310-1315.
- [67] Xu J, Wang W J, Sun J H, Zhang Y, Ge Q, Du L G, Yin H X, Liu X J. Involvement of auxin and nitric oxide in plant Cd-stress responses. *Plant and Soil*, 2011, 346(1/2): 107-119.
- [68] Lux A, Martinka M, Vaculik M, White P J. Root responses to cadmium in the rhizosphere: a review. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(1): 21-37.
- [69] Yang J L, Li Y Y, Zhang Y J, Zhang S S, Wu Y R, Wu P, Zheng S J. Cell wall polysaccharides are specifically involved in the exclusion of aluminum from the rice root apex. *Plant Physiology*, 2004, 146(2): 602-611.
- [70] Correa-Aragunde N, Lombardo C, Lamattina L. Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytologist*, 2008, 179(2): 386-396.
- [71] Paris R, Lamattina L, Casalongue C A. Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 45(1): 80-86.
- [72] Pacoda D, Montefusco A, Piro G, Dalessandro G. Reactive oxygen species and nitric oxide affect cell wall metabolism in tobacco BY-2 cells. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161(10): 1143-1156.
- [73] Xiong J, An L Y, Lu H, Zhu C. Exogenous nitric oxide enhances cadmium tolerance of rice by increasing pectin and hemicellulose contents in root cell wall. *Planta*, 2009, 230(4): 755-765.
- [74] Zhang Z Y, Wang H H, Wang X M, Bi Y R. Nitric oxide enhances aluminum tolerance by affecting cell wall polysaccharides in rice roots. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(9): 1701-1711.
- [75] 何虎翼, 何龙飞, 黎晓峰, 顾明华. 铝胁迫下硝普钠对黑麦和小麦根尖细胞壁铝吸附的影响. *广西农业生物科学*, 2007, 26(3): 235-239, 249-249.
- [76] Tian Q Y, Sun D H, Zhao M G, Zhang W H. Inhibition of nitric oxide synthase (NOS) underlies aluminum-induced inhibition of root elongation in *Hibiscus moscheutos*. *New Phytologist*, 2007, 174(2): 322-331.
- [77] Qiu Z B, Guo J L, Zhang M M, Lei M Y, Li Z L. Nitric oxide acts as a signal molecule in microwave pretreatment induced cadmium tolerance in wheat seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013, 35(1): 65-73.
- [78] Talukdar D. Arsenic-induced oxidative stress in the common bean legume, *Phaseolus vulgaris* L. seedlings and its amelioration by exogenous nitric oxide. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2013, 19(1): 69-79.
- [79] Verma K, Mehta S K, Shekhawat G S. Nitric oxide (NO) counteracts cadmium induced cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species (ROS) in *Brassica juncea*: cross-talk between ROS, NO and antioxidant responses. *Biometals*, 2013, 26(2): 255-269.
- [80] Ye Y, Lin Z, Xing D. Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. *Plant, Cell and Environment*, 2013, 36(1): 1-15.
- [81] Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Deckert J, Rucińska-Sobkowiak R, Gzyl J, Pawlak-Spradaa S, Abramowski D, Jelonek T, Gwóźdzka E A. Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2012, 58: 124-134.
- [82] Innocenti G, Pucciariello C, Gleuher M L, Hopkins J, De Stefano M, Delledonne M, Puppo A, Bandouin E, Frendo P. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta*, 2007, 225(6): 1597-1602.
- [83] Elviri L, Speroni F, Careri M, Mangia A, Sanità di Toppi L, Zottini M. Identification of *in vivo* nitrosylated phytochelatins in *Arabidopsis thaliana* cells by liquid chromatography-direct electrospray-linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, 1217(25): 4120-4126.
- [84] Maksymiec W. Signaling responses in plants to heavy metal stress. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2007, 29(3): 177-187.