

NO 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的促进作用研究 Enhancement of Hypericin Production and Cell Growth of *Hypericum perforatum* L. Suspension Cultures by Nitric Oxide

徐茂军*, 董菊芳, 张 刚

XU Mao-Jun*, DONG Ju-Fang and ZHANG Gang

浙江工商大学 生物工程系, 杭州 310035

Department of Bioengineering, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310035, China

摘 要 一氧化氮(NO)是近年来发现的一种新型植物信号分子。以硝普钠(Sodium nitroprusside, SNP)为一氧化氮(NO)的供体,研究外源 NO 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的影响。试验结果表明,金丝桃悬浮细胞在含 0.5 和 15.0 mmol/L SNP 的培养基中培养 20d 后,细胞的干重分别为对照组的 140%和 50%;细胞中金丝桃素的含量分别为对照组的 98%和 210%。试验结果表明,低浓度 SNP 处理有利于金丝桃悬浮细胞生长,而高浓度 SNP 可以促进金丝桃素的合成。在细胞培养初期(0d)加入 0.5 mmol/L SNP 并在指数生长后期(14d)加入 15.0 mmol/L SNP 的金丝桃悬浮细胞在培养 25d 后,细胞的干重和金丝桃素的含量分别为对照组的 1.4 和 1.8 倍,金丝桃素的产量达 15.2 mg/L,比对照高 3.2 倍。SNP 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素含量的影响可以被 NO 专一性淬灭剂 CPITO(2,4-carboxyphenyl-4,4',5,5'-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide)所抑制,说明 SNP 是通过其分解产物 NO 影响细胞生长和金丝桃素的合成。试验结果同时表明,在 15.0 mmol/L 的 SNP 处理下,金丝桃悬浮细胞中的苯丙氨酸解氨酶(PAL)的活性显著升高,推测 NO 可能通过触发金丝桃悬浮细胞的防卫反应,激活了细胞中金丝桃素的生物合成途径。

关键词 一氧化氮, 金丝桃细胞, 金丝桃素, 苯丙氨酸解氨酶(PAL)

中图分类号 Q813.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2005)01-0066-05

Abstract Nitric oxide has emerged as a key signaling molecule in plants recently. The role of nitric oxide in elicitor-induced defense responses of plants has been extensively investigated. In this work, sodium nitroprusside was utilized as the donor of nitric oxide to investigate the effects of exogenous nitric oxide on hypericin production and cell growth of suspension cell cultures of *Hypericum perforatum* L.. Compared with the untreated *Hypericum perforatum* L. suspension cells, external application of 0.5 and 15.0 mmol/L sodium nitroprusside induced 1.4 and 0.5-fold dry cell weight, and 0.9 and 2.1-fold hypericin content respectively. The results showed that low concentration of sodium nitroprusside promoted the growth of *Hypericum perforatum* L. suspension cells, while high concentration of sodium nitroprusside enhanced hypericin biosynthesis in *Hypericum perforatum* L. suspension cells. The maximum hypericin production was achieved by adding 0.5 mmol/L and 15.0 mmol/L sodium nitroprusside to the culture at day 0 and day 14 respectively, increasing the total hypericin yield by nearly 3.2-fold. The effects of sodium nitroprusside on hypericin content and growth of *Hypericum perforatum* L. suspension cells were abolished by nitric oxide specific

Received: May 17, 2004; Accepted: August 17, 2004.

This work was supported by Grant from the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. 302785) and the Key Scientific Project of Zhejiang Province (No. 001101110).

* Corresponding author. Tel: 86-571-88921075; E-mail: maojunxu@163.com

浙江省自然科学基金(No. 302785)和浙江省科技计划重点项目(No. 001101110)资助。

scavenger 2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide, which indicated that the effects of the application of sodium nitroprusside were caused by nitric oxide released from sodium nitroprusside rather than sodium nitroprusside itself. The results also showed that 15.0 mmol/L sodium nitroprusside stimulated the activities of phenylalanine ammonia-lyase (PAL), one of the key enzymes of phenylpropanoid pathway, in suspension cells of *Hypericum perforatum* L., which suggested that the synthetic pathway of hypericin might be activated by NO through triggering the defense responses of *Hypericum perforatum* L. suspension cells.

Key words nitric oxide, *Hypericum perforatum* L. suspension cells, hypericin, phenylalanine ammonia-lyase (PAL)

利用植物细胞培养技术生产目的次生代谢产物是解决植物自然资源短缺问题的有效途径。然而植物培养细胞中次生代谢产物含量低一直是制约该项技术产业化应用的主要因素。因此,如何提高植物培养细胞中次生物质的产量是植物细胞培养技术的重点研究内容之一。研究表明,在病原物侵染和微生物诱导子处理等逆境胁迫情况下,植物体内的次生代谢途径被激活,次生物质合成加强^[1,2]。因此,植物细胞中次生代谢产物的合成积累被广泛认为是植物对病原物或微生物诱导子等逆境胁迫的响应结果之一^[3]。利用病原物和微生物诱导子及其信号转导途径中的信使物质,如水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)等处理植物细胞,是提高植物细胞中次生代谢物质含量的常用策略之一^[4-6]。

NO 是一类脂溶性的可扩散小分子物质,可以作为细胞内或细胞间的信号分子^[7]。NO 在人体及动物神经、心血管和免疫系统中的作用已引起了人们的广泛关注^[8]。最近的研究表明,在植物细胞中存在着与哺乳动物类似的 NO 合成酶(nitric oxide synthase, NOS)^[9]。由 NOS 催化形成的 NO 在植物体内具有促进种子萌发、植株根和叶的生长发育以及诱发植物防卫反应和防御基因活化等多种功能^[10-13]。NO 已成为引人注目的一种新型植物信号分子。研究表明,NO 是介导病原物和微生物诱导子诱发植物防卫反应所必需的信号分子之一^[14-16]。然而目前有关利用外源 NO 提高金丝桃等药用植物细胞中次生代谢物质产量的研究报道尚不多见。

金丝桃素是存在于金丝桃植株中的一种生物活性物质。研究表明,金丝桃素能抑制应激所致的皮质醇升高,提高夜间褪黑素的水平,调整昼夜节律改善睡眠,对中枢神经系统亦有激活松弛作用,对抑郁症患者的情绪具有明显的改善作用^[17,18]。此外,金丝桃素还具有抑制 DNA 或 RNA 病毒的转录作用,对艾滋病等病毒具有一定的抑制作用。由于天然金丝桃植物生长速度较慢并且金丝桃素的含量较低(0.01%~0.04%),因此利用细胞培养法生产金

丝桃素是解决金丝桃自然资源短缺问题的一条有效途径。本文以硝普钠(SNP)作为 NO 的供体,比较系统地研究了外源 NO 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素生物合成的影响,并对 NO 影响金丝桃素生物合成的机理进行了初步探讨。

1 材料和方法

1.1 金丝桃悬浮细胞培养

金丝桃植株采自浙江天目山。金丝桃愈伤组织的诱导按下述方法进行:植株幼茎经自来水反复冲洗干净后,用蒸馏水冲洗,剪成 3cm 左右的小段,分别用 75% 酒精浸泡 10~20s 和 0.1% HgCl₂ 溶液浸泡 10~20min,经无菌水浸洗后,在无菌滤纸上切割成 0.5 cm 左右的小段,接种于 MS 培养基(1 × 10⁻⁵ mmol/L 2,4-D 和 2 × 10⁻⁶ mmol/L BA, 7.5 g/L 琼脂, pH 5.8, 121℃ 灭菌 15 min)上, 25℃ 暗培养。1 周后将诱导的愈伤组织转接到新鲜的 MS 培养基上,继代培养 2 个月后,再转接到 MS 液体培养基上(2 × 10⁻⁵ mmol/L 2,4-D 和 3 × 10⁻⁶ mmol/L BA), 25℃ 转速 120 r/min 下黑暗振荡培养,每 10d 按 1:15(接种量 10 mL)的体积转接 1 次。实验所用的金丝桃悬浮细胞已经过 50 次左右的继代培养,具有稳定的形态特征和生长速率。

1.2 金丝桃悬浮细胞的 NO 处理

以硝普钠(SNP)为一氧化氮(NO)的供体。SNP 溶液经 0.22μm 滤膜过滤后直接加入到灭菌后的培养基中,或在细胞培养的不同时期添加到培养基中。控制 SNP 的添加量使培养液中 SNP 浓度达到所需值。

1.3 金丝桃素含量的测定

细胞培养物在 50℃ 干燥至恒重,研碎。称取样品 2.0g 左右,用 60% 乙醇 50mL 浸提,振摇 40min。用 30% 乙醇定容至 100mL,过滤。金丝桃素含量的测定按文献[19]的方法进行。

1.4 金丝桃悬浮细胞中 PAL 酶活性的测定

不同处理的金丝桃悬浮细胞以 1000 × g 离心

5min, 收集沉淀细胞, 按 1:2 (V/W; mL/g) 的比例加入提取液 (50.0 mmol/L pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液, 10.0mmol/L 巯基乙醇, 4.0mmol/L EDTA, 1.0 μ mol/L 亮抑蛋白酶肽), 冰浴中研细, -4℃ 下, 10000 $\times$ g 离心 15min。取上清液 1mL 按文献[20]的方法测定 PAL 酶活性。PAL 酶活性单位以 (nmol 反式肉桂酸)/mg 蛋白质 $\times$ h 表示。

1.5 细胞干重测定方法

不同处理的金丝桃悬浮细胞以 1000 $\times$ g 离心 5min, 收集沉淀细胞, 50℃ 真空干燥至恒重。

2 结果

2.1 NO 对金丝桃悬浮细胞生长的影响

在细胞接种前分别向培养基中添加 0.5、15.0mmol/L 的 SNP 和 20mmol/L 的 NO 淬灭剂 CPITO, 考察不同浓度的 NO 对金丝桃悬浮细胞生长的影响, 结果见图 1。试验结果表明, 低浓度的 SNP (0.5mmol/L) 对金丝桃悬浮细胞的生长具有明显的促进作用, 表现为细胞生长的延滞期缩短; 细胞生长速率和细胞干重大于对照 (图 1)。高浓度 SNP (15.0mmol/L) 对金丝桃悬浮细胞的生长则具有明显的抑制作用。CPITO (2-4-carboxyphenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide) 能够快速并且专一地与 NO 反应, 是一种常用的 NO 淬灭剂^[15,16]。为了进一步验证添加 SNP 对金丝桃悬浮细胞生长的影响是否确实由其分解产物 NO 引起, 在添加不同浓度 SNP 的同时加入了 20mmol/L 的 CPITO。试验结果表明, 在 CPITO 存在的情况下, 添加 15.0mmol/L SNP 不影响金丝桃悬浮细胞的生长 (图 1), 说明 SNP 是通过其分解产物 NO 影响金丝桃悬浮细胞的生长。

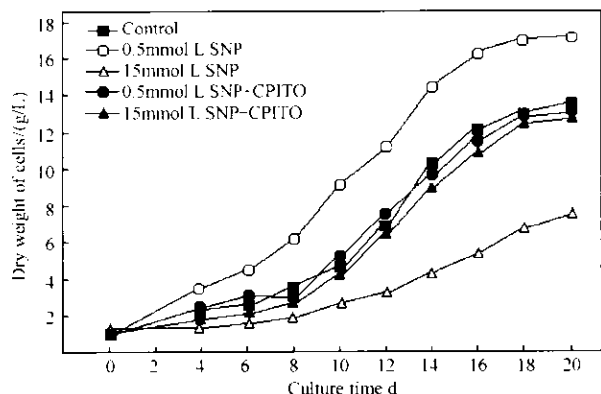


图 1 不同浓度 SNP 处理下金丝桃悬浮细胞的生长曲线
Fig.1 Growth curve of *Hypericum perforatum* L. suspension cells treated with different concentrations of SNP

SE of DCW < 8%, n = 4.

2.2 NO 对金丝桃悬浮细胞中金丝桃素合成的影响

在添加不同浓度 SNP 培养基中生长的金丝桃细胞中金丝桃素含量的变化情况如图 2 所示。培养基中添加 15.0mmol/L 的 SNP 可以显著提高单位重量金丝桃细胞中的金丝桃素含量, 而添加 0.5mmol/L 的 SNP 对金丝桃细胞中金丝桃素的含量无影响。试验结果同时表明, 在 CPITO 存在的情况下, 添加 15.0mmol/L 的 SNP 不影响金丝桃悬浮细胞中金丝桃素的含量 (图 2), 表明 SNP 是通过其分解产物 NO 促进金丝桃悬浮细胞中金丝桃素的合成。

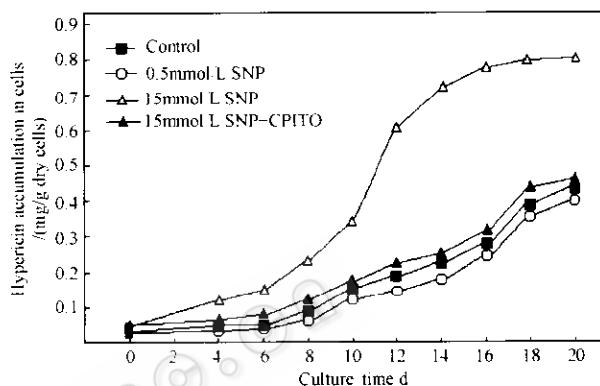


图 2 不同浓度 SNP 处理下金丝桃悬浮细胞中金丝桃素含量的变化情况

Fig.2 Time courses of hypericin accumulation in *Hypericum perforatum* L. suspension cells treated with different concentrations of SNP

SE of hypericin contents < 10%, n = 4.

2.3 NO 对金丝桃悬浮细胞中 PAL 活性的影响

金丝桃素是金丝桃植物中的黄酮甙类化合物^[17]。苯丙烷代谢途径是金丝桃素等黄酮类次生代谢物质生物合成的共同途径, 苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 是苯丙烷代谢途径的主要关键酶之一^[21]。本文考查了不同浓度 SNP 对金丝桃悬浮细胞中 PAL 活性的影响, 实验结果见图 3。与对照相比, 添加高浓度 SNP (15.0mmol/L) 可以显著提高金丝桃悬浮细胞中 PAL 活性 (图 3)。在 15.0mmol/L 的 SNP 处理 30min 后, 金丝桃细胞中 PAL 活性开始出现增加, 并且在第 8~9 天时达到最高, 比相同培养时期的对照细胞中的 PAL 活性高出 4 倍多 (图 3)。SNP 对金丝桃悬浮细胞中 PAL 活性的促进作用亦可被 CPITO 所抑制 (图 3), 说明 SNP 也是通过其分解产物 NO 影响细胞中 PAL 活性的。

2.4 细胞生长不同时期添加 SNP 对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素产量的影响

以上试验结果表明高浓度 SNP 能够促进金丝

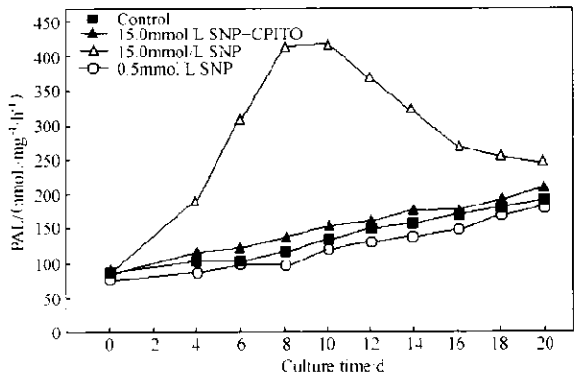


图3 不同浓度 SNP 处理下金丝桃悬浮细胞中苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性的变化情况

Fig.3 Time courses of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activities in *Hypericum perforatum* L. suspension cells treated with different concentrations of SNP
SE of PAL activities < 11%, n = 4.

桃悬浮细胞中金丝桃素的合成,但抑制细胞的生长,而低浓度 NO 可以促进金丝桃悬浮细胞生长。为了获得 NO 对金丝桃悬浮细胞生长和金丝桃素合成促进作用的最佳效果,我们在细胞培养初期添加低浓度的 SNP(0.5mmol/L),并在细胞培养的不同时期分别加入高浓度 SNP(15.0mmol/L),培养 25d 后,测定细胞干重和金丝桃素的含量,结果见表 1。试验结果表明,在细胞的对数生长后期(14d)添加高浓度的 SNP(0.5mmol/L),对细胞干重和单位重量细胞中金丝桃素的含量均具有显著促进作用(表 1)。与对照相比,在培养第 14 天时添加 15.0mmol/L 的 SNP 使金丝桃培养细胞的金丝桃素总产量增加了 3.2 倍。

表 1 细胞生长不同时期添加 SNP(15.0mmol/L)对金丝桃悬浮细胞生长及金丝桃素产量的影响

Table 1 Effects of SNP (15.0mmol/L) added at different growth stages on hypericin production and dry cell weight (DCW) in suspension cell cultures of *Hypericum perforatum* L. (harvested on day 25)

Day of SNP addition	DCW	hypericin per cell	Total hypericin
/d	/g(L)	/mg(g)	/mg(L)
Control	12.1 ± 0.4	0.4 ± 0.1	4.8 ± 0.2
0	8.4 ± 0.2	0.9 ± 0.1	6.7 ± 0.2
2	10.7 ± 0.3	0.8 ± 0.1	8.6 ± 0.3
6	11.8 ± 0.5	0.9 ± 0.1	8.3 ± 0.5
10	13.5 ± 0.4	0.9 ± 0.1	9.4 ± 0.5
14	16.9 ± 0.7	0.9 ± 0.1	15.2 ± 0.6
18	17.3 ± 0.5	0.7 ± 0.1	12.1 ± 0.5
24	17.8 ± 0.7	0.5 ± 0.1	8.9 ± 0.3

The values are given as means ± SE. (n = 3).

3 讨论

NO 是动物体内一种重要的信号分子^[8],NO 在动物体内的作用已为人们所熟知。最近的研究报道表明植物也具有合成 NO 的能力^[9]。NO 在植物生长发育、种子萌发、抗病反应中的作用引起了研究者的广泛重视^[10-15]。本文试验结果表明,添加不同浓度的硝普钠(SNP)可以促进金丝桃悬浮细胞的生长和细胞中金丝桃素的合成。SNP 对金丝桃悬浮细胞生长和金丝桃素合成的促进作用可以被 NO 专一性淬灭剂 CPITO 所抑制,表明由 SNP 分解产生的 NO 具有促进金丝桃悬浮细胞的生长和金丝桃素合成的功能。

NO 对金丝桃悬浮细胞中金丝桃素合成的促进作用可能与 NO 能够激活金丝桃悬浮细胞的防卫反应有关。大量的试验表明,在病原物或诱导子等逆境胁迫下植物能够产生 NO,NO 作为信号分子可以活化烟草、拟南芥等植物的防御反应^[14-16]。苯丙烷代谢途径是植物细胞中许多防御性次生物质合成代谢的共同途径,苯丙氨酸解氨酶(PAL)是这一途径的第一关键酶^[21]。在各种生物逆境胁迫下,植物细胞的特征反应之一是苯丙烷代谢途径的激活^[22],因此苯丙烷代谢途径的关键酶 PAL 活性被广泛用作植物防御反应激活的指标。本文的试验结果表明,高浓度 SNP 处理可以诱发金丝桃悬浮细胞 PAL 的活化,而 SNP 对金丝桃悬浮细胞中 PAL 的活化作用可以被 NO 淬灭剂 CPTIO 抑制,表明由 SNP 分解释放的 NO 是激活金丝桃悬浮细胞防御反应的充分条件。这与其它植物上的试验结果基本一致。据文献报道,NO 是诱发拟南芥、烟草、水稻等植物细胞中抗病相关基因的表达、细胞过敏反应(HR)等防御反应所必需的信号分子^[15-16]。由于包括金丝桃素在内的植保素类次生代谢物质合成是植物细胞防御反应的结果之一^[3],因此 NO 作为信号分子可能通过触发金丝桃悬浮细胞的防御反应,激活金丝桃悬浮细胞中金丝桃素的合成代谢途径,使金丝桃素的合成加强。

除了和其它诱导子一样能够触发植物细胞的防御反应,激活细胞中次生物质的合成代谢途径外,NO 还具有促进金丝桃细胞生长的特殊功能。本文试验结果表明,0.5mmol/L 的 SNP 处理对金丝桃细胞生长具有明显的促进作用,而且 SNP 对金丝桃细胞生长的促进作用可以被 CPITO 所抑制,说明由低浓度 SNP 分解产生的 NO 可以促进金丝桃细胞生

长。虽然目前对 NO 影响植物细胞生长的作用机制尚不十分清楚,但这种现象似乎是普遍存在的。Anderson 等人发现用低于 20×10^{-6} 的 NO 处理番茄植株可以促进其生长,而当 NO 浓度超过 40×10^{-6} 时则抑制番茄的生长^[23],在豌豆、莴笋等植物中也发现类似的情况^[24,25]。由于一般微生物诱导子或者信号分子,如茉莉酸(JA)、水杨酸(SA)等对植物细胞的生长都具有抑制作用^[4-6],因此 NO 在促进植物细胞生长方面表现出一般诱导子所没有的特点。

综上所述,本文试验结果表明外源 NO 能够触发金丝桃悬浮细胞的防卫反应,激活金丝桃素的合成代谢途径,使金丝桃素的合成加强,说明 NO 具有典型的诱导子特征。由于 NO 是一种脂溶性的小分子物质,能够快速自由的透过细胞膜^[7],因此 NO 是一种值得重视的新型高效化学诱导子。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Yedidia I, Shores M, Kerem Z *et al.* Concomitant induction of systemic resistance to *Pseudomonas syringae* pv. lachrymans in cucumber by *Trichoderma asperellum* (T-203) and accumulation of phytoalexins. *Appl Environ Microbiol*, 2003, **69** (12): 7343–7353
- [2] Ebel J, Schmidt WE, Loyal R. Phytoalexin synthesis in soybean cells: elicitor induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs and correlation with phytoalexin accumulation. *Arch Biochem Biophys*, 1984, **232** (1): 240–248
- [3] Kandan A, Commare RR, Nandakumar R *et al.* Induction of phenylpropanoid metabolism by *Pseudomonas fluorescens* against tomato spotted wilt virus in tomato. *Folia Microbiol (Praha)*, 2002, **47** (2): 121–129
- [4] Wu J, Lin L. Enhancement of taxol production and release in *Taxus chinensis* cell cultures by ultrasound, methyl jasmonate and in situ solvent extraction. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**: 151–155
- [5] Yukihito Y, Homare T, Yosuka H. Methyl jasmonate-induced over production of paclitaxel and baccatin III in *Taxus* cell suspension cultures. *Nat Biotechnol*, 1996, **14**: 1129–1132
- [6] Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar K. Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell*, 1997, **9**: 261–270
- [7] Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist*, 2003, **1**: 11–22
- [8] Guan YY, Lin MJ. The role of NO in human immunity system. *New Medicine*, 1999, **30** (1): 55–57
- [9] Guo FQ, Okamoto M, Crawford NM *et al.* Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science*, 2003, **302** (5642): 100–103
- [10] Morot-Gaudry-Talarmain Y, Rockel P, Moureaux T, *et al.* Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense plants. *Planta*, 2002, **215**: 708–715
- [11] Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta*, 2000, **210**: 215–222
- [12] Delledonne M, Zeier J, Marocco A *et al.* Signal interaction between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 13454–13459
- [13] Hu XY, Neill SJ, Cai WM *et al.* NO-mediated hypersensitive responses of rice suspension cultures induced by incompatible elicitor. *Chinese Science Bulletin*, 2003, **48** (4): 358–363
- [14] Xu MJ, Dong JF, Zhu MY. Involvement of NO in fungal elicitor-induced PAL activation and taxol biosynthesis in *Taxus chinensis* suspension cells. *Chinese Science Bulletin*, 2004, **10**: 1756–1762
- [15] Durner J, Wendehenne D, Klessig DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**: 10328–10333
- [16] Delledonne M, Xia Y, Dixon RA *et al.* Nitric oxide functions as a secondary signal in plant disease resistance. *Nature*, 1998, **394**: 585–588
- [17] Gaster B, Holroyd J. St John's Wort for depression: A systematic review. *Arch Intern Med*, 2000, **160**: 152–156
- [18] Philipp M, Kohnen R, Hiller K-O. Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomized multicentre study of treatment for eight weeks. *British Medical J*, 1999, **319**: 134–139
- [19] Piovan A, Filippini R, Borsarini A *et al.* Flow injection analysis mass spectrometry, a tool to investigate the problems in the quantitative analysis of hypericin using reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, **18** (1): 131–132
- [20] Grant JJ, Loake GJ. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol*, 2000, **124**: 21–30
- [21] Jones DH. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochemistry*, 1984, **23**: 1349–1359
- [22] Phllinen RI, Korhonen MS, Tauriainen AA. Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch. *Plant Physiol*, 2002, **130**: 549–560
- [23] Anderson L, Mansfield TA. The effects of nitric oxide on the growth of tomato. *Environmental Pollution*, 1979, **20**: 113–121
- [24] Hufton CA, Besford RT, Welburn AR. Effects of NO (+ NO₂) pollution on growth, nitrate reductase activities and associated protein contents in glasshouse lettuce growth hydroponically in winter CO₂ enrichment. *New Phytologist*, 1996, **133**: 495–501
- [25] Leshem YY, Haramaty E. The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J Plant Physiol*, 1996, **148**: 258–263