

植物体中一氧化氮的检测方法及其应用

张丽丽^{1,2}, 周杰^{1,*}

山东农业大学¹化学与材料科学学院,²园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018

Methods for Determining Nitric Oxide in Plants and Their Applications

ZHANG Li-Li^{1,2}, ZHOU Jie^{1,*}

¹College of Chemistry and Material Science, ²College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China

摘要: 文章介绍植物体中NO的各种检测方法及其应用的研究进展。

关键词: 一氧化氮; 检测; 植物

一氧化氮(NO)是一种具有水溶性和脂溶性的气体分子,自1992年被《科学》杂志评为“年度分子”后(Koshland 1992),关于NO的生物学研究大量涌现,并成为生命科学领域研究的热点之一。早在上世纪70年代,人们就发现植物能释放NO,并对其生长产生影响(Klepper 1979; Anderson和Mansfield 1979)。直到1998年人们发现NO可以作为植物抗病反应的信号分子后(Delledonne等1998; Durner等1998),NO的植物生物学研究才引起人们的广泛关注。研究发现,NO是植物体中普遍存在的关键信号分子(Durner和Klessig 1999),参与植物的多种生理过程,例如能够促进根和叶片的生长发育(Gouvêa等1997; Corpas等2006),促进种子休眠和需光种子的萌发(Beligni和Lamattina 2000; Sarath等2006),延缓果实的成熟与衰老(朱树华等2004; Zhu等2006; Zhu和Zhou 2007),并在植物受到生物胁迫和非生物胁迫时参与其抗逆反应(Zhao等2001; Shi等2005; Wang等2006)。由于NO在植物体内有如此多的作用,因而如何快速、灵敏和直接地对其进行检测显得非常重要。但NO的半衰期短,仅为3~5 s,极易被氧化,在植物体内含量极低,因此给检测带来诸多困难。迄今直接检测植物体中NO的方法并不多,一些比较成熟的检测动物体内NO的方法还难以直接应用于植物组织内NO的检测,为了促进植物体内NO检测方法研究的深入,本文就检测植物体内NO的方法及其研究进展作一介绍。

1 化学发光法

NO能被臭氧(O₃)氧化成激发态NO₂^{*},NO₂^{*}在返回基态时发射波长为600~3 000 nm的光,因此通过发射光的检测可以实现NO的定量测定。此方法具有较高的灵敏度,目前在检测植物体内NO时仍常采用。Rockel等(2002)将叶片总面积约达500~1 000 cm²的整株向日葵(*Helianthus annuus*)或菠菜(*Spinacia oleracea*)转移到实验装置中,植物上部放在连续搅拌的釜式反应器内,其生成的NO气体进入反应室中与O₃作用,检测发光强度就可测定出NO量。Planchet等(2005)也用此法成功检测了烟叶(*Nicotiana tabacum*)及其细胞悬浮液中释放的NO。此外,Planchet和Kaiser(2006)还通过大量实验,将该法与荧光法测定NO进行了比较,认为化学发光法测量气态NO比荧光法灵敏,荧光法无法检测到的低浓度(1 nmol·L⁻¹)NO用化学发光法则可以测定。尽管臭氧化学发光法有较高的灵敏度,但此法只能检测气相中NO,对于溶液中的NO必须用惰性气体将其抽提出来,但这易受样品中其他因素的干扰,因此其所测定的NO含量并不能完全代表组织细胞内的实际含量(Xu等2004)。

NO能为过氧化氢(H₂O₂)氧化生成ONOO⁻,而ONOO⁻作为一种强氧化剂能够氧化鲁米诺,使其

收稿 2007-01-25 修定 2007-07-15

* 通讯作者 (E-mail: zhoujie@sdau.edu.cn; Tel: 0538-8242174)。

呈激发态, 当其返回基态时即发出强光, 据此可以定量测定 NO。由于 NO_2^- 和 NO_3^- 均不能激发这一反应, 因此此法有较好的灵敏度和特异性而广泛应用于动物样品溶液中 NO 的测定(Kojima 等 1997; Yao 等 2002; Tsukada 等 2003)。但由于 H_2O_2 对植物体可能会产生伤害, 因而 NO 的功能分析受到限制(Xu 等 2004)。目前, 鲁米诺发光法一般用于测定植物体中的 H_2O_2 , 而用于 NO 的检测还有待研究。

2 分光光度法

NO 易被氧化生成 NO_2^- , 在酸性条件下溶液中的 NO_2^- 可与 Griess 试剂发生重氮化反应, 生成橙红色产物, 此产物在波长 550 nm 处有最大吸收峰, 吸光度与 NO_2^- 或 NO 的含量成正比, 以此可以测定 NO 的量。如 Abas 等(2006)在研究马来西亚一些传统蔬菜抑制 NO 产生时, 将培育的细胞悬浮液与等体积量的 Griess 试剂混合后, 测其在 550 nm 处的吸光度, 以此确定 NO 含量。Xu 等(2005a)将 Griess 试剂加入等量的贯叶连翘(*Hypericum perforatum*)细胞悬浮液中, 并在室温下反应 30 min 后, 根据其吸光度可以计算出贯叶连翘细胞释放的 NO 含量。此外, 人们在研究马铃薯(*Solanum tuberosum*, Beligni 和 Lamattina 2002)和蚕豆(*Vicia faba*, Sokolovski 等 2005)中 NO 的生理作用时, 也用此种方法测定 NO 供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)和 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺(S-nitroso-N-acetylpenicillamine, SNAP)释放的 NO 量。但由于此法测定的是 NO_2^- , 所以是一种间接测定 NO 的方法, 其选择性较差。

此外, 还可以根据 NO 与氧合血红蛋白(HbO_2)反应生成高铁血红蛋白(metHb)后, 其最大吸收波长会发生改变的原理检测波长 401 nm 和 421 nm 处吸光度的变化以确定 NO 含量变化。此法已广泛用于检测植物体释放 NO 的研究。Clarke 等(2000)先用过氧化氢酶和超氧化物歧化酶处理拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)细胞悬浮液除去活性氧(ROS)后, 加入 HbO_2 , 反应后再测其吸收度, 从而确定 NO 的释放量。他们的实验表明, 拟南芥在受到病原体侵染后, 细胞内 NO 的释放速率高达 $180 \text{ nmol} \cdot \text{g}^{-1} (\text{FW}) \cdot \text{h}^{-1}$ 。Orozco-Cárdenas 和 Ryan

(2002)将冷冻的番茄(*Lycopersicon esculentum*)叶片捣碎、均化、离心后, 采用此法测定其悬浮液释放的 NO 量的结果表明, 受伤的番茄叶中 NO 量并未增加, 但 NO 能抑制蛋白酶抑制剂基因的表达。另外还有人在采用此法测定贯叶连翘细胞(Xu 等 2005a)和大豆(*Glycine max*)初生根组织悬浮液(Hu 等 2005)的 NO 生成量中也获得成功。但血红蛋白除与 NO 作用外, 还能与活性氧等发生反应, 因此用此法难以准确检测 NO 的实际含量。

3 电化学法

电化学法是直接测定 NO 的一种常用方法, 主要包括还原法、氧化法及催化氧化法。是根据 NO 易失去电子被氧化后在正极发生电化学反应的原理, 通过测定反应产生的氧化电流大小检测 NO 的浓度(定天明等 2005)。此法能够实现溶液中 NO 的实时在线检测, 而且灵敏度高。Floryszak-Wieczorek 等(2006)用 Nafion 膜修饰的铂电极检测了属于常春藤叶型的蔓性天竺葵(*Pelargonium peltatum*)叶片中产生的 NO, 他们认为要实现目标植物组织或细胞产生的内源 NO 的在线检测, 电化学法似乎有一定的应用前景。此外, 人们通过电极的基础实验研究, 迄今已开发出几种商品化的 NO 微传感器, 其中 World Precision Instrument (WPI)公司开发的一系列传感器应用较多, 以电化学法检测植物体内 NO 时多采用此传感器。Yamasaki 等(1999)及 Yamasaki 和 Sakihama (2000, 2001)采用 WPI 公司生产的 ISO-NOP 电极检测 NO 量的结果表明, 从玉米(*Zea mays*)种子中提纯到的诱导型硝酸还原酶(iNR)和硝酸还原酶(NR)都能介导 NO 的产生, 而且 NR 介导 NO 产生时还受温度影响。但此法只能用于溶液中 NO 的检测, 且方法选择性不强。

4 电子顺磁共振波谱法

电子顺磁共振(EPR)又称电子自旋共振(ESR), 常用来检测和研究含有未成对电子的顺磁性物质。NO 分子含有一个未成对电子, 因此用 ESR 波谱测定比较适合。由于 NO 的寿命短, 需采用自旋捕获剂将其捕获形成稳定的自由基或配合物, 常采用的自旋捕获剂有血红蛋白(Hb)、有机化合物和亚铁配合物等。NO 被捕获后生成顺磁

性物质,在磁场作用下,未成对电子能级发生分裂,当外加的电磁波能量与电子分裂的能级差相等时,未成对电子即会发生跃迁,电子顺磁共振仪上即显示出信号,其信号强度与NO含量成正比,据此可测定NO量。

Mathieu等(1998)在温度77 K下用EPR检测到大豆根瘤中存在NO,实验表明NO与豆血红蛋白(Lb)形成的复合物Lb-NO在幼瘤中含量最高,但在衰老根瘤中却几乎不存在。Dordas等(2003)用N-甲基-D-葡萄糖胺(MGD)和硫酸亚铁(FeSO_4)制备成NO自旋捕获剂 Fe^{2+} -(MGD)₂,于室温下测定受缺氧胁迫的紫花苜蓿(*Medicago sativa*)根中NO生成量,其检测限为 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。Xu等(2004, 2005b)建立了一种用二乙基二硫代氨基甲酸(DETC)和 FeSO_4 捕获NO形成(DETC)₂- Fe^{2+} -NO三元配合物,再进行ESR扫描,于室温下直接或间接测定植物体内NO的方法。他们以培育6 d的小麦(*Triticum aestivum*)幼苗为试材,测定其组织萃取液中产生的NO量,以及受小麦条锈菌种CY22-2病原体感染后不同感染时间内NO变化的结果表明,感染24 h后NO量明显增加,48 h后快速减少,96 h后又再次增加,说明NO在小麦条锈病防御中起作用。Vanin等(2007)也以 Fe^{2+} -(DETC)₂为捕获剂测定菠菜叶中NO产生,结果表明,加入还原剂连二亚硫酸钠可以明显提高NO的捕获产率。Pagnussat等(2002)采用EPR波谱法测定经生长素处理的黄瓜(*Cucumis sativus*)根部产生NO的结果表明,生长素处理24 h后的NO释放量达到最高值,NO在黄瓜不定根形成过程中对生长素响应有调控作用。此外,ESR波谱法还曾用于检测拟南芥NO释放量的结果表明,受丁香假单胞菌感染后的拟南芥能够产生NO以防止细菌扩散(Modolo等2005)。但此法存在线性范围窄和设备昂贵等缺点。

5 荧光法

用荧光法测定NO有灵敏度高和操作简便的特点,应用前景比较广阔。有效的荧光探针如2,3-二氨基萘(DAN)、4,5-二氨基荧光素(DAF-2)及其衍生物等在测定植物NO中经常使用。

DAN与NO₂在酸性条件下能反应生成荧光物

质1-(H)-萘三唑,此物质在pH>10、激发波长为365 nm、发射波长为450 nm条件下具有很强的荧光效率,可用此物质间接测定NO含量。Wada等(2002)将此法用于狭叶龙舌兰(*Agave angustifolia*)的种子胚芽组织培养细胞中NO的检测,向组织细胞液中放入DAN,并在25℃下反应3 h后,用高效液相色谱分析产生的荧光物,据此建立了一种高效液相色谱—荧光测定NO的简便方法,其检测限为 $3.4 \text{ pmol}\cdot\text{g}^{-1}$ 细胞。他们用此法还分别检测了经不同培养时间和不同温度处理后的此种植物产生的NO量,显示此种植物细胞对环境变化是比较敏感的。

DAF-2不能直接和NO反应,而在有氧条件下可与NO的氧化物N₂O₃反应后形成强荧光物质三唑-荧光素(DAF-2T),此物质激发波长约为492 nm,发射波长为515 nm。DAF-2的醋酸盐衍生物二氨基乙酰乙酸荧光素(DAF-2DA)能够渗透进入细胞,在细胞中经过水解后释放出游离的DAF-2,再与NO的氧化物反应。据此认为,DAF-2DA可用于检测细胞中NO,而且不与活性氧作用,因而已在检测植物体内NO中得到广泛应用。Corpas等(2004)以DAF-2DA为探针,通过共聚焦激光扫描显微镜分析发现内源NO主要存在于豌豆(*Pisum sativum*)叶子的维管组织(木质部和韧皮部)中。另外,用荧光光谱仪还检测到豌豆叶中的过氧化物酶体内存在NO,而且NO参与豌豆叶片衰老的生理过程。Baudouin等(2006)采用此种荧光探针检测了受苜蓿根瘤菌感染的蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)产生的NO量。Wang等(2006)也用此探针测定到受紫外胁迫的云南红豆杉(*Taxus yunnanensis*)细胞内产生的NO量,并且产生的NO量随着时间进程而变化,在1.5~2 h内出现第1次高峰,7 h后达到最高峰。Garcês等(2001)用此探针测定到拟南芥受机械胁迫后细胞内NO量有所增加。此外,由于4-氨基荧光素(4-AF)不能与NO反应形成三唑环,其荧光强度不受NO影响,因此常用其醋酸盐衍生物4-AF-DA作为DAF-2的负对照(Beligni等2002; Hu等2005)。尽管DAF-2DA不与活性氧作用,但此法依然存在一些问题:如植物信号物质钙能促进荧光增强,因此

此种荧光探针可测出植物细胞内NO的变化,但这种荧光变化并不能反映溶液中NO的实际浓度。此外,在烟草表皮细胞和豌豆保卫细胞中,通常在其叶绿体中发现荧光较强,但这仅能反映DAF-2DA在这些细胞器中的积累而已(Neill等2003)。

3-氨基-4-甲氨基-2',7'-二氟荧光素(DAF-FM)本身仅有的荧光很弱,但在和NO反应后生成的苯并三氮唑衍生物,却能产生强烈的荧光,其激发波长约为495 nm,发射波长为515 nm。其衍生物DAF-FM DA是新一代用于NO定量检测的荧光探针,能够穿过细胞膜,进入细胞后可以在细胞内酯酶催化形成不能穿过细胞膜的DAF-FM后再与NO作用。与DAF-2DA相比,此探针反应形成的荧光产物受pH的影响较小,pH>5.5时不受pH的影响,而且产生的荧光更加稳定,检测灵敏度更高,在相同条件下其灵敏度可以提高近2倍,最低的检测浓度可以达到 $3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。目前此探针已广泛应用于细胞内的NO检测,Krause和Durner(2004)以DAF-FM为荧光探针,通过荧光显微镜检测到受细菌感染的拟南芥悬浮细胞能够产生NO,8 h后NO浓度明显增大。Bethke等(2004a)也用此探针成功测定了大麦(*Hordeum vulgare*)糊粉层中产生的NO,并证明在酸性条件下,大麦糊粉层细胞的原生质体中亚硝酸盐能通过非酶促还原途径直接产生内源NO。

尽管荧光法能够测定细胞内NO的产生和空间分布,并有一定的灵敏度,但此法仍有一些不足,如有些探针不能与NO直接作用,而是与NO的氧化产物反应,因此荧光强度不仅与NO产生量有关,还与NO的氧化产率和浓度有关,且在缺氧条件下是不适用的(Planchet和Kaiser 2006; Lim等2006)。

6 其他方法

除上述方法外,近年来质谱法和光声光谱法也常用于NO的检测。Conrath等(2004)将质谱仪膜进样口和限制性毛细管进样口相结合建立了一种快速、特效、非侵入式的测定各种器官组织内或整个植物释放NO的方法。此法能够区分氮同位素,而且能从同一样品中同时测出NO、O₂以及其他气体。Conrath等(2004)曾用该法测定了许多

植物如烟叶、豌豆、拟南芥及皱叶欧芹(*Petroselinum crispum*)等器官组织中释放的NO。Bethke等(2004a、b)研究大麦糊粉层中NO产生以及NO对拟南芥种子和大麦粒休眠的影响时也采用了质谱法。

光声光谱法也是一种非侵入式检测NO的方法,此法是以光声效应为基础的一种吸收光谱分析技术。当用稳定的并能连续可调的单色光(常用高压氙灯或激光器作光源)照射光声池中的样品时,激发态分子便在8~10 s或更短的时间内通过非辐射跃迁,将所吸收的光能转变为热能,后者为封闭于系统内的填充气体所吸收,并将其转变为气体分子的动能,在系统内产生周期性压力波动,这就是所谓的光声信号,它可为灵敏的微声器检测到,经前置放大器放大后即可用数据系统进行处理,从而获得光声信号随光波波长改变的曲线,即为光声光谱。光声信号强度与样品的浓度成正比,据此可进行样品的定量分析。此法在检测植物体内NO中显示出较高的灵敏度和重现性。Leshem和Pinchasov(2000)用此法检测采后草莓(*Fragaria anannasa*)和鳄梨(*Persea americana*)中释放的NO和乙烯含量的结果表明,未成熟果实中NO含量高,乙烯量低,而在成熟果实中恰好相反,其检测装置如图1所示。

此外,Mur等(2003)也将此法成功用于烟叶中NO测定。此后Mur等(2005)又将此法作了改进,从各个样品室出来的载气能通过电子阀有选择地进入测量系统,从而实现了多个样品的快速测定。他们用此法测定烟叶中NO产生量的结果表明,烟叶在受到细菌感染后体内可快速产生NO,从而诱导细胞死亡,防止病菌扩散。光声波谱法能否真正准确地测定出目标细胞中NO的浓度尽管还不清楚,但用此法测定的NO释放速率是可以反映NO的合成和反应速率的。

总之,NO作为一种信号分子,在植物体内有许多生理作用。近年来,关于NO在植物中的作用和信号转导机制的研究迅速增加。要准确揭示NO在植物体内的作用机制,建立一套能够定量测定细胞内NO合成和释放的方法非常重要,而且最好能够准确可靠地测定出细胞内NO作用位

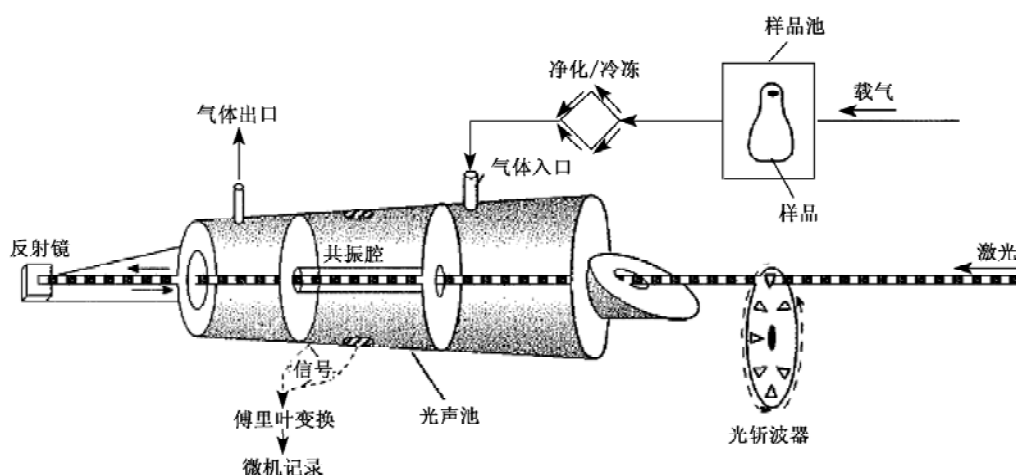


图1 气体光声光谱仪示意图(Leshem 和 Pinchasov 2000)

点上的NO量。这就意味着不论哪种检测方法,都应该可以直接检测NO,而非其他分子,同时也不能受其他分子干扰。但事实上,由于植物体内NO含量极低和反应性强等原因,NO的检测仍然存在一些问题,因此在研究NO的生理作用时,使用不同的NO供体处理试材,运用多种方法对同一样品进行检测,并使用NO的清除剂2-(4-羧基苯基)-4,4,5,5-四甲基咪唑-1-氧-3-氧化物(cPTIO)作负对照都是很有必要的。此外,要准确检测NO,对特异性荧光探针的合成、电化学传感器制备以及与光纤技术的结合应用等问题也应进一步研究。

参考文献

- 定天明, 陈坚, 张正行, 张奕华(2005). 生物体内一氧化氮的检测方法及其应用. 药学进展, 29 (5): 221~226
- 朱树华, 周杰, 束怀瑞(2004). 植物中一氧化氮与园艺产品的成熟和衰老. 植物生理学通讯, 40 (6): 733~740
- Abas F, Lajis NH, Israf DA, Khozirah S, Umi Kalsom Y (2006). Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables. Food Chem, 95 (4): 566~573
- Anderson LS, Mansfield TA (1979). The effects of nitric oxide pollution on the growth of tomato. Environ Pollut, 20 (2): 113~121
- Baudouin E, Pieuchot L, Engler G, Pauly N, Puppo A (2006). Nitric oxide is formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* functional nodules. Mol Plant Microbe Interact, 19 (9): 970~975
- Beligni MV, Lamattina L (2000). Nitric oxide stimulates seed

germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. Planta, 210 (2): 215~221

- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL (2002). Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. Plant Physiol, 129 (4): 1642~1650
- Beligni MV, Lamattina L (2002). Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. Plant Cell Environ, 25 (6): 737~748
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004a). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. Plant Cell, 16 (2): 332~341
- Bethke PC, Gubler F, Jacobsen JV, Jones RL (2004b). Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. Planta, 219 (5): 847~855
- Clarke A, Desikan R, Hurst RD, Hancock JT, Neill SJ (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. Plant J, 24 (5): 667~677
- Conrath U, Amoroso G, Köhle H, Sültemeyer DF (2004). Non-invasive online detection of nitric oxide from plants and some other organisms by mass spectrometry. Plant J, 38 (6): 1015~1022
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Quirós M, León AM, Romero-Puertas MC, Esteban FJ, Valderrama R, Palma JM, Sandalio LM et al (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. Plant Physiol, 136 (1): 2722~2733
- Corpas FJ, Barroso JB, Carreras A, Valderrama R, Palma JM, León AM, Sandalio LM, del Río LA (2006). Constitutive arginine-dependent nitric oxide synthase activity in different organs of pea seedlings during plant development. Planta,

- 224 (2):246~254
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature*, 394 (6693): 585~588
- Dordas C, Hasinoff BB, Igamberdiev AU, Manac'h N, Rivoal J, Hill RD (2003). Expression of a stress-induced hemoglobin affects NO levels produced by alfalfa root cultures under hypoxic stress. *Plant J*, 35 (6): 763~770
- Durner J, Klessig DF (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 2 (5): 369~374
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95 (17): 10328~10333
- Floryszak-Wieczorek J, Milczarek G, Arasimowicz M, Ciszewski A (2006). Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta*, 224 (6): 1363~1372
- Garcês H, Durzan D, Pedroso MC (2001). Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Ann Bot*, 87 (5): 567~574
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhães ACN, Martins IS (1997). NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul*, 21 (3): 183~187
- Hu X, Neill SJ, Tang Z, Cai W (2005). Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol*, 137 (2): 663~670
- Klepper L (1979). Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos Environ*, 13 (4): 537~542
- Kojima H, Kikuchi K, Hirobe M, Nagano T (1997). Real-time measurement of nitric oxide production in rat brain by the combination of luminol-H₂O₂ chemiluminescence and microdialysis. *Neurosci Lett*, 233 (2~3): 157~159
- Koshland DE Jr (1992). The molecule of the year. *Science*, 258 (5090): 1861
- Krause M, Durner J (2004). Harpin inactivates mitochondria in *Arabidopsis* suspension cells. *Mol Plant Microbe Interact*, 17 (2): 131~139
- Leshem YY, Pinchasov Y (2000). Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *J Exp Bot*, 51 (349): 1471~1473
- Lim MH, Xu D, Lippard SJ (2006). Visualization of nitric oxide in living cells by a copper-based fluorescent probe. *Nat Chem Biol*, 2 (7): 375~380
- Mathieu C, Moreau S, Frendo P, Puppo A, Davies MJ (1998). Direct detection of radicals in intact soybean nodules: presence of nitric oxide-leghemoglobin complexes. *Free Radic Biol Med*, 24 (7~8): 1242~1249
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Magalhaes JR, Salgado I (2005). Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett*, 579 (17): 3814~3820
- Mur LAJ, Santosa IE, Laarhoven L-JJ, Harren F, Smith AR (2003). A new partner in the danse macabre: the role of nitric oxide in the hypersensitive response. *Bulg J Plant Physiol*, (Special issue): 110~123
- Mur LA, Santosa IE, Laarhoven LJ, Holton NJ, Harren FJ, Smith AR (2005). Laser photoacoustic detection allows in planta detection of nitric oxide in tobacco following challenge with avirulent and virulent *Pseudomonas syringae* pathovars. *Plant Physiol*, 138 (3): 1247~1258
- Neill SJ, Desikan R, Hancock JT (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol*, 159 (1): 11~35
- Orozco-Cárdenas ML, Ryan CA (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol*, 130 (1): 487~493
- Pagnussat GC, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L (2002). Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol*, 129 (3): 954~956
- Planchet E, Gupta KJ, Sonoda M, Kaiser WM (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J*, 41 (5): 732~743
- Planchet E, Kaiser WM (2006). Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. *J Exp Bot*, 57 (12): 3043~3055
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM (2002). Regulation of nitric oxide (NO) by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J Exp Bot*, 53 (366): 103~110
- Sarath G, Bethke PC, Jones R, Baird LM, Hou G, Mitchell RB (2006). Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta*, 223 (6): 1154~1164
- Shi S, Wang G, Wang Y, Zhang L, Zhang L (2005). Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide*, 13 (1): 1~9
- Sokolovski S, Hills A, Gay R, Garcia-Mata C, Lamattina L, Blatt MR (2005). Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca²⁺ release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *Plant J*, 43 (4): 520~529
- Tsukada Y, Yasutake M, Jia D, Kusama Y, Kishida H, Takano T, Tsukada S (2003). Real-time measurement of nitric oxide by luminol-hydrogen peroxide reaction in crystalloid perfused rat heart. *Life Sci*, 72 (9): 989~1000
- Vanin AF, Bevers LM, Mikoyan VD, Poltorakov AP, Kubrina

- LN, van Faassen E (2007). Reduction enhances yields of nitric oxide trapping by iron–diethyldithiocarbamate complex in biological systems. *Nitric Oxide*, 16 (1): 71~81
- Wada M, Morinaka C, Ikenaga T, Kuroda N, Nakashima K (2002). A simple HPLC-fluorescence detection of nitric oxide in cultivated plant cells by *in situ* derivatization with 2,3-diaminonaphthalene. *Anal Sci*, 18 (6): 631~634
- Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX (2006). Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide*, 15 (4): 351~358
- Xu MJ, Dong JF, Zhu MY (2005a). Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiol*, 139 (2): 991~998
- Xu YC, Cao YL, Guo P, Tao Y, Zhao BL (2004). Detection of nitric oxide in plants by electron spin resonance. *Phytopathol*, 94 (4): 402~407
- Xu YC, Cao YL, Tao Y, Zhao BL (2005b). The ESR method to determine nitric oxide in plant. *Methods Enzymol*, 396: 84~92
- Yamasaki H, Sakihama Y (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett*, 468 (1): 89~92
- Yamasaki H, Sakihama Y (2001). Nitrate reductase as a producer of nitric oxide in plants: temperature-dependence of the enzymatic active nitrogen formation. In: PS2001 Proceedings: 12th International Congress on Photosynthesis. Australia: CSIRO Publ, S21-003
- Yamasaki H, Sakihama Y, Takahashi S (1999). An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci*, 4 (4): 128~129
- Yao D, Vlessidis AG, Evmiridis NP, Evangelou A, Karkabounas S, Tsampalas S (2002). Luminol chemiluminescence reaction: a new method for monitoring nitric oxide *in vivo*. *Anal Chim Acta*, 458 (2): 281~289
- Zhao Z, Chen G, Zhang C (2001). Interaction between reactive oxygen species and nitric oxide in drought-induced abscisic acid synthesis in root tips of wheat seedlings. *Aust J Plant Physiol*, 28 (10): 1055~1061
- Zhu SH, Liu MC, Zhou J (2006). Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. *Postharvest Biol Technol*, 42 (1): 41~48
- Zhu SH, Zhou J (2007). Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage. *Food Chem*, 100 (4): 1517~1522