

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika osakond

Marge Sepp

TAIMEOMASED LÄMMASTIKOKSIIDID

Bakalaureusetöö

Juhendaja: PhD Pille Mänd

Tartu 2014

Sisukord

Kasutatud lühendid	3
Sissejuhatus.....	5
1. Lämmastikoksiidide allikad	8
1.1 Antropogeenne lämmastikoksiidide saaste	8
1.2 Looduslikud lämmastikoksiidide allikad.....	9
2. Taimeomased lämmastikoksiidid	12
2.1 Taimeomaste lämmastikoksiidide omastamine ja süntees	12
2.2 Mõju taime funktsioneerimisele ja kasvule.....	16
2.3 Koosmõju teiste taimeomaste ühenditega	19
3. Keskkonnatingimused ja lämmastikoksiidid.....	23
3.1 Temperatuur	23
3.2 Niiskus ja sademed.....	25
3.2.1 Soolsus.....	26
3.3 Troposfääri osoonisisaldus	27
Kokkuvõte.....	30
Summary	32
Tänuõnad.....	34
Kasutatud kirjandus	35

Kasutatud lühendid

ABA – *abscisic acid* – õhulõhede sulgumist ja avanemist stimuleeriv taimehormoon, mille süntees suureneb stressiolukorras (näiteks veekadu, ekstreemsed temperatuurid), leidub kloroplastides ja plastitsiidides

ACC oksüdaas – *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxydase* – võtmeensüüm etüleen biosünteesis

cGMP - *cyclic guanosine monophosphate* – teisene signaalmolekul, mis mõjutab ABA-st stimuleeritud õhulõhede sulgumist

cPTIO – *2-(4-carboxyphenyl)-4,5-dihydro-4,4,5,5-tetramethyl-1H-imidazolyl-1-oxy-3-oxide* – orgaaniline radikaal, mis vähendab taimes lämmastikoksiidide hulka, vältimaks selle üleküllust

MDA – *malondialdehyde* – ROSi reaktsioonide tagajärjel tekkiv taimedele mürgine aine, mille koguse järgi organismis on võimalik määrata oksüdatiivse stressi taset.

NADPH – *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate* – elektrondonor, mis osaleb NOS indutseeritud lämmastikoksiidide sünteesil

NOS – *nitric oxide synthases* – lämmastikoksiide sünteesivad ensüümid, mis toodavad lämmastikoksiidi aminohappe L-arginiini abil.

NO_x – kokkuvõttev lühend, mille all mõeldakse lämmastikoksiidi (NO) ja lämmastikdioksiidi (NO₂)

NR – *nitrate reductase* – taimes üks peamine ensüüm lämmastikoksiidide sünteesiks, nitraadi reduktaasi kaasabil muudetakse nitraat (NO₃⁻) nitritiks (NO₂⁻), mõnel juhul ka lämmastikoksiidiks.

NiR – *nitrite reductase* – ensüüm, mis katalüüsib nitriti (NO₂⁻) redutseerimist ammooniumiooniks (NH₄⁺)

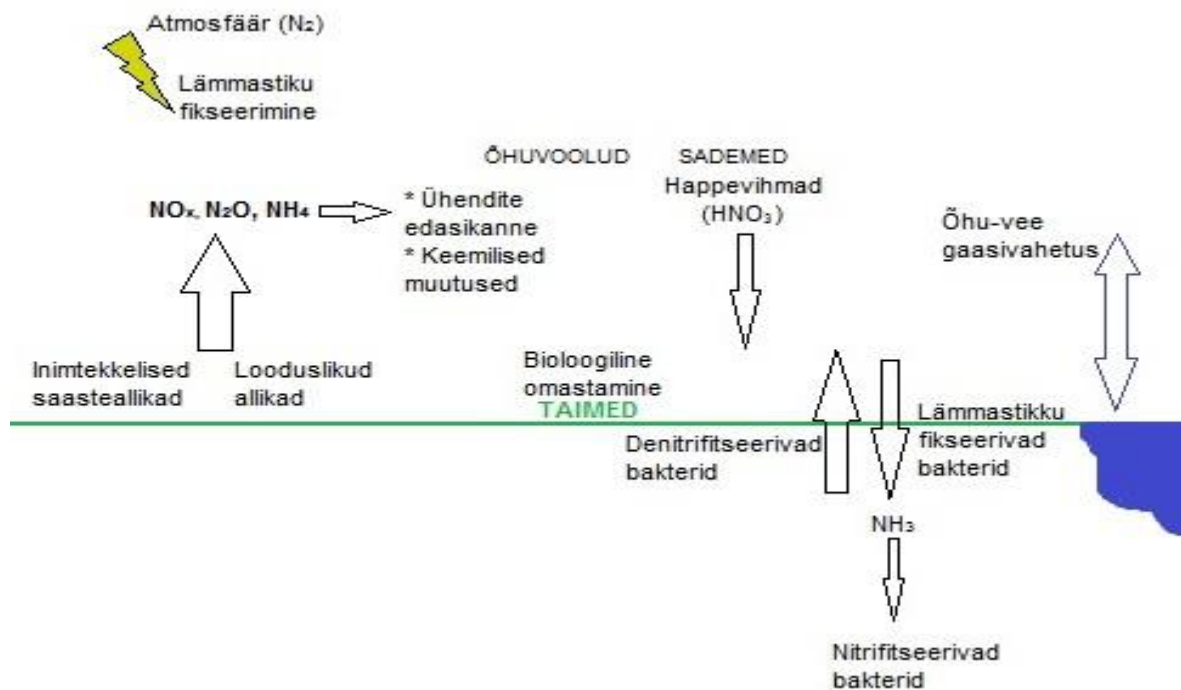
NiNOR – *nitrite-NO reductase* – ensüüm, mille kaasabil muudetakse nitrit (NO₂⁻) lämmastikoksiidiks (NO)

ROS – *reactive oxygen species* – keemiliselt aktiivsed hapnikühendid, mis on olulised raku signaalmolekulid, kuid liiges koguses põhjustavad taimes oksüdatiivset stressi ja rakusurma.

SNP – *sodium nitroprusside* – lämmastikoksiidi doonor, mis stressiolukorras vabastab NO, vähendamaks reaktiivsete hapnikuühendite toksilisust taimes

Sissejuhatus

Lämmastiksaastet tekitavate tööstusharude kiire kasvu tagajärjel on suurenenud lämmastikoksiidide sisaldus atmosfääris ning sellest tulenevalt on lämmastikoksiide kui saasteainet väga palju uuritud (Aneja jt. 2012). Näiteks on avastatud, et kõige enam toodetakse lämmastikoksiide linnastunud aladel, kuna seal on palju lämmastikoksiide emiteerivaid liiklusvahendeid ning tööstusharusid (Vitousek jt. 1997; Galloway jt. 2004). On leitud, et lämmastikoksiidid on inimtervisele kahjulikud, tekitades kopsuturset ning mõjutades kesknärvisüsteemi (Kampa ja Castanas, 2008). Lisaks inimtervise kahjustamisele tekitavad lämmastikoksiidid keemiliste reaktsioonide tagajärjel ka ümbritsevas keskkonnas erinevaid probleeme, mida saab vaadata globaalsel ja lokaalsel tasandil. Suurimad globaalsed probleemid, mida lämmastikoksiidid endaga kaasa toovad on osoonikihi lagunemine ning globaalne soojenemine (VanLoon ja Duffy, 2011). Lokaalse probleemina võib vaadata happevihmade teket (VanLoon ja Duffy, 2011). Lisaks inimtekkelistele saasteallikatele paisatakse lämmastikoksiide atmosfääri ka looduslike protsesside tulemusena (Joonis 1). Suurimad lämmastikoksiidide emissioonid toimuvad ookeanist ja mullast denitrifikatsiooni tagajärjel, mingil määral satub lämmastikoksiide (NO) atmosfääri ka äikesetormide tõttu (Aneja jt. 2001; Fowler jt. 2013). Lämmastikoksiide omastavad otse atmosfäärist mullas olevad lämmastikku fikseerivad bakterid ning taimed (Aneja jt. 2001). Inimsaastelise ja loodusliku tekkega lämmastikoksiidide emissioon atmosfääri on hinnanguliselt 68,5 Tg aastas (Fowler jt. 2013).



Joonis 1. Reaktiivsete lämmastikoksiidide emissioon, transport, transformeerumine ja depositsioon. Modifitseeritud Aneja jt. (2001) järgi.

Kuigi lämmastikoksiide on saasteainena palju uuritud, on jätkuvalt vähe teada, kas ja mil moel mõjutavad erinevad lämmastikoksiidide kontsentratsioonid taimi, nende kasvu ja arengut. Lämmastikoksiidi (NO) ja lämmastikdioksiidi (NO₂) produktsiooni taimede eneste poolt uuris esimest korda Klepper 1979. aastal. Pärast seda on aina enam hakatud uurima lämmastikoksiidide funktsioone taimes ning üheksakümnendatel kinnitati, et lämmastikoksiid (NO) on taimes oluline signaalmolekul (Durner ja Klessig, 1999). Sellegipoolest ei oldud antud sajandi alguses veel kindlad, kas lämmastikoksiid toimib taime kasvu ja arengu regulaatorina (Beligni ja Lamattina, 2001), kuna teistsuguste kontsentratsioonide juures toimib lämmastikoksiid hoopis kasvu inhibiitorina (Siddiqui jt. 2011). Hetkel on veel üsna vähe uuritud, kuidas mõjutab lämmastikoksiidide kontsentratsioonide suurenemine keskkonnas taimekasvu, fotosünteesi ja raku hingamist (Sparks 2009). Samavõrra lünklik on teave ka taime poolt emiteeritavate lämmastikoksiidide mõjust nii taime enda füsioloogiale kui ka ümbritsevale keskkonnale (Gruber ja Galloway, 2008).

Taim sünteesib hormoonina toimivaid lämmastikoksiide ka ise. Teatakse, et lämmastikoksiidide süntees taimes toimub nitraadi reduktaasi (NR) kaasabil või läbi lämmastikoksiidide sünteesi raja (NOS), mis on põhiline NO allikas taimes (Campell, 1999; Fröhlich ja Durner, 2011). Hetkel on üheks aktuaalsemaks teemaks taimefüsioloogias ka alternatiivsete lämmastikoksiidiradade tuvastamine taimedes (Vandelle jt 2007). Samuti on veel täielikult teadmata, kas ja kuidas võivad keskkonnatingimused erinevate lämmastikoksiidide sünteesiradade aktiveerumist mõjutada (Dwivedi jt. 2012).

Antud referatiivse töö eesmärk on uurida 1) millised on levinumate lämmastikoksiidide emissiooni allikad, keskendudes peamiselt looduslikele lämmastikoksiidide allikatele 2) mis on tänaseks teada lämmastikoksiidide sünteesist taimedes ning kuivõrd ja kas taimed omastavad lämmastikoksiide ka eksogeense saastena 3) kuidas ja kas taime enda poolt sünteesitud ning inimtekkelised lämmastikoksiidid mõjutavad taime füsioloogiat 4) kuidas mõjutavad taimes lämmastikoksiidide signaliseerimist, emissiooni ja omastamist erinevad keskkonnatingimused.

1. Lämmastikoksiidide allikad

1.1 Antropogeenne lämmastikoksiidide saaste

Viimase saja aasta jooksul on inimtegevuse tagajärjel lämmastikoksiidide kontsentratsioon atmosfääris märgatavalt suurenenud (Aneja jt. 2001). Üheks peamiseks põhjuseks on olnud fossiilsete kütuste (nafta, kivisüsi, maagaas) ja biomassi põletamine. Kui 1920ndatel kasutati veidi alla 200 kg nafta ekvivalenti inimese kohta, siis aastaks 2000 oli nafta kasutamine suurenenud juba pea 1200 kg ekvivalent inimese kohta (Aneja jt. 2001). Fowler jt. (2013) on näidanud, et fossiilsete kütuste ja biomassi põletamise tagajärjel paisatakse loodusesse 35 Tg lämmastikoksiide (NO_x) aastas. Dilämmastikoksiidi (N_2O) satub loodusesse ka lämmastikväetiste kasutamisel, kariloomade kasvatamise tagajärjel ning vähemal määral lämmastikhappe tootmisel. Warnek (2000) on näidanud, et inimtegevuse tagajärjel satub atmosfääri keskmiselt 9,4 Tg dilämmastikoksiidi aastas. Kuna inimtekkeline saastamine on hoogustunud, võib see kogus olla kasvanud. Vitousek jt. (1997) on välja toonud, et atmosfääri paisatud lämmastikoksiidid on 80% ulatuses ja dilämmastikoksiidid on 40% ulatuses antropogeense päritoluga.

Lämmastikoksiidide liigne emissioon tekitab keskkonnas erinevaid probleeme, mis võivad olla nii globaalse kui lokaalse tähtsusega. Lämmastikoksiidid reageerivad stratosfääris osooniga (O_3), tuues endaga kaasa osoonikihi lagunemise (VanLoon ja Duffy, 2011). Selle tagajärjel satub atmosfääri liiges koguses UV-kiirgust, mis tekitab elusloodusele kahjulikku mõju, pärssides näiteks fotosünteesi, tekitades DNA kahjustusi ja põhjustades muutusi valkude sünteesis (Martinez-Lüscher jt. 2013). Osoonikihi lagunemise tagajärjel satub atmosfääri rohkem energiat, mis maapinnal muudetakse soojusenergiaks. Kuna atmosfääris on suurenenud kasvuhoonegaaside hulk, mis ei lase soojusenergiat enam kosmosesse vaid peegeldab selle maale tagasi, hakkab Maa keskmine temperatuur tõusma, tuues endaga kaasa globaalse soojenemise (VanLoon ja Duffy, 2011). Lämmastikoksiid (NO), lämmastikdioksiid (NO_2) ja dilämmastikoksiid (N_2O) on tuntud kasvuhoonegaasid. Võrreldes süsihappegaasi molekuliga on dilämmastikoksiidi molekulil 290 korda suurem võime hoida soojust atmosfääris kinni (Bowatte jt. 2014). Seetõttu põhjustab dilämmastikoksiid 7% prognoositust kliimasoojenemisest (Smart ja Bloom, 2001).

Kliimamuutuste tagajärjel võib halveneda mullakvaliteet, tekkida üleujutuste oht ning tõusta temperatuur, tekitades taimede eluks ebasobivaid keskkonnatingimusi, mille tagajärjeks võib olla bioloogilise mitmekesisuse vähenemine (McCarty, 2001).

Kuigi diämmastikoksiid on stratosfääris väga aktiivne ning põhjustab osoonikihi lagunemist, ei oma N₂O troposfääris erilist mõju (Warneck, 1999). Ka lämmastikdioksiidi oksüdatsiooni lõpp-produktiks olev HNO₃ on troposfääris stabiilne ühend. HNO₃ sadeneb maapinnale kuiv- või märgdepositsioonil, mis võib endaga kaasa tuua mulla hapestumist (Warneck, 1999). Happelisem muld ei pruugi enam taimedele eluks sobilik olla. Olenevalt liigist ja funktsionaalsest kuuluvusest võib happevihm oluliselt mõjutada taime kasvu või lausa põhjustada taimede suremust. Näiteks on täheldatud, et happevihmad võivad põhjustada taimelehtedel vahakihi kaotust, mille tagajärjel suureneb veekadu ning leht kuivab (Wang jt. 2012).

Kuigi suur osa lämmastikoksiide emissioonist on inimtekkelise päritoluga, on leitud, et lämmastikoksiide ja diämmastikoksiidi eraldub keskkonda ka mitmete looduslike protsesside tagajärjel (De Marco jt. 2013).

1.2 Looduslikud lämmastikoksiidide allikad

Looduslike protsesside tagajärjel satub lämmastikoksiide keskkonda mullast, ookeanidest, vulkaanipursete, metsatulekahjude ja äikesetormide tõttu (Aneja jt. 2001, Fowler jt. 2013). Lämmastikoksiidide emissioon mullast sõltub mullatüübist, taimekooslustest, temperatuurist, niiskustasemest ning mullas olevatest toitainetest (Oertel jt. 2012). Näiteks okasmetsades on keskmiselt suurem lämmastikoksiidide emissioon kui lehtmetsades, kuna seal on suurem lämmastiku depositsioon ning madalam niiskustase (Pilegaard jt. 2006). Mullas reguleerivad lämmastikoksiidide emissiooni mullabakterid ning nende tekitatud nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsessid. Nitrifikatsiooni reguleerivad aeroobsed bakterid, mille käigus muudetakse ammoniaak nitraatideks (Bremner ja Blackmer, 1978). Denitrifikatsiooni reguleerivad anaeroobsed bakterid, kes muudavad nitraadid või nitritid gaasiliseks diämmastikoksiidiks (N₂O) ja lämmastikuks (N₂). Warneck (1999) on näidanud,

et looduslike protsesside tagajärjel on keskmine N₂O emissioon 16,4 Tg aastas, kuid uuemate andmete kohaselt (Fower jt. 2013) on see kogus 18,5 Tg aastas.

Mitmete uuringute tulemused (Smart ja Bloom, 2001; Baggs & Philippot, 2010) on näidanud, et taim võib dilämmastikoksiidi (N₂O) emiteerida kahel viisil. Esimese variandina vabaneb dilämmastikoksiidi taimes fotoassimilatsiooni käigus, kui madala energiasisaldusega anorgaanilised ühendid muudetakse kõrge energiasisaldusega orgaanilisteks ühenditeks (Taiz ja Zeiger, 2010b). Kuna suurimad dilämmastikoksiidi (N₂O) allikad on tekkinud mullas nitrifikatsiooni ja denitrifikatsiooni protsesside tagajärjel (Moir, 2011), arvatakse, et taim käitub ka vahelülina mulla ja atmosfääri vahel, omastades N₂O juurtega mullast ning transportides selle lehtedesse, kus dilämmastikoksiid vabaneb atmosfääri (Baruah jt. 2011; Bowatte jt. 2014). Samas väitis Smart ja Bloom (2001), et taime N₂O emissioon atmosfääri on väike ning taimed vabastavad N₂O, kui ümbritsevas mullas on dilämmastiku kontsentratsioon üle normi ehk ligikaudu 315 nmol·mol⁻¹. On näidatud, et dilämmastikoksiidi vood suurenevad mullatemperatuuri ja niiskuse tõustes (Warneck, 1999). Ka Moir (2011) väitis oma raamatus „*Nitrogen cycling in bacteria: Molecular analysis*“, et ei saa olla kindel, kas taim sünteesib vabanevat dilämmastikoksiidi ise või osaleb vahelülina mulla ja atmosfääri vahel.

Aneja jt. (2001) on näidanud, et äikese poolt fikseerides satub lämmastikoksiide ja lämmastikdioksiide (NO_x) atmosfääri 8 Tg aastas. Lämmastikoksiidide emissioon biosfäärist sõltub mullast omastatud või lehes sünteesitud lämmastikoksiidide hulgast. Fowler jt (2013) on näidanud, et mullast vabaneb aastas 5 Tg NO. Lämmastikoksiidi (NO) vahetus võrreldes lämmastikdioksiidiga (NO₂) on atmosfääri ja biosfääri vahel väike, kuna NO reageerib atmosfääris kiiresti NO₂-ks (Taylor jt. 2012; Fehsenfeld jt. 1992). Simpson jt. (1999) on näidanud, et lämmastikoksiidide emissioon lehtedest võib olla kuni 1,5 Tg aastas. Lämmastikoksiidide vabanemine taimedest muutub erinevate biotiliste ja abiotiliste häiringute tõttu. Biotilistest häiringutest on tuntumad herbivooria (Throop jt. 2004) ning viirused (Balachandran jt. 1997). Abiotilistest stressitekitajatest võib välja tuua ekstreemsed temperatuurid (Mahajan ja Tuteja, 2005; Song jt. 2008), liigse soolsuse (Zhao jt. 2004), vee ülekülluse või selle puuduse (Garcia-Mata ja Lamattina, 2001; Song jt. 2008).

On täheldatud, et stressitekitajate tõttu algab taimel aktiivne lämmastikoksiidide süntees, mille tagajärjel algselt lämmastikoksiidide emissioon taimest suureneb. Sünteesitud lämmastikoksiid käitub taimel antioksüdandina, kuid samal ajal toimib ka õhulõhesid sulgeva signaalmolekulina. Õhulõhede sulgudes lämmastikoksiidide emissioon atmosfääri taas väheneb (Neill jt. 2008).

2. Taimeomased lämmastikoksiidid

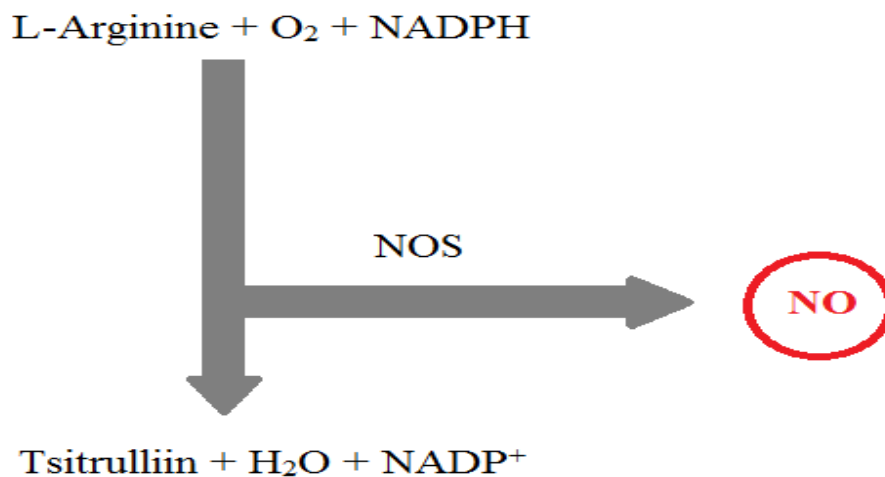
2.1 Taimeomaste lämmastikoksiidide omastamine ja süntees

Taimed omastavad lämmastikoksiide juurtega mullast või lehestiku kaudu atmosfäärist (Stulen jt. 1998). Omastatud lämmastikoksiidid mõjutavad taime kasvu ja arengut (Jin jt. 2009), osaledes näiteks õie arengus (He jt. 2004), juure kasvul (Leshem, 1996) ning õhulõhede sulgumise protsessis (Neill jt. 2008). Samuti vähendab lämmastikoksiid oksüdatiivset stressi (Zhao jt. 2008), pikendades seeläbi taime eluiga. Taimede suutlikus omastada ja sünteesida erinevaid lämmastikoksiide (NO, NO₂, N₂O) sõltub mitmetest tingimustest, sealhulgas valguse intensiivsusest, hapniku olemasolust, temperatuurist ning lämmastiku enda sisaldusest taimes (Neubert jt. 1993; Weber ja Rennenberg, 1996; Sparks jt. 2001). Kuna atmosfääris reageerib NO kiiresti NO₂, omastavad taimed lämmastikoksiidi (NO) peamiselt mullast (Taylor jt. 2012; Davidson ja Kingerlee, 1997). Seejuures taimed mitte üksnes ei omasta mullast ja atmosfäärist saadaolevat lämmastikoksiidi, vaid on võimelised ka ise sünteesima ning emiteerima märkimisväärses koguses NO-d (Durner ja Klessig, 1999). Üldjoontes on näidatud, et mingi punktini lämmastikoksiidi olemasolu soodustab taimekasvu ja elutegevust, kuid liiges kontsentratsioonis hakkab see tekitama stressi, paraku konkreetseid kontsentratsioone ja kaasfaktoreid, mis mõjutavad taimelämmastikoksiid seoseid, on veel vähe uuritud (Beligni ja Lamattina, 2001).

Eelmise sajandi lõpus on näidatud (Wildt jt. 1997), et valguse juuresolekul eraldasid taimed fotosünteesi ajal lämmastikoksiidi nitraadi ja ammooniumi omastamise käigus, kuid ainult ammooniumi omastamisel lämmastikoksiidi emissiooni ei toimunud. Wild jt. (1997) näitasid ka, et NO emissioon taimest toimub pärast herbitsiididega töötlemist ning anaeroobses ja pimedas keskkonnas, kuid võrreldes valgese toimuva NO eraldumisega, väheneb pimedas NO eraldamine märgatavalt. Praeguseks on leitud, et lämmastikoksiidide süntees taimedest suureneb enamikes stressisituatsioonides (Corpas jt. 2011) ning on avastatud mitmed ensümaatilised ja mitteensümaatilised protsessid, mis toodavad taimes lämmastikoksiide. Teadaolevalt toimub lämmastikoksiidide tootmine taimes peamiselt spetsiifiliste lämmastikoksiidide sünteesivate ensüümide (NOS) või nitraadi reduktaasi (NR)

abil (Neill jt. 2003). Arvatakse, et lisaks neile sünteesirajadele leidub taimedes ka alternatiivseid sünteesiradasid (Vandelle jt. 2007; Neill jt. 2008; Tewari jt. 2013).

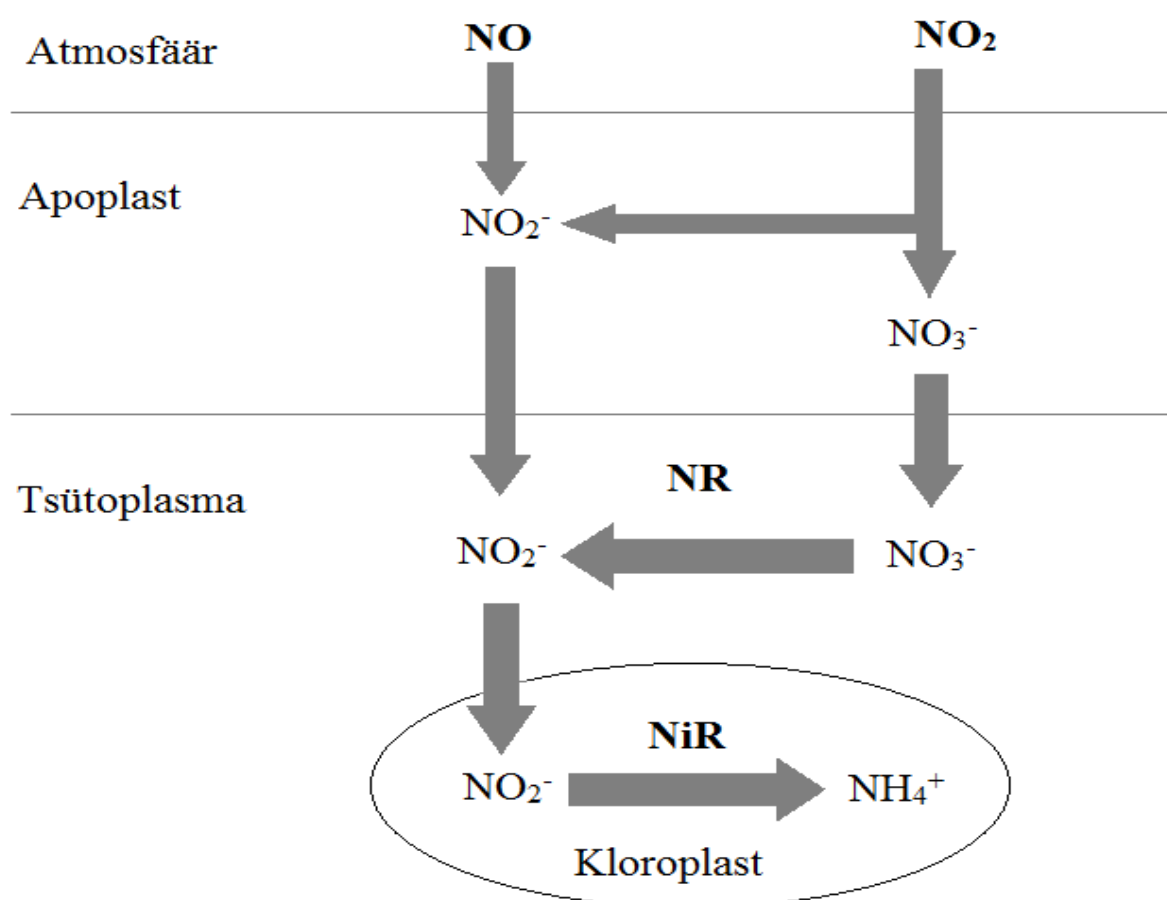
Ajalooliselt leiti taimedest lämmastikoksiide tootvad ensüümid otsides inimese NOS ensüümide analooge (Lundberg jt. 2008; Correa-Aragunde jt. 2013). On leitud, et rohevetika (*Ostreococcus tauri*) ja inimese NOS ensüümid on ~45% sarnased (Foresi jt. 2010). Taimerakkudes sünteesitakse lämmastikoksiide NOS ensüüme kasutades aminohappe L-arginiini abil, mis reageerib elektrondonori-NADPH-ga ja hapnikuga Wojtaszek (2000) (Joonis 2). Reaktsiooni tulemusena vabaneb lämmastikoksiid (NO) ning kaasproduktina aminohapete hulka kuuluv tsitrulliin (Andrew ja Mayer, 1999; Neill jt. 2003). Arvatakse, et taimedes on lisaks NOSile veel sarnaseid ensüüme, mis kasutavad lämmastikoksiidi tootmiseks L-arginiini, kuid ei ole teada, milline on nende võimalike ensüümide biokeemia ning kuidas nad L-arginiini kasutavad (Neill jt. 2008).



Joonis 2. Lihtsustatud skeem NOS-indutseeritud NO sünteesist. Modifitseeritud Wojtaszek (2000) järgi.

Teine taimedes hästi uuritud katalüsaator lämmastikoksiidide sünteesil on nitraadi reduktaas (NR) (Joonis 3), mille abil muudetakse tsütoplasmas nitraatioonid (NO₃⁻) nitritiooniks (NO₂⁻). Nitritioonid transporditakse edasi kloroplastidesse, kus nad muudetakse nitriti reduktaasi abil ammooniumiooniks (NH₄⁺) (Campbell, 1999). Tõenäoliselt võib NO

tootmisega olla seotud ka samaaegselt aktiveeruv lämmastikoksiidi reduktaas (Ni-NOR) (Vandelle jt. 2007), kuid erinevalt nitraadi reduktaasist ei osale selles protsessis NADPH ning Ni-NOR ensüümi pH optimum on happelisem kui nitraadi reduktaasil (Neill jt. 2008). Praegused teadmised Ni-NOR füsioloogilisest rollist ning geneetikast on puudulikud (Besson-Bard jt. 2008) ning vajavad täiendavaid eksperimente. On leitud kaudseid tõendeid, et lämmastikoksiide süntees taimes võib sõltuda mitokondri ja kloroplasti elektrontranspordiahelast või NOS sarnasest sünteesirajast (Neill jt. 2008; Tewari jt. 2013).

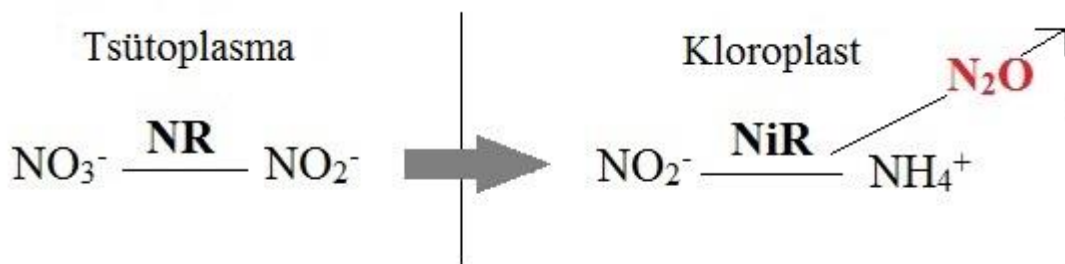


Joonis 3. Lihtsustatud skeem nitraadi ja nitriti reduktaasist. Modifitseeritud Sparks (2009) järgi.

Mingil määral omastavad taimed NO₂-te õhulõhedega otse atmosfäärist, see protsess suuresti seotud õhulõhede juhtivusega (Sparks jt. 2001). Omastatud NO₂ muudetakse NO₂⁻ ning transporditakse kloroplasti, kus ta muudetakse nitriti reduktaasi kaasabil NH₄⁺ (Sparks, 2009).

Liiga kõrgetel kontsentratsioonidel muutub NO₂ taimetele toksiliseks. Lämmastikdioksiid reageerib apoplastis askorbaadiga, mille tagajärjel suletakse õhulõhed ning väheneb NO₂ omastamine (Range jt. 1993). Juurtega omastavad taimed suuresti nitraatiooni (NO₃⁻), sest nitritioon muudetakse nirtifikatsiooniprotsesside tagajärjel kiiresti nitraatiooniks ning NO₂⁻ kontsentratsioon mullas on väga väike (Tischner, 2000). Nagu eelnevalt teada, muudetakse nitraatioon omakorda nitraadi reduktaasi abil nitritiooniks ning nitriti reduktaasi abil ammoniumiooniks (Tischner, 2000; Cameron jt. 2013). Sellegipoolest on veel teadmata, millised täpsemalt on NO₂ signalisatsioonirajad ning kas ta sarnaselt lämmastikmonooksiidile käitub taimes hormoonina (Takahashi jt. 2013).

Nagu eelmises peatükis mainitud, on võimalik, et dilämmastikoksiidi (N₂O) emissioon taimest toimub kahel viisil. Esimese võimalusena käitub taim vahelülina mulla ning atmosfääri vahel (Bowatte jt. 2014) ning teise võimalusena on näidatud, et taimed võivad toota dilämmastikoksiidi lehtedes nitriti fotoassimilatsiooni käigus, mis on väga energiakulukas protsess (Smart ja Bloom, 2001; Bowatte jt. 2014). Dilämmastikoksiidi tootmine taimedes toimub kahe eraldiseisva protsessina nitraadi (NR) ja nitriti (NiR) reduktaasi kaasabil. Nitraadi fotoassimilatsioonil muudetakse väiksema energiatasemega nitraatioon (NO₃⁻) nitraadi reduktaasi (NR) kaasabil kõrgema energiatasemega nitritiooniks (NO₂⁻), kuid dilämmastikoksiidi emissiooni sel protsessil ei täheldatud (Smart ja Bloom, 2001). Nitraadi reduktaasi kaasabil tekkinud nitritioon muudetakse kloroplastides omakorda nitriti reduktaasi toimel (NiR) kõrgema energiatasemega ammoniumiooniks (NH₄⁺), mis on vajalik aminohapetes ning on avastatud, et selle protsessi käigus vabaneb atmosfääri märkimisväärse hulga dilämmastikoksiid (Joonis 4.) (Smart ja Bloom, 2001; Hakata jt. 2003).



Joonis 4. Lihtsustatud skeem dilämmastikoksiidi (N_2O) vabanemisest fotoassimilatsioonil. Modifitseeritud Sparks (2009) järgi.

On kindlaks tehtud, et atmosfääri lämmastiku kontsentratsiooni suurenemine mõjutab erinevate lämmastikoksiidide akumulereerumist taimes ning lämmastikühendite omastamine otse atmosfäärist sõltub valgustingimustest ja õhulõhede juhtivusest (Teklemariam ja Sparks, 2006; Furlan jt. 2007). On leitud, et lämmastikühendite omastamine taime maapealsete osadega on märkimisväärne juhul, kui lämmastiku kontsentratsioon atmosfääris on suur. Selle tagajärjel vähenes lämmastiku omastamine juurte kaudu kuni 20%, sest taime lämmastikuvajadus ammendus (Stulen, 1998; Krupa, 2003). Kuigi taime lämmastikuvajaduse katmine toimub peamiselt juurte kaudu ja lehestiku kaudu omastatakse lämmastikku tunduvalt vähem, suurendab viimane siiski oluliselt lämmastikühendite kogunemist taimes (Krupa, 2003).

2.2 Mõju taime funktsioneerimisele ja kasvule

Taimeliikidel on erinev füsioloogia ning nende kasvupaikades ei ole alati sarnased füüsikalised ning keemilised tingimused, sellest tulenevalt sõltub taime reaktsioon lämmastikoksiididele nii konkreetsest taimeliigist kui kasvupaiga eelistustest (Groß jt. 2013). NO on signaalmolekul, mis võitleb taimes selliste stressitekitajatega nagu soolsus, valguse puudus, liigselt külm-kuum temperatuur ning kõrgeenenud osoonisisaldus (Uchida jt. 2002; Mahajan ja Tuteja, 2005; Siddiqui jt. 2011). Teada on, et lämmastikoksiidi eraldumine stressi ajal põhjustab õhulõhede sulgumist. Enamasti stressiolukorras NO akumulereerub taimes, vähendades superoksiidide (ROS) ja maloondialdehüüdi (MDA) toksilist mõju taimedele (Ruan jt. 2002; Siddiqui jt. 2011). MDA on taimedele toksiline

ühend, mis on tekkinud ROSi reaktsioonide tagajärjel ning mille koguse järgi taimedes saab hinnata oksüdatiivse stressi taset taimes. Näiteks Ruan jt. (2002) näitasid, et nisu (*Triticum aestivum L.*) lehtedes pikendab lämmastikudoonor (SNP) lehe eluiga, kuna ta vabastab stressiolukorras lämmastikoksiide (NO), mis viivitab klorofüllil lagunemist, MDA akumulatsiooni ning plasma membraani läbilaskvust.

Mitmed uuringud näitavad, et lämmastikoksiid ja lämmastikdioksiid käituvad taimes üldjuhul sarnaselt (He jt. 2004; Jin jt. 2009; Takahashi jt. 2013), mistõttu lämmastikdioksiidi uurimine võib meil aidata mõista ka lämmastikoksiidi funktsioone (Takahashi jt. 2013). NO ja NO₂ mõlemad aitavad kaasa taimekasvule ja arengule ning suurendavad biomassi (He jt. 2004; Jin jt. 2009). Näiteks suurendab lämmastikoksiid lehekasvu, pidurdab taime küpsemist ning vananemist (He jt. 2004). Samuti suurendab NO fotosünteesi aktiivsust, eriti kui NO on koosmõjus suurenenud süsihappegaasiga (CO₂) (Jin jt. 2009). Sellegipoolest on nende kahe oksiidi mõjus leitud teatud erinevusi, näiteks suurenenud NO kontsentratsioon viivitab õitsemist, kuid NO₂ rohkus kiirendas seda protsessi (He jt. 2004).

Mitmed uuringud (Magalhaes jt. 2000; Ren jt. 2013) on näidanud, et lämmastikoksiid põhjustab taimes ka etüleeni tootmise suurenemist. Sellel hormoonil on oluline roll taime vananemise vastu võitlemisel ning seetõttu pikeneb etüleeni sünteesi hoogustudes lehe eluiga (Yang ja Hoffmann, 1984). Seega võib öelda, et lämmastikoksiid kaudselt pidurdab taime vananemist. Lämmastikoksiid reageerib ka erinevate stressitekitajatega, olles taime antioksidandi tollis. Näiteks reageerib NO reaktiivsete hapnikuühenditega (ROS), mõjudes taimes antioksidandina (Beligni ja Lamattina, 2001; Wilson jt. 2008). Ehkki arvatakse, et ROS on mõneti taimele vajalik, kuna suudab ära hoida erinevate patogeenide infektsiooni ja tal on oluline roll keskkonnastressiga kohanemisel (Beers ja McDowell, 2001), suureneb ROSi kontsentratsiooni suurenemisel ka NO hulk taimes, et ära hoida ROSi ülekülluse tekkimist. Seda seetõttu, et reaktiivsete hapnikuühendite liigne kogunemine kahjustab rakumembraane ning on taimele surmav (Mur jt. 2008). Näiteks Beligni ja Lamattina (2002) näitas, et kartulilehes vähendas madalal kontsentratsioonil NO lisamine ROS kontsentratsiooni ning aitas seega kaasa kloroplastide elektrontranspordi efektiivsuse tõusule, pidurdades nii kloroplastide vähenemist lehes ning vähendas RNA kahjustusi. Lämmastikoksiidi reageerimisel superoksiididega tekib peroksünitrit (ONOO⁻), mis tapab

patogeenide rakke, kuid taimerakud ise on ONOO⁻ suhtes resistentsed (Bell ja Treshow, 2002). Seetõttu on arvatud, et peroksünitrit võib taimes käituda hormoonina (Bell ja Treshow, 2002). Ei ole teada, kas õhulõhede kaudu omastatud NO, mida leidub atmosfääris saasteainena (Galloway jt. 2004) omab patogeenide vastast mõju.

Ehkki endogeenselt sünteesitud ja eksogeenselt omastatud lämmastikoksiid toimib taimes antioksidandina, vähendades stressitekitajate toksilist mõju (Neill jt. 2003; Palavan-Unsal ja Arisan, 2009), on leitud, et liigeses koguses võib NO vähendada taime eluiga (Palavan-Unsal ja Arisan, 2009). Takahashi ja Yamasaki (2002) näitasid, et lämmastikoksiid võib kloroplastides pärssida elektrontranspordi ja ATP sünteesi ning on pakutud, et selle põhjuseks võib olla olukord, kus NO muutub nitritiks, mis on toksiline ühend, aga nitriti reduktaas on pärsitud. Lisaks ei ole senised uuringud avastanud spetsiaalset lämmastikoksiidi retseptorit, kuna NO on väga aktiivne ja võib reageerida paljude valkudega (Sparks, 2009). Tõenäoliselt leidub taimes mitmeid erinevaid NO tajumise ja signaliseerimise süsteeme, mille tuvastamine on jätkuvalt aktuaalne (Wilson jt. 2008).

Erinevates taimedes nagu näiteks sojaoas (*Glycine Max L.*) ja müürloogas (*Arabidopsis thaliana L.*), suurendab lämmastikoksiid cGMP taset taimes. cGMP on seejuures lämmastikoksiidi signaliseerimise vahelüli, mis üksi ei põhjusta õhulõhede sulgumist, vaid ta on taimes sekundaarne virgatsaine, mis osaleb õhulõhede sulgumisprotsessis koosmõjus lämmastikoksiidiga (NO) (Bright jt. 2006; Wilson jt. 2008). Tänapäevaks on veel täpsustamata, mil viisil ABA ja NO mõjutavad cGMP sünteesi ja signalisatsiooni taimedes (Wilson jt. 2008), kuna vastava loomse ensüümiraaja homoloogide otsimine taimedel pole veel vilja kandnud. Võimalik, et lämmastikoksiid aitab kaasa cGMP sünteesile ja signalisatsioonile taimedes.

Erinevad katsed on näidanud, et eksogeenne lämmastikdioksiid (NO₂) aitab kaasa fotosünteesi aktiivsusele, toitainete omastamisele ning taimekasvule (Sparks jt. 2001). On leitud, et NO₂ suurendab taimerakke ning nende arvukust, mille tagajärjel suureneb taimeleht, kuid ei ole kindel, kas lämmastikdioksiid ise käitub taimes hormoonina (Takahashi jt. 2013). Teada on, et NO₂ osaleb türosiini nitreerimisel (Shapiro, 2005), mis on taimekasvu jaoks oluline, kuna türosiin on üks aminohapetest, mis on rakkudes vajalik valkude sünteesiks. Ma jt. (2007) näitasid oma uurimistöös, et eriti hästi mõjub eksogeenne

NO₂ lisamine taimedele, mis kasvavad lämmastikuvaesel mullal, kuna atmosfäärist omandatud lämmastikdioksiid muutetakse tsütosoolis nitraadi reduktaasi (NR) abil nitraatiooniks (NO₃) ning seejärel ammooniumiooniks (NH₄⁺), mida kasutatakse aminohapetes. Seejuures on leitud, et liiga suurtes kontsentratsioonides on NO₂ taimedele toksiline, pärssides taime kasvu (kuna üleliigne NO₂ suurendab ka üleliigset NO₃⁻ akumulatsiooni taimes) ning tekitab silmaga nähtavaid kahjustusi (Nouchi, 2002). Taimed saavad vältida üleliigse NO₂ omastamist atmosfäärist, sulgedes oma õhulõhed vesinikperoksiidi kaasabil. Ma jt. (2007) demonstreerisid, et lämmastikdioksiidi sisalduse tõustes suureneb ka H₂O₂ kontsentratsioon, mille tagajärjel suletakse õhulõhed. Samast tööst selgus aga, et õhulõhede sulgumine ei mõjuta NO₂-st tulenevat NO₃⁻ üleliigset akumulatsioonist (Ma jt. 2007).

Tänaseks on äärmiselt vähe teada, mil määral dilämmastikoksiid (N₂O), mida taimed samuti emiteerivad, osaleb taime signaalsüsteemis või mõjutab taime kasvu (Moir, 2011; Bowatte jt. 2014). Siiski on näidatud, et dilämmastikoksiidi lisamine taime keskkonda aeglustab viljade valmimist ja vananemist (Gouble jt. 1995; Palomer jt. 2005)

2.3 Koosmõju teiste taimeomaste ühenditega

Lämmastikoksiidide kontsentratsioonide muutused taimes ja nende mõju taime füsioloogiale sõltub tugevasti lämmastikoksiidide koosmõjust teiste taime poolt produtseeritud ühenditega. Erinevad uuringud on näidanud olulisi seoseid lämmastikoksiidide ja etüleeniga (Liu jt. 2010a) abstsiihappe (Desikan jt. 2004) ning vesinikperoksiidi (Garcia-Mata ja Lamattina, 2001; Desikan jt. 2001) vahel.

Kasvuregulaator etüleen süntees taimes on tavaolukorras madal, aga see suureneb õitsemise, viljade valmimise ja taime vananemise ajal (Liu jt. 2010a; Noodén ja Leopold, 2012). Samuti suurendab etüleen tootmist keskkonnatingimustest tekitatud stress nagu põud või temperatuuri muutused (Yang ja Hoffmann, 1984). Magalhaes jt. (2000) näitas, et müürlooga taimes põhjustas NO lisandumine etüleen sünteesi hoogustumist kuni 48 ppm- ni, aga NO sünteesi vähenemine ei pidurdanud etüleen tootmist. Võrdluseks võib tuua, et

puhta õhu juuresolekul oli etüleeni süntees müürloogas 16 ppm. Magalhaes jt. (2000) näitasid ka, et eksogeenselt omandatud NO oli etüleeni produktsioonil tõhusam kui lämmastikoksiidi doonori (SNP) poolt vabastatud lämmastikoksiid ning NO ja etüleeni emissioon taimest toimus sünkroonis. Liu jt. (2010a) on oma varasemates katsetes leidnud, et lämmastikoksiid on vajalik ka etüleeni poolt indutseeritud õhulõhede sulgumise protsessis, kusjuures NO sünteesiti seejuures nitraadi reduktaasi (NR) kaasabil, kuid oma hilisemates uuringutes leiti, et nitraadi reduktaasi aktiivsus võib sõltuda tsütosooli happelisusest.

Kõrge lämmastikdioksiidi (N₂O) kontsentratsiooniga töötlemine põhjustas tomatitaimedes etüleeni sünteesi vähenemist ning lükkas hilisemaks viljade värvimuutuse ning küpsemise (Gouble jt. 1995). Sama töö näitas, et avokaados (*Persea americana M.*) mõjutas dilämmastikoksiid etüleeni tootmist vähem kui tomatitaimes (*Solanum lycopersicum L.*), ilmselt seetõttu, et avokaados sünteesitakse rohkem etüleeni tootmisensüümi (ACC oksüdaas) ning sellest tulenevalt on avokaados kõrgem etüleenitase. Kõrgetel kontsentratsioonidel lisatud N₂O pärssis etüleeni tootmist ka taime vananemisel (Gouble jt. 1995), mis aeglustas vananemise protsessi. Katsed banaaniga (*Musa acuminata L.*) näitasid, et lämmastikdioksiid ei mõjutanud vilja valmimist, kuid parandas säilimist, mistõttu võib öelda, et N₂O mõju viljade valmimisele erineb taimeliigiti (Palomer jt. 2005).

Mitmed uuringud on näidanud, et lämmastikoksiid ja abstsiiishape on samuti omavahel koosmõjus (Bright jt. 2006; Neill jt. 2008). Näiteks on katsed müürlooga ja hernega (*Pisum sativum L.*) tõestanud, et õhulõhede sulgumist põhjustavate reaktsioonide käigus indutseerib abstsiiishape (ABA) ka lämmastikoksiidi tootmist ning NO vähenemisel on ABA vahendatud õhulõhede sulgumine häiritud (Neill jt. 2008). Neill jt. (2003) näitasid, et abstsiiishappe indutseeritud lämmastikoksiidi süntees võib taimeliigiti erineda, kuna selgus, et hernes sünteesitakse lämmastikoksiide eelistatult NOS raja läbi, kuid müürloogas pigem nitraadi reduktaasi (NR) abil. Samas uuringus leiti ka, et lämmastikoksiidi sisaldust vähendav radikaal (cPTIO) pärssib lämmastikoksiidide sünteesi (NOS) raja aktiivsust. Desikan jt. (2004) ning Bright jt. (2006) näitasid, et stressiolukorras, näiteks kõrgetel temperatuuridel või veepuuduse korral, aktiveeris ABA lämmastikoksiide sünteesivad ensüümid (NOS) ja seeläbi suurendas NO emissiooni, mis aitab taluda kõrgete temperatuuride tekitatud stressi

ning võidelda stressist tulenevate ROS ühendite toksilisusega. Katsed müürloogaga on näidanud, et kui ABA ei suuda õhulõhesid sulgeda, suureneb taimes NO süntees ja turgor ehk taimeraku siserõhk väheneb ning õhulõhed sulguvad (Desikan jt. 2004). Kui turgor uuesti suureneb, siis õhulõhed avanevad. ABA on signaalmolekul ka õhulõhede avamisel, kuid on selgunud, et erinevalt sulgumisprotsessist, ei ole õhulõhede avanemise signaalrajas NO sünteesimine vajalik (Desikan jt. 2001).

Kuigi ei ole teada, kas lämmastikdioksiid (NO_2) käitub taimes hormoonina (Takahashi jt. 2013), on leitud, et eksogeense lämmastikdioksiidi omastamine suurendab sarnaselt lämmastikoksiidile (NO) taimes abstsissiin (ABA) sünteesi, mis omakorda sulgeb õhulõhed, mille tagajärjel NO_2 vood taas vähenevad (Chaparro-Suarez, 2011). Samuti on leitud, et antioksüdandina toimival ja õhulõhede sulgumisprotsessil osaleval askorbaadil võib olla oluline roll rakusisese NO_2 omastamisel, kuna taimedes, kus oli kõrgem askorbaadi sisaldus, vähenes NO_2 emissioon taimest. Sellest tulenevalt võib arvata, et kõrgema askorbaadisisaldusega taimed suudavad NO_2 paremini omastada (Teklemariam ja Sparks, 2006). On näidatud, et nitriti reduktaas (NiR) on esmane ensüüm, mis kontrollib NO_2 assimilatsiooni raku sees ning on ilmselt seetõttu võtmeensüüm askorbaadiga seonduval assimilatsiooni (Teklemariam ja Sparks, 2006; Takahashi jt. 2001).

Erinevates uuringutes (Garcia-Mata ja Lamattina, 2001; Lum jt. 2002) on leitud, et abiootilise ja biootilise stressi korral on õhulõhede sulgumisprotsessis oluline roll ka vesinikperoksiidil (H_2O_2). Lum jt. (2002) ning She jt (2004) on näidanud, et lämmastikoksiidi doonor (SNP) ja H_2O_2 mõlemad mõjutavad õhulõhede sulgumist ning avanemist. Samuti leidis She jt. (2004), et pimedas on lämmastikudoonori (SNP) ja vesinikperoksiidi kontsentratsioonid sulgrakkudes suuremad kui valguses. Sellest võib järeldada, et valguse puuduses on SNP poolt produtseeritud lämmastikoksiidil (NO) ja vesinikperoksiidil tähtis roll õhulõhede sulgumisel, et vältida üleliigset veekadu. Desikan jt. (2001) näitas, et NO ja H_2O_2 süntees taimes võib toimuda paralleelselt, kuid hilisematel uuringutel (Desikan jt. 2004) ei ole selgunud, kas NO ja H_2O mõjuvad raku paralleelselt, sünergiliselt või koosmõjus. Bright jt. (2006) leidsid oma töös, et kuigi eksogeense vesinikperoksiidi lisamine väikeses koguses mõjutab lämmastikoksiidi produktsiooni, siis vastupidiselt NO lisamine ei mõjuta H_2O_2 sünteesi õhulõhede sulgumisprotsessis ega mujal.

Tanaka jt. (2005) on näidanud, et abstsiihape ja etüleen mõlemad mõjutavad õhulõhede sulgumist ning nad on teineteisest sõltuvad, kuna etüleen pärsib ABA signaliseerimist ning sellest tulenevalt ka õhulõhede sulgumist. Kuna ka vesinikperoksiid (H_2O_2) on õhulõhede sulgumisel oluline ning sarnaselt abstsiihappele indutseerib NO sünteesi, siis vajavad veel seletamist ABA- H_2O_2 -NO omavahelised signalisatsioonirajad (Neill jt. 2008; Wilson jt. 2008). Tänaeni on täpselt teadmata, milliste mehhanismide läbi NO interaktsioonid teiste taime signaalmolekulidega toimuvad ja kas need protsessid on erinevates taimerakkudes ning erinevate liikide puhul erinevad.

3. Keskkonnatingimused ja lämmastikoksiidid

3.1 Temperatuur

Temperatuur mõjutab taime kasvu väga olulisel määral, kuna liiga ekstreemsed temperatuurid võivad taime kasvule ja arengule mõjuda pärssivalt. See tuleneb muuhulgas ka asjaolust, et liiga ekstreemsete temperatuuride ajal, hakkavad taimekudedes akumuleeruma reaktiivsed hapnikühendid (ROS), mis tekitavad taimes oksüdatiivset stressi (Liu ja Huang, 2000). Kuumastressiga võideldes suureneb taimes abstsiihappe (ABA) akumulatsioon (Larkindale jt. 2005) ning NO süntees. Lämmastikoksiidide süntees ja kuumastressiga toimetulek võib sõltuda taime liigist ning tema temperatuuritaluvusest. Näiteks Leshem jt. (1998) tõi välja, et kui lutserni (*Alfalfa sp.*) idud olid toatemperatuurilt viidud 37°C kuumusesse, suurenes NO süntees taimes kaks korda. Samuti ka tubakataimes (*Nicotiana tabacum L.*) tõusis NO süntees 40°C kuumuses märgatavalt juba 7 minuti jooksul (Gould jt. 2003). Uchida jt. (2002) näitasid, et kuumastressiga aitab võidelda ka eksogeenne lämmastikoksiidi doonor (SNP) või vesinikperoksiid (H₂O₂). Väidet kinnitas asjaolu, et päev enne kuumastressi tingimuste teket lisatud eksogeenne lämmastikoksiidi doonor (SNP) või H₂O₂ ei tekitanud riisitaimedele nähtavaid kahjustusi, vaid vähendasid kuumastressi kahjulikku mõju. Kuid positiivne efekt tekib vaid madalate kontsentratsioonide juures, liiga suurtes kogustes hakkab SNP või H₂O₂ taimekasvu pärssima. Kuigi on näidatud, et oksüdatiivse stressiga võitlemiseks hakkab taim sünteesima abstsiihapat (ABA), lämmastikoksiidi (NO) ja vesinikperoksiidi (H₂O₂), on vähe teada nende ühendite signaliseerimisradadest ning omavahelistest interaktsioonidest kuumastressi ajal (Song jt. 2008).

Uuringud nisutaimedega (*Triticum aestivum L.*) on näidanud, et lämmastikdioksiidi (NO₂) omastamine kahaneb temperatuuri tõustes, kuna kõrgematel temperatuuridel väheneb lämmastikdioksiidi lahustuvus apoplastis ning sellest tulenevalt langeb ka NO₂ omastamine (Weber ja Rennenberg, 1996). Erinevalt nisutaimedest näitasid katsed kuusega (*Picea abies K.*), et temperatuuri tõus 35°C-ni ei mõjuta NO₂ omastamist, kuid 45°C juures valguse juuresolekul lämmastikdioksiidi voog suurenes (Thoene jt. 1996). Autorid järeldasid, et kuna kuuse puhul temperatuuri tõustes lämmastikdioksiidi omastamine suurenes, mitte ei

vähenenud nagu nisutaimede puhul, võib eeldada, et kuuse puhul ei ole NO₂ vood seotud apoplastis lahustumisega (Thoene jt. 1996).

Liiga madalad temperatuurid mõjuvad samuti taimekasvule pärssivalt (Corpas jt. 2011), tekitades taimes külmakahjustusi (Mahajan ja Tuteja, 2005). Nagu kõrgete temperatuuride puhul, tekitavad ka liiga madalad temperatuurid taimes oksüdatiivset stressi ning suurendavad reaktiivsete hapnikühendite teket (Kang jt. 2003), mille tagajärjel on häiritud fotosüntees, taime kaitsemehhanismid ja erinevad signaliseerimise protsessid. Reaktiivsete hapnikühenditega (ROS) võitlemiseks hakkab taim sünteesima lämmastikoksiide, kuid selleks kasutatavad rajad võivad erineda olenevalt taimeliigist (Liu jt. 2010b). Seda teooriat kinnitasid ka Corpas jt. (2008), kes leidsid, et külmastressi ajal toimub herne lehtedes lämmastikoksiidi süntees läbi lämmastikoksiidi sünteesi (NOS) raja ja Zhao jt. (2009) ning Cantrel jt. (2011), kes näitasid, et müürloogas toimub NO süntees nitraadi reduktaasi (NR) abil. Corpas jt. (2011) näitas ka oma hilisemates uurimistulemustes, et kui hernetaim oli 8°C tingimuses 24 tundi, tekkis taimes reaktiivsete hapnikühendite (ROS) üleküllus, mille tagajärjel aktiveeriti NOS. Airaki jt. (2011) näitas, et ka punapipral (*Capsicum annuum L.*) tekkis samadel tingimustel ROS-i üleküllus ning NO ja ROS reaktsioonide tagajärjel tekkis nitrotürosiin, mis on nitreeritud aminohape, mida kasutatakse markerina rakukahjustuste jälgimiseks. Ka Cantrel jt. (2011) on näidanud, et müürloogas hakkab jahedatel temperatuuridel suurenema lämmastikoksiidide akumulatsioon. Mõõdukas koguses aitab külmastressiga võidelda ka eksogeenselt omastatud lämmastikoksiid (Neill jt. 2003), kuid liiga suurtes kontsentratsioonides pidurdab see lehe ja juure kasvu, kahjustab DNA-d ning põhjustab rakusurma (Siddiqui jt. 2011). Liiga madalatest temperatuuridest tulenevat stressi aitab üle elada ka lämmastikoksiidi doonor (SNP), vabastades stressiolukorras NO, mis omakorda vähendab H₂O₂ sünteesi. SNP puuduse korral suureneb taimeomase lämmastikoksiidide sünteesiraja (NOS) aktiivsus, kuid SNP lisamise korral on NOS aktiivsus pärsitud (Liu jt. 2010b). Ilmselt on põhjuseks lämmastikoksiidide ülekülluse kahjuliku mõju vältimine.

Dilämmastikoksiidi (N₂O) omastamise temperatuuritundlikkusest on vähe andmeid, kuid on leitud, et N₂O omastamine taimede poolt võib külmal ajal perioodidel suurendada (Song jt. 2006). Groffman jt. (2006) tõid samuti välja, et kuigi dilämmastikoksiidi emissioon

sessoonselt ei erine väga palju, siis lumega töötlemine suurendas N₂O voogusid. Sellegipoolest, kuna ökosüsteemi tasemel tehtud N₂O voogude mõõtmised on temperatuuriga seoses andnud vastakaid tulemusi olenevalt kasvukoha ja niiskustasemest ning vastavast taimekooslusest (Nykänen jt. 1995; Alm jt. 1999), oleksid vajalikud lisauuringud erinevate taimeliikide lehestiku kaudu emiteeritavate ja omastatavate dilämmastikoksiidide ja temperatuuride seoste kohta.

3.2 Niiskus ja sademed

Ka veepuudus pidurdab taime kasvu ja arengut oluliselt, kuna väheneb raku veesisaldus ning siserõhk (Taiz ja Zeiger, 2010a). Seetõttu suletakse põua ajal õhulõhed, et vältida auramisest tulenevat veekadu. Kuna õhulõhede sulgumise tagajärjel on taimes piiratud ka süsiniku omastamine, väheneb seetõttu ka fotosünteesi aktiivsus (Garcia-Mata ja Lamattina, 2001). Pikaajalise veepuuduse tõttu, hakkavad taimeosad kuivama ehk taimerakud hakkavad surema. Põuast tingitud stressiga aitab võidelda lämmastikoksiidide poolt indutseeritud õhulõhede sulgumine (Corpas jt. 2011; Garcia-Mata ja Lamattina, 2001), mistõttu veepuudus põhjustab enamasti NO sünteesi hoogustumist (Sang jt. 2008; Garcia-Mata ja Lamattina 2001; Mahajan ja Tuteja 2005), kuigi Magalhaes jt. (2000) näitas müürlooga puhul vastupidist toimet. Kuna veepuuduse ajal väheneb taime siserõhk, hakatakse taimes sünteesima abstsiihapet (ABA), mis on otseselt tingitud turgori vähenemisest (Zhang ja Davies, 1989). ABA tootmise tagajärjel suureneb ka NO süntees ja akumulatsioon ning algab õhulõhede sulgumine, kuid Neill jt. (2008) leidsid, kiiresti mööduva veestressi korral ei ole NO osalust õhulõhede sulgumisel vaja. Ka katsed polüetüleenglükooliga, mis indutseerib põuast tingitud stressi sarnase olukorra, viies rakust vett välja, näitasid, et veestressi tõttu suureneb sulgrakkudes ABA ja NO süntees, mis kiirendab õhulõhede sulgumise protsessi (Zhang jt. 2007; Siddiqui jt. 2011). Sarnase tulemuseni jõudsid ka Corpas jt. (2011), kes leidsid, et kui maisitaimele (*Zea mays L.*) anda 10% polüetüleenglükooli, suureneb mesofüllil rakkudes kiiresti NO kontsentratsioon.

Nagu ekstreemsete temperatuuride puhul, on ka veestressiga toimetulekuks oluline lämmastikoksiidide funktsioon tekkivate ROS ühendite neutraliseerijana. Samuti aitab

lämmastikoksiidi doonor (SNP) vähendada ioonide leket rakust rakkudevälisesse ruumi ning indutseerib õhulõhede sulgumist. On leitud, et taimed, kus mõjub SNP, suudavad säilitada 15% rohkem vett (García-Mata ja Lamattina, 2001). Veekao tõttu väheneb ka taime idanemisvõime, kuna suureneb elektrolüütide leke, mis lagundavad rakumembraane (Bai jt. 2011). On näidatud, et põua tõttu suureneb taimedes paralleelselt NO emissioonile ka vesinik peroksiidi (H_2O_2) emissioon (Neill jt. 2002). Nakano ja Asada (1981) ning Cho ja Seo (2005) näitasid, et ülemäärane H_2O_2 kontsentratsioon vähendab oluliselt taime elujõulisust, kuid vastukaaluks kaasneb vesinikperoksiidi tõusuga ka NO kontsentratsiooni tõus, aktiveerides omakorda taimes askorbaat-glutatiooni raja, mis vähendab H_2O_2 kogunemist taimes. Askorbaat-glutatiooni rada suurendab taimes askorbaadi ja glutatiooni sünteesi, mis on mitteensümaatilised antioksüdandid ning aitavad võidelda stressitekitajatega.

Neighbour jt. (1988) näitas, et saasteainete ($NO_2 + SO_2$), sealhulgas lämmastikdioksiidi suurenemine atmosfääris võib samuti mõjutada taime veekasutust, kuna lämmastikdioksiidi ja vääveldioksiidi koosmõju võivab pärssida abtsiishappe (ABA) sünteesi ning taime võimet sulgeda õhulõhesid, mille tagajärjel suureneb taime veekadu, mis põua olukorras võib lõppeda taime hukkamisega. Vastupidiselt põuaolukorrale näitasid Weber ja Rennenberg (1996), et õhuniiskuse tõusmisel suureneb lämmastikdioksiidide omastamine nisulehtedes (*Triticum aestivum L.*) lineaarselt, kuid see ei ole seotud õhulõhede avatusega. Liigse niiskuse oludes tekib taimelehele õhuke veekile, milles lämmastikdioksiidi molekulid lahustuvad ning difundeeruvad läbi õhulõhede.

Dilämmastikoksiidi (N_2O) kohta on uuringud arukase (*Betula pendula R.*) ja hübriidhaavaga (*Populus × wettsteinii H.*) näidanud, et õhuniiskuse suurenemisel on N_2O emissioon taimest peaaegu olematu (Hansen jt. 2013), kuid rohumaade lõikes on leitud vastupidiselt, et mullaniiskuse tõustes dilämmastikoksiidi emissioon suureneb (Dobbie jt. 1999).

3.2.1 Soolsus

Soolastressist tulenevalt väheneb taimes samuti veesisaldus ning toimub Na^+ akumulatsioon, mille tagajärjel väheneb taimekasv. Arvatakse, et taim kaitseb oma noori kudesid ning kõik

kahjulikud ained ladestatakse vanadesse lehtedesse (Bybordi ja Ebrahimian, 2011). Seetõttu on soolsusel suurem efekt ionide tasakaalule ja metabolismile vanades lehtedes ning noortes lehtedes akumulerevad N^+ , K^+ , Cl^- vähem (Bybordi ja Ebrahimian, 2011). Sarnaselt veestressile akumulerevad liigse soolsuse tagajärjel taimekudedes ka reaktiivsed hapnikuühendid (ROS, H_2O_2 , OH), mis tekitavad rakukahjustusi (Ruan jt. 2002). Seetõttu on hakatud uurima kas ja kuidas NO mõjutab mehhanisme, mis võitlevad soolsusest tekitatud stressiga. Soolsusest tingitud stressi ajal väheneb nii noortes kui vanades lehtedes NO_3^- sisaldus, mistõttu on nitraadi reduktaasi aktiivsus pärsitud (Bybordi ja Ebrahimian, 2011). Seda tulemust kinnitasid ka Zhao jt. (2004), kes leidsid, et NaCl ülekülluse ajal toimub lämmastikoksiidide süntees NOS mitte NR sünteesiraja abil.

Kuna taimes on soolastressi puhul üheks suurimaks probleemiks veekadu, on käitub taim sarnaselt põuastressile. Auramise vähendamiseks algab aktiivne abtsiishappe (ABA) süntees ning aktiveeritakse lämmastikoksiidide sünteesi (NOS) rada, mille käigus suureneb NO süntees ning õhulõhed suletakse (Mahajan ja Tuteja, 2005). Bright jt. (2006) on näidanud, et soolsuse ja osmootse stressi ajal tõuseb koos ABA kontsentratsiooni suurenemisega ka teise õhulõhede sulgumise ja avanemise regulaatori cGMP kontsentratsioon (Bright jt. 2006).

Õhulõhede sulgumisele soolastressi olukorras aitab kaasa ka eksogeenselt omastatud vesinikperoksiid (H_2O_2) ja lämmastikoksiidi doonor (SNP) (Uchida jt. 2002). On leitud, et eksogeenne lämmastikoksiidi doonor (SNP) aktiveerib liigse soolsuse olukorras antioksidatiivseid ensüüme (Guo jt. 2005), mis võitlevad stressi tagajärjel tekkiva reaktiivsete hapnikuühendite (ROS) toksilisuse vastu.

3.3 Troposfääri osoonisisaldus

Troposfääri osoon on taimedele üks toksilisemaid saasteaineid, tekitades taimerakkudes morfoloogilisi ja keemilisi muutuseid (Baldantoni jt. 2011). Taimed omastavad osooni läbi õhulõhede, kus see muudetakse reaktiivseteks hapnikuühenditeks (ROS) (Oksanen, 2014). Kõrge osooni kontsentratsiooni puhul väheneb lehtedes klorofüllis sisaldus ning seetõttu ka

fotosünteesi kiirus (Saitanis jt. 2001; Yendrek jt. 2013). Võib öelda, et ROS kiirendab taime vananemisprotsessi, mille tagajärjel väheneb tema biomass ja saagikus, kuid väga kõrge osooni kontsentratsiooni puhul hakkavad taimerakud surema ning lehtedele tekivad nähtavad vigastused (Corpas jt. 2011). Kõige rohkem taimekahjustusi põhjustab O₃ reaktsioonide tagajärjel tekkinud H₂O₂, mis edasi reageerides tekitab teisi ROS-ühendeid.

Troposfääri osooniga kaasneva toksilisusega võitlemisel on taimel kasutuses kaks erinevat reaktsioonirada. Esimese variandina suletakse õhulõhed (Oksanen, 2014) ning selleks hakatakse taimes sünteesima abstsiihapet (ABA). Karlsson jt. (1995) ning Matyssek jt. (2006) on näidanud, et põua ajal, kui õhulõhed on auramise vältimiseks suletud, väheneb taimedes atmosfääri saasteainete, sealhulgas osooni omastamine ning seeläbi ka nende toksiline mõju. Teise variandina hakatakse taimes ROS ühendeid detoksifitseerima (Oksanen, 2014). Selleks reageeritakse ROS ühendid askorbaadi, polüamiidi ja lämmastikoksiidiga. NO sünteesiks aktiveeritakse taimes lämmastikoksiidi süntees (NOS) ja lämmastikoksiidi doonor (SNP), kuid Ahlfors jt. 2009 näitasid, et müürloogal viis SNP töötlus vahetevahel nähtavate rakukahjustusteni. See tulenes asjaolust, et osoon tekitas rakkudes ionide leket, mis SNP-ga töödeldes küll ei suurenenud, kuid tekitas siiski taimedekudedele kahjustusi. Corpas jt. (2011) tegid samuti katseid müürloogaga ning leidsid, et suurenenud osooni kontsentratsiooni tagajärjel võimendunud NOS aktiivsus põhjustas taimes salitsüülhappe akumulereerumist ning on leitud, et salitsüülhappe sünteesis osalevad geenid võivad koosmõjus teiste taime kaitsemehhanismis osalevate geenidega põhjustada raku hukkumist. Sellest järeldati, et ebaregulaarne NO võib põhjustada suuremat tundlikust troposfääri osoonile. Mehlhorn ja Wellburn (1987) on näidanud, et troposfääri osooni toksilisust aitab vähendada ka eksogeenne lämmastikoksiid või lämmastikdioksiid, mis suurendab taimes etüleeni tootmist ning vähendab seeläbi lehekahjustusi.

Lämmastikdioksiidi (NO₂) ja osooni vahelist koosmõju Bender jt. (1991) algselt oma katsetes ubadega (*Phaseolus vulgaris L.*) ei leidnud, kuid suurendades NO₂ ja O₃ kontsentratsioone selgus, et koosmõjus kõrgeenenud lämmastikdioksiidi kontsentratsiooniga on osoon taimedele vähem toksiline. Samas katses näidati, et kui taim oli ainult NO₂ mõjualas, suurenes rakkudes nitraadi reduktaasi aktiivsus, kuid lämmastikdioksiid ja osooni koosmõju vähendas taimes nitraadi reduktaasi aktiivsust ning lämmastikoksiidide

assimilatsiooni. Ka Adaros jt. (1991) näitas, et üksinda oli osoon taimedele toksilisem kui lämmastikdioksiidiga koosmõjus.

Dilämmastikoksiidi (N_2O) voogude ja kõrgeenenud osoonisisalduse seoste kohta taimedes on andmeid vähe, kuid Andersen jt. (1997) näitasid, et osoon vähendab seemiktaimede juurdekasvu. See omakorda võib muuta taimed vastuvõtlikumaks teistele stressitekitajatele ning kuna juurtega omastatakse mullast dilämmastikoksiidide (N_2O) (Bowatte jt. 2014), siis eeldatavalt juurekahjustuste tõttu dilämmastikoksiidi vood taimes vähenevad.

Kokkuvõte

Antud referatiivse töö eesmärk oli uurida, millised on enamlevinud lämmastikoksiidide (NO, NO₂, N₂O) peamised allikad ja kuidas taimed ise lämmastikoksiide sünteesivad ning atmosfäärist omastavad. Samuti oli töö eesmärk uurida, milline on erinevate taime poolt sünteesitud ning keskkonnast omastatud lämmastikoksiidide mõju taime füsioloogiale ning kuidas mõjutavad seda erinevused keskkonnatingimustes.

On leitud, et looduslike protsesside tagajärjel paisatakse keskkonda märkimisväärsel hulga lämmastikoksiide ja dilämmastikoksiide. Seejuures emiteerivad lämmastikoksiide ka taimed, kes suudavad erinevaid lämmastikoksiide ise sünteesida ja keskkonnast omastada, kuid see sõltub erinevustest keskkonnatingimustes ning taime enda lämmastiku sisaldusest. Kõige paremini on uuritud lämmastikmonoksiidi (NO) sünteesirajad ja mõju taimes. Pidevalt kasvab teadustööde hulk, mis näitavad, kuivõrd mitmekülgse mõjuga on lämmastikmonoksiid taimedele, mõjutades näiteks lehe kasvu ning osaledes samal ajal õhulõhede sulgumisprotsessis ning leevendades keskkonnatingimuste muutustest tulenevat stressi. Samuti tegeletakse aktiivselt lämmastikdioksiidi (NO₂) rolli uurimisega taimel, mis suuresti kattub NO funktsioonidega. Keerukaks teeb need uuringud NO ja NO₂ molekulide reaktiivsus, mistõttu nad transformeeruvad äärmiselt kiiresti erinevateks lämmastikühenditeks. Samuti komplitseerib erinevate lämmastikoksiidide mõju uurimist taimedele nende mõju tugev sõltuvus teistest taime signaalmolekulidest. Kui NO ja NO₂ mõjutavad oluliselt taimede funktsioneerimist, siis dilämmastikoksiidi (N₂O) suurem tähtsus seisneb tema olulises mõjus ülemiste atmosfäärikihtide füüsikalistele omadustele.

Üheks senini probleemseimaks küsimuseks on lämmastikoksiidide süntees taimedes. Kõige paremini on teada nitraadi reduktaasi (NR) ja lämmastikoksiidide sünteesi (NOS) rajad, kuid arvatakse, et taimes võib olla ka alternatiivseid sünteesiradu, mille täpsed mehhanismid on veel teadmata. Samuti on uuritud, kuidas mõjutavad taimede kasvu lämmastikoksiidide sünteesi ning omastamist erinevad keskkonnatingimused ning on leitud, et lämmastikmonoksiid (NO) omab olulist rolli keskkonnastressiga võitlemisel. Vähem on teada teiste taime enda poolt emiteeritavate ja omastatavate lämmastikoksiidide rollist

keskkonnatingimuste muutusega kohanemisel ning saadud tulemused on kohati vastakad ning lünklikud.

Kuigi lämmastikoksiide on väga palju uuritud, on siiani palju vastusteta küsimusi, mis vajaksid täiendavaid eksperimente. Palju küsimusi tekib veel seoses võimalike lämmastikoksiidide sünteesiradadega ning lämmastikoksiidide mõjuga taimes. Kuna suur osa uuringuid on läbi viidud vaid paari liigiga, puudub info võimaliku liigispetsiifilisuse kohta.

Summary

Nitrogen oxides in plants

This study set out to determine, which are the main sources of nitrogen oxides (NO, NO₂, N₂O) and to examine nitrogen oxide synthesis pathways in plants and uptake from atmosphere. Furthermore the aim of this study was to determine, how synthesized and uptaken nitrogen oxides affect plant physiology and if these relations depend on differences in environment.

It is confirmed that due to several natural processes, nitrogen oxides are emitted to the environment. Plants also emit remarkable amount of nitrogen oxides as they synthesize nitrogen oxides by themselves and at the same time are capable to assimilate nitrogen oxides from the environment. However, nitrogen oxide synthesis and uptake from atmosphere depends on environment and on overall nitrogen content of plants. At this point most of the research has concentrated on nitric oxide (NO) synthesis pathways and impact on plants. It is shown that nitric oxide is a very versatile hormone in plants, affecting plant growth and at the same time being an important signalling molecule at stomatal closure. It is suggested, that nitrogen dioxide (NO₂) and nitric oxide (NO) have similar role in plant physiology. Because of the high reactivity of nitrogen oxides, they are difficult to study, while quickly transforming to different nitrogen compounds. Other complication in the research is due to the fact that nitrogen oxides are in strong concurrence with other signalling molecules of plants. While NO and NO₂ are important to plant functioning, nitrous oxide (N₂O) serves mainly as an important determinant of physical properties of upper layers of atmosphere.

One of the problematic questions is nitrogen oxide synthesis pathways in plants. Most of the studies are about nitrate reductase (NR) and nitrogen oxides synthesis (NOS), but it is considered that there are alternative nitrogen oxides synthesis pathways in plants, which need further experimental investigations. Different studies have examined, how environment conditions affect nitrogen oxide synthesis and plant development and it was found, that nitric oxide (NO) has an important role fighting with environmental stress. Less is known about other nitrogen oxides and their interactions with environment, because the results are often insufficient and incompatible.

Although there have been many studies of nitrogen oxides and on their impact on plants, there are still plenty of questions, which need further investigation. Considerably more work needs to be done to determine alternative nitrogen oxides synthesis pathways and nitrogen oxides impact on plants. Also a large number of the research is only on a few modelspecies, so there is no information of possible species specificity.

Tänuõnad

Käesoleva töö valmimise eest tahaksin tänada oma suurepärast juhendajat Pille Mändi, kes varustas mu tööd põhjalike kommentaaridega, aitas otsida teemakohast materjali ning innustas mind kirjutamisel.

Kasutatud kirjandus

- 1) Adaros, G., Weigel, H. J. & Jäger, J. (1991). Concurrent exposure to SO₂ and/or NO₂ alters growth and yield responses of wheat and barley to low concentrations of O₃. *New Phytologist*, 118: 581-591
- 2) Ahlfors, R., Brosche, M., Kollist, H. & Kangasjärvi, J. (2009). Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 58: 1-12
- 3) Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J. et al. (2011). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell & Environment*, 35: 281-295
- 4) Alm, J., Saarnio, S., Nykänen, H., Silvola, J. & Martikainen, P. J. (1999). Winter CH₄, CO₂ and N₂O fluxes on some natural and drained boreal peatlands. *Biogeochemistry*, 44: 163–186
- 5) Andersen, C., Wilson, R., Plocher, M. & Hogsett, W. (1997). Carry-over effects of ozone on root growth and carbohydrate concentrations of ponderosa pine seedlings. *Tree Physiology*, 17: 805-811
- 6) Andrew, P. & Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovascular Research*, 43: 521-531
- 7) Aneja, V., Roelle, P., Murray, G., Southerland, J., Erisman, J. & Fowler, D. et al. (2001). Atmospheric nitrogen compounds II: emissions, transport, transformation, deposition and assessment. *Atmospheric Environment*, 35: 1903-1911
- 8) Aneja, V., Schlesinger, W., Erisman, J., Behera, S., Sharma, M. & Battye, W. (2012). Reactive nitrogen emissions from crop and livestock farming in India. *Atmospheric Environment*, 47: 92-103
- 9) Baggs, E. M. & Philippot, L. (2010). Microbial Terrestrial Pathways to Nitrous Oxide. In: Smith, K. A. Nitrous oxide and climate change (Ed.). Earthscan: 4-35

- 10) Bai, X., Yang, L., Tian, M., Chen, J., Shi, J., Yang, Y. & Hu, X. (2011). Nitric Oxide Enhances Desiccation Tolerance of Recalcitrant *Antiaris toxicaria* Seeds via Protein S-Nitrosylation and Carbonylation. *Plos One*, 6: e20714
- 11) Balachandran, S., Hurry, V., Kelley, S., Osmond, C., Robinson, S., Rphozinski, J. et al. (1997). Concepts of plant biotic stress. Some insights into the stress physiology of virus-infected plants, from the perspective of photosynthesis. *Physiologia Plantarum*, 100: 203-213
- 12) Baldantoni, D., Fagnano, M. & Alfani, A. (2011). Tropospheric ozone effects on chemical composition and decomposition rate of *Quercus ilex L.* leaves. *Science Of The Total Environment*, 409: 979-984
- 13) Baruah, K., Gogoi, B., Borah, L., Gogoi, M. & Boruah, R. (2011). Plant morphophysiological and anatomical factors associated with nitrous oxide flux from wheat (*Triticum aestivum*). *Journal Of Plant Research*, 125: 507-516
- 14) Beers, E. P. & McDowell, J. M. (2001). Regulation and execution of programmed cell death in response to pathogens, stress and developmental cues. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 561-567
- 15) Beligni, M. & Lamattina, L. (2001). Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment*, 24: 267-278
- 16) Bell, J. & Treshow, M. (2002). *Air Pollution and Plant Life* (2nd ed.) West Sussex: John Wiley & Sons Ltd., 119-131
- 17) Bender, J., Weigel, H. J. & Jäger, H. J. (1991). Response of nitrogen metabolism in beans (*Phaseolus vulgaris L.*) after exposure to ozone and nitrogen dioxide, alone and in sequence. *New Phytologist*, 119: 261-267
- 18) Besson-Bard, A., Pugin, A. & Wendehenne, D. (2008). New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biology*, 59: 21-39
- 19) Bowatte, S., Newton, P., Theobald, P., Brock, S., Hunt, C. & Liefferring, M. et al. (2014). Emissions of nitrous oxide from the leaves of grasses. *Plant and Soil*, 374: 275-283
- 20) Bremner, J. & Blackmer, A. (1978). Nitrous oxide: emission from soils during nitrification of fertilizer nitrogen. *Science*, 199: 295-296

- 21) Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Weir, I. & Neill, S. (2006). ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal*, 45: 113-122
- 22) Bybordi, A. & Ebrahimian, E. (2011). Effect of Salinity Stress on Activity of Enzymes Involved in Nitrogen and Phosphorous Metabolism Case Study: Canola (*Brassica napus* L.). *Asian Journal Of Agricultural Research*, 5: 208-214
- 23) Cameron, K., Di, H. & Moir, J. (2013). Nitrogen losses from the soil/plant system: a review. *Annals Of Applied Biology*, 162: 145-173
- 24) Campbell, W. H. (1999). Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annual Review Of Plant Biology*, 50: 277-303
- 25) Cantrel, C., Vazquez, T., Puyaubert, J., Reze, N., Lesch, M. & Kaiser, W. et al. (2011). Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 189: 415-427
- 26) Chaparro-Suarez, I., Meixner, F. & Kesselmeier, J. (2011). Nitrogen dioxide (NO₂) uptake by vegetation controlled by atmospheric concentrations and plant stomatal aperture. *Atmospheric Environment*, 45: 5742-5750
- 27) Cho, U. & Seo, N. (2005). Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science*, 168: 113-120
- 28) Corpas, F., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R. & Palma, J. et al. (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant And Cell Physiology*, 49: 1711-1722
- 29) Corpas, F. J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J. M. & Barroso, J. B. (2011). Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science*, 181: 604-611
- 30) Correa-Aragunde, N., Foresi, N. & Lamattina, L. (2013). Structure diversity of nitric oxide synthases (NOS): the emergence of new forms in photosynthetic organisms. *Frontiers In Plant Science*, 4

- 31) Davidson, E. & Kinglerlee, W. (1997). A global inventory of nitric oxide emissions from soils. *Nutrient Cycling In Agroecosystems*, 48: 37-50
- 32) De Marco, A., Esposito, F., Berg, B., Giordano, M. & Virzo De Santo, A. (2013). Soil C and N sequestration in organic and mineral layers of two coeval forest stands implanted on pyroclastic material (Mount Vesuvius, South Italy). *Geoderma*, 209: 128-135
- 33) Desikan, R., Soheila, A., Hancock, J. & Neill, S., et al. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiology*, 127: 159-172
- 34) Desikan, R., Cheung, M., Bright, J., Henson, D., Hancock, J. & Neill, S. (2004). ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal Of Experimental Botany*, 55: 205-212
- 35) Dobbie, K., McTaggart, I. & Smith, K. (1999). Nitrous oxide emissions from intensive agricultural systems: variations between crops and seasons, key driving variables, and mean emission factors. *Journal Of Geophysical Research: Atmospheres (1984-2012)*, 104: 26891-26899
- 36) Durner, J. & Klessig, D. (1999). Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion In Plant Biology*, 2: 369-374
- 37) Dwivedi, P. & Choudhury, S. (2012). Nitric oxide as a signaling molecule in plants. *International Journal Of Agriculture, Environment & Biotechnology*, 5: 303-308
- 38) Fehsenfeld, F., Calvert, J., Fall, R., Goldan, P., Guenther, A., Hewitt, C. et al. (1992). Emissions of volatile organic compounds from vegetation and the implications for atmospheric chemistry. *Global Biogeochemical Cycles*, 6: 389-430
- 39) Foresi, N., Correa-Aragunde, N., Parisi, G., Calo, G., Salerno, G. & Lamattina, L. (2010). 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*, 22: 3816–3830
- 40) Fowler, D., Coyle, M., Skiba, U., Sutton, M., Cape, J., Reis, S. et al. (2013). The global nitrogen cycle in the twenty-first century. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, 368: 20130164

- 41) Furlan, C. M., Domingos, M. & Salatino, A. (2007). Effects of initial climatic conditions on growth and accumulation of fluoride and nitrogen in leaves of two tropical tree species exposed to industrial air pollution. *Science Of The Total Environment*, 374: 399-407
- 42) Fröhlich, A. & Durner, J. (2011). The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): is one really needed?. *Plant Science*, 181: 401-404
- 43) Galloway, J., Dentener, F., Capone, D., Boyer, E., Howarth, R., Seitzinger, S. et al. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70: 153-226
- 44) Garcia-Mata, C. & Lamattina, L. (2001). Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology*, 126: 1196-1204
- 45) Gouble, B., Fath, D. & Soudain, P. (1995). Nitrous oxide inhibition of ethylene production in ripening and senescing climacteric fruits. *Postharvest Biology And Technology*, 5: 311-321
- 46) Gould, K., Lamotte, O., Klinguer, A., Pugin, A. & Wendehenne, D. (2003). Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant, Cell & Environment*, 26: 1851-1862
- 47) Groffman, P., Hardy, J., Driscoll, C. & Fahey, T. (2006). Snow depth, soil freezing, and fluxes of carbon dioxide, nitrous oxide and methane in a northern hardwood forest. *Global Change Biology*, 12: 1748-1760
- 48) Groß, F., Durner, J. & Gaupels, F. (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in plant science*, 4
- 49) Gruber, N. & Galloway, J. (2008). An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature*, 451: 293-296
- 50) Guo, Y., Tian, Z., Yan, D., Zhang, J. & Qin, P. (2005). Effects of nitric oxide on salt stress tolerance in *Kosteletzkya virginica*. *Life Science Journal*, 6: 67-75
- 51) Hakata, M., Takahashi, M., Zumft, W., Sakamoto, A. & Morikawa, H. (2003). Conversion of the nitrate nitrogen and nitrogen dioxide to nitrous oxides in plants. *Acta Biotechnologica*, 23: 249-257.

- 52) Hansen, R., Mander, Ü., Soosaar, K., Maddison, M., Lõhmus, K., Kupper, P., Kanal, A., Sõber, J. (2013). Greenhouse gas fluxes in an open air humidity manipulation experiment. *Landscape Ecology*, 28: 637-649
- 53) He, Y., Tang, R., Hao, Y., Stevens, R., Cook, C., Ahn, S. et al. (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science*, 305: 1968-1971
- 54) Jin, C. W., Du, S. T., Zhang, Y. S., Tang, C. & Lin, X. Y. (2009). Atmospheric nitric oxide stimulates plant growth and improves the quality of spinach (*Spinacia oleracea*). *Annals of Applied Biology*, 155: 113-120
- 55) Kampa, M. & Castanas, E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution*, 151: 362-367
- 56) Kang, G., Wang, C., Sun, G. & Wang, Z. (2003).. Salicylic acid changes activities of H₂O₂ metabolizing enzymes and increases the chilling tolerance of banana seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 50: 9-15
- 57) Karlsson, P., Medin, E., Wickström, H., Sellden, G., Wallin, G., Ottosson, S. & Skärby, L. (1995). Ozone and drought stress—Interactive effects on the growth and physiology of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.). *Water, Air, And Soil Pollution*, 85: 1325-1330
- 58) Krupa, S. (2003). Effects of atmospheric ammonia (NH₃) on terrestrial vegetation: a review. *Environmental Pollution*, 124: 179-221
- 59) Larkindale, J., Hall, J., Knight, M., & Vierling, E. (2005). Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology*, 138: 882-897
- 60) Leshem, Y. (1996). Nitric oxide in biological systems. *Plant Growth Regulation*, 18: 155-159
- 61) Leshem, Y., Wills, R. & Ku, V. (1998). Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO•) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology And Biochemistry*, 36: 825-833

- 62) Liu, J., Liu, G., Hou, L. & Liu, X. (2010a). Ethylene-induced nitric oxide production and stomatal closure in *Arabidopsis thaliana* depending on changes in cytosolic pH. *Chinese Science Bulletin*, 55: 2403-2409
- 63) Liu, X. Z. & Huang, B. R. (2000). Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bentgrass. *Crop Science*, 40: 503–510
- 64) Liu, Y., Jiang, H., Zhao, Z. & An, L. (2010b). Nitric oxide synthase like activity-dependent nitric oxide production protects against chilling-induced oxidative damage in *Chorispora bungeana* suspension cultured cells. *Plant Physiology And Biochemistry*, 48: 936-944
- 65) Lum, H., Butt, Y. & Lo, S. (2002). Hydrogen Peroxide Induces a Rapid Production of Nitric Oxide in Mung Bean (*Phaseolus aureus*). *Nitric Oxide*, 6: 205-213
- 66) Lundberg, J., Weitzberg, E. & Gladwin, M. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7: 156-167
- 67) Ma, C., Xu, X., Hao, L. & Cao, J. (2007). Nitrogen Dioxide-Induced Responses in *Brassica campestris* Seedlings: The Role of Hydrogen Peroxide in the Modulation of Antioxidative Level and Induced Resistance. *Agricultural Sciences In China*, 6: 1193-1200
- 68) Magalhaes, J., Monte, D. & Durzan, D. (2000). Nitric Oxide and Ethylene Emission from *Arabidopsis thaliana*. *Physiology And Molecular Biology Of Plants*, 6: 117-127
- 69) Mahajan S. & Tuteja N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 444: 139-158
- 70) Martinez-Lüscher, J., Morales, F., Delrot, S., Sanchez-Diaz, M., Gomes, E., Aguirreolea, J. & Pascual, I. (2013). Short-and long-term physiological responses of grapevine leaves to UV-B radiation. *Plant Science*, 213: 114-122
- 71) Matyssek, R., Le Thiec, D., Löw, M., Dizengremel, P., Nunn, A. & Häberle, K. (2006). Interactions between drought and O₃ stress in forest trees. *Plant Biology*, 8: 11-17
- 72) McCarty, J. (2001). Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, 15: 320-331

- 73) Mehlhorn, H. & Wellburn, A. (1987). Stress ethylene formation determines plant sensitivity to ozone. *Nature*, 327: 417-418
- 74) Moir, J. (2011). *Nitrogen cycling in bacteria* (1st ed.). Norfolk, UK: Caister Academic Press, 211-213
- 75) Mur, L., Kenton, P., Lloyd, A., Ougham, H. & Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal Of Experimental Botany*, 59: 501-520
- 76) Nakano, Y. & Asada, K. (1981). Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant And Cell Physiology*, 22: 867-880
- 77) Neighbour, E., Cottam, D. & Mansfield, T. (1988). Effects of sulphur dioxide and nitrogen dioxide on the control of water loss by birch (*Betula spp.*). *New Phytologist*, 108: 149-157
- 78) Neill, S., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D. & Wilson, I. (2008). Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal Of Experimental Botany*, 59: 165-176
- 79) Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R. & Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *Journal Of Experimental Botany*, 53: 1237-1247
- 80) Neill, S., Desikan, R. & Hancock, JT. (2003). Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist*, 159: 11-35
- 81) Neubert, A., Kley, D., Wildt, J., Segschneider, H. J. & Förstel, H. (1993). Uptake of NO, NO₂ and O₃ by sunflower (*Helianthus annuus L.*) and tobacco plant (*Nicotiana tabacum L.*): dependence on stomatal conductivity. *Atmospheric Environment*, 27A: 2137–2145
- 82) Noodén, L.D. & Leopold, A.C. (2012). *Senescence and aging in plants*. Elsevier, Academic press INC. London: 1-526
- 83) Nouchi, I. (2002). Responses of whole plants to air pollutions. In: Omasa K, Saji H, Youssefian S, Kondo N, eds, *Air Pollution and Plant Biotechnology*. Springer-Verlag, Tokyo: 3-40

- 84) Nykänen, H., Alm, J., Lång, K., Silvola, J. & Martikainen, P.J. (1995). Emissions of CH₄, CO₂ and N₂O from a virgin fen and a fen drained for grassland in Finland. *Journal of Biogeography*, 22: 351–357
- 85) Oertel, C., Herklotz, K., Matschullat, J. & Zimmermann, F. (2012). Nitric oxide emissions from soils: a case study with temperate soils from Saxony, Germany. *Environmental Earth Sciences*, 66: 2343-2351
- 86) Palavan-Unsal, N. & Arisan, D. (2009). Nitric oxide signalling in plants. *The Botanical Review*, 75: 203-229
- 87) Palomer, X., Roig-Villanova, I., Grima-Calvo, D. & Vendrell, M. (2005). Effects of nitrous oxide (N₂O) treatment on the postharvest ripening of banana fruit. *Postharvest Biology And Technology*, 36: 167-175
- 88) Pilegaard, K., Skiba, U., Ambus, P., Beier, C., Brüggemann, N. & Butterbach-Bahl, K. et al. (2006). Factors controlling regional differences in forest soil emission of nitrogen oxides (NO and N₂O). *Biogeosciences*, 3: 651-661
- 89) Range, P., Badeck, F-W., Plöchl, M. & Kohlmaier GH. (1993). Apoplastic antioxidants as decisive elimination factors within the uptake of nitrogen dioxide into leaf tissue. *New Phytologist*, 125: 771–785
- 90) Ren, H., Xu, Z., Zhang, W., Jiang, L., Huang, J. & Chen, S. et al. (2013). Linking ethylene to nitrogen-dependent leaf longevity of grass species in a temperate steppe. *Annals Of Botany*, 112: 1879-1885
- 91) Ruan, H., Shen, W., Ye, M. & Xu, L. (2002). Protective effects of nitric oxide on salt stress-induced oxidative damage to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *Chinese Science Bulletin*, 47: 677-681.
- 92) Saitanis, C. J., Riga-Karandinos, A. N. & Karandinos, M. G. (2001) Effects of ozone on chlorophyll and quantum yield of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) varieties. *Chemosphere*, 42: 945–953
- 93) Sang, J., Jiang, M., Lin, F., Xu, S., Zhang, A. & Tan, M. (2008). Nitric oxide reduces hydrogen peroxide accumulation involved in water stress-induced subcellular antioxidant defense in maize plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50: 231-243

- 94) Shapiro, A. D. (2005). Nitric oxide signaling in plants. *Vitamins and Hormones*, 72: 339-398
- 95) She, X. P., Song, X. G. & He, J. M. (2004) Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in light/dark-regulated stomatal movement in *Vicia faba*. *Acta Botanica Sinica*, 46: 1292-1300
- 96) Siddiqui, M. H., Al-Whaibi, M. H, & Basalah, M. O. (2011). Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma*, 248, 447-455
- 97) Simpson, D., Winiwarter, W., Borjesson, G., Cinderby, S., Ferreiro, A. & Guenther, A. (1999). Inventorying emissions from nature in Europe. *Journal Of Geophysical Research: Atmospheres* (1984-2012), 104: 8113-8152
- 98) Smart, D. & Bloom, A. (2001). Wheat leaves emit nitrous oxide during nitrate assimilation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 98: 7875-7878
- 99) Song, C., Wang, Y., Wang, Y. & Zhao, Z. (2006). Emission of CO₂, CH₄ and N₂O from freshwater marsh during freeze-thaw period in Northeast of China. *Atmospheric Environment*, 40: 6879-6885
- 100) Song, L., Ding, W., Shen, J., Zhang, Z., Bi, Y. & Zhang, L. (2008). Nitric oxide mediates abscisic acid induced thermotolerance in the calluses from two ecotypes of reed under heat stress. *Plant Science*, 175: 826-832
- 101) Sparks, J. (2009). Ecological ramifications of the direct foliar uptake of nitrogen. *Oecologia*, 159: 1-13
- 102) Sparks, J. P., Monson, R. K., Sparks, K. L. & Lerdau, M. T. (2001). Leaf uptake of nitrogen dioxide (NO₂) in a tropical wet forest: implications for tropospheric chemistry. *Oecologia* 127: 214–221
- 103) Stulen, I., Perez-Soba, M., De Kok, L. & Van Der Eerden, L. (1998). Impact of gaseous nitrogen deposition on plant functioning. *New Phytologist*, 139: 61-70
- 104) Zhang, A., Jiang, M., Zhang, J., Ding, H., Xu, S., Hu, X. & Tan, M. (2007) Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist*, 175: 36-50

- 105) Zhang J. and Davies WJ. (1989). Abscisic acid produced in dehydrating roots may enable the plant to measure the water status of the soil. *Plant Cell Environ*, 12: 73–81
- 106) Zhao, L., He, J., Wang, X. & Zhang, L. (2008). Nitric oxide protects against polyethylene glycol-induced oxidative damage in two ecotypes of reed suspension cultures. *Journal Of Plant Physiology*, 165: 182-191
- 107) Zhao, L., Zhang, F., Guo, J., Yang, Y., Li, B. & Zhang, L. (2004). Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. *Plant Physiology*, 134: 849-857
- 108) Zhao, M., Chen, L., Zhang, L. & Zhang, W. (2009). Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 151: 755-767
- 109) Taiz, L. & Zeiger, E. (2010a). Water and Plant Cells. In: *Plant physiology* (5th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates: 67-84
- 110) Taiz, L. & Zeiger, E. (2010b). Assimilation of Mineral Nutrient. In: *Plant physiology* (5th ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates: 343-368
- 111) Takahashi, M., Furuhashi, T., Ishikawa, N., Horiguchi, G., Sakamoto, A., Tsukaya, H. & Morikawa, H. (2013). Nitrogen dioxide regulates organ growth by controlling cell proliferation and enlargement in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 201: 1304:1315
- 112) Takahashi, M., Sasaki, Y., Ida, S. & Morikawa, H. (2001). Nitrite reductase gene enrichment improves assimilation of NO₂ in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126: 731–741
- 113) Takahashi, S. & Yamasaki, H. (2002). Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Letters*, 512: 145-148
- 114) Tanaka, Y., Sano, T., Tamaoki, M., Nakajima, N., Kondo, N. & Hasezawa, S. (2005). Ethylene inhibits abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 138: 2337-2343
- 115) Taylor, O. C., Thompson, C. R., Tingey, T. D. & Reinet, R. A. (2012). Oxides of Nitrogen. In: Mudd, J. B. & Kozlowski, T. T. *Responses of Plants to Air Pollution*. Academic Press, Inc., New York: 122-138

- 116) Teklemariam, T. & Sparks, J. (2006). Leaf fluxes of NO and NO₂ in four herbaceous plant species: The role of ascorbic acid. *Atmospheric Environment*, 40: 2235-2244
- 117) Tewari, R., Prommer, J. & Watanabe, M. (2013). Endogenous nitric oxide generation in protoplast chloroplasts. *Plant Cell Reports*, 32: 31-44
- 118) Thoene, B., Rennenberg, H. & Weber, P. (1996). Absorption of atmospheric NO₂ by spruce (*Picea abies*) trees. *New Phytologist*, 134: 257-266
- 119) Throop, H., Holland, E. A., Parton, W., Ojima, D. & Keough, C. (2004). Effects of nitrogen deposition and insect herbivory on patterns of ecosystem-level carbon and nitrogen dynamics: results from the century model. *Global Change Biology*, 10: 1092-1105
- 120) Tischner, R. (2000). Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. *Plant, Cell & Environment*, 23: 1005-1024
- 121) Uchida, A., Jagendorf, A., Hibino, T., Takabe, T. & Takabe, T. (2002). Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Science*, 163: 515-523
- 122) VanLoon, G. & Duffy, S. J. (2011). *Environmental chemistry* (3 ed.). Oxford: Oxford University Press: 19-205
- 123) Vandelle, E., Zaninotto, F. & Delledonne, M. (2007). *Nitric Oxide Signalling in Plants*. John Wiley & Sons, Ltd.
- 124) Vitousek, P., Aber, J., Howarth, R., Likens, G., Matson, P., Schindler, D. et al. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological Applications*, 7: 737-750
- 125) Wang, X., Liu, Z., Niu, L. & Fu, B. (2012). Long-term effects of simulated acid rain stress on a staple forest plant, *Pinus massoniana* Lamb: a proteomic analysis. *Trees*, 27: 297-309
- 126) Warneck, P. (1999). *Chemistry of the natural atmosphere* (2st ed.). San Diego: Academic Press, 511-574

- 127) Weber, P. & Rennenberg, H. (1996). Dependency of nitrogen dioxide (NO₂) fluxes to wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves from NO₂ concentration, light intensity, temperature and relative humidity determined from controlled dynamic chamber experiments. *Atmospheric Environment*, 30: 3001-3009
- 128) Wildt, J., Kley, D., Rockel, A., Rockel, P. & Segschneider, H. (1997). Emission of NO from several higher plant species. *Journal Of Geophysical Research: Atmospheres* (1984-2012), 102: 5919-5927
- 129) Wilson, I., Neill, S., & Hancock, J. (2008). Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 31: 622-631
- 130) Wojtaszek, P. (2000). Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry*, 54: 1-4
- 131) Yang, S. & Hoffman, N. (1984). Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annual Review Of Plant Physiology*, 35: 155-189
- 132) Yendrek, C. R., Leisner, C. P. & Ainsworth, E. A. (2013). Chronic ozone exacerbates the reduction in photosynthesis and acceleration of senescence caused by limited N availability in *Nicotiana sylvestris*. *Global Change Biology*, 19: 3155-3166

Internetiallikad:

- 1) Oksanen, E. [2014], Environmental Pollution and Function of Plant Leaves, in *Physiology and Maintenance*, edited by Hänninen, O., & Atalay, M, in *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Developed under the Auspices of the UNESCO, Eolss Publishers, Paris, France, [<http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/e6-54-10-07.pdf>] 20.05.2014

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Marge Sepp, (sünnikuupäev: 23.10.1992)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Taimeomased lämmastikoksiidid, mille juhendaja on Pille Mänd,
 - 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
 - 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **27.05.2014**