

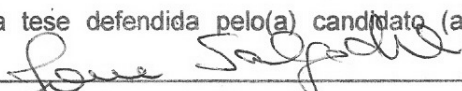
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

KELLY SELIGMAN

**IMPORTÂNCIA DO RADICAL ÓXIDO NÍTRICO NO
PROCESSO DE FLORAÇÃO UTILIZANDO-SE
Arabidopsis thaliana L. COMO MODELO**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção
do Título de Mestre em Biologia
Funcional e Molecular, na área de
Bioquímica.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)


KELLY SELIGMAN
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cecília Alzira Pinto-Maglio

Campinas, 2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP

Se48i	<p>Seligman, Kelly Importância do radical óxido nítrico no processo de floração utilizando-se <i>Arabidopsis thaliana</i> L. como modelo / Kelly Seligman. – Campinas, SP: [s.n.], 2008.</p> <p>Orientadores: Ione Salgado, Cecília Alzira Pinto Maglio. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Óxido nítrico. 2. Nitrato redutases. 3. Desenvolvimento floral. 4. Indução floral. 5. <i>Arabidopsis thaliana</i>. I. Salgado, Ione. II. Maglio, Cecília Alzira Pinto. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p> <p>(scs/ib)</p>
-------	---

Título em inglês: Importance of nitric oxide radical in floral development process using *Arabidopsis thaliana* L. as a model.

Palavras-chave em inglês: Nitric oxide; Nitrate reductases; Floral development; Floral induction; *Arabidopsis thaliana*.

Área de concentração: Bioquímica.

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular.

Banca examinadora: Ione Salgado, Helenice Mercier, Eliana Regina Forni Martins.

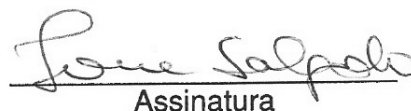
Data da defesa: 21/02/2008.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Funcional e Molecular.

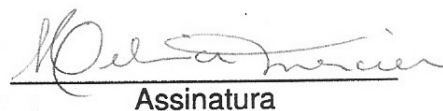
Campinas, 21 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

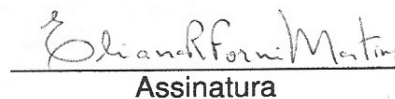
Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)
(Depto. de Bioquímica – IB – UNICAMP)


Assinatura

Profa. Dra. Helenice Mercier
(Depto. de Botânica – IB – USP)


Assinatura

Profa. Dra. Eliane Regina Forni Martins
(Depto. de Botânica – IB – UNICAMP)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Ângela Machado de Carvalho
(Instituto de Botânica de São Paulo)

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha
(Depto. de Bioquímica – IB – UNICAMP)

Assinatura

“Eu aprendi que a maneira mais fácil para eu crescer como
pessoa é me cercar de gente mais inteligente do que eu.”

William Shakespeare

Esta tese é carinhosamente dedicada às
pessoas mais importantes da minha vida.
Minha querida mãe, que diante das
dificuldades me ensinou a erguer a cabeça
e seguir adiante. Meu pai, meu herói, que
mostrou o verdadeiro significado de “May
the force be with you” e minha sobrinha,
Giovanna, que me fez enxergar a beleza na
simplicidade da vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a oportunidade e força de vontade de desenvolver esta pesquisa.

Aos meus familiares, especialmente aos meus pais, João e Matilde. Pai e mãe, obrigada pela oportunidade, por me fazer acreditar que é possível tornar sonhos em realidade. Agradeço por cada privação a que se submeteram e pelo esforço contínuo e trabalho suado para que eu pudesse chegar aqui. Obrigada por me ensinar a perseverar e a superar os obstáculos, que por mais difíceis que sejam não são intransponíveis. Acima de tudo, sou grata pela vida que me concederam e por me ajudarem a ser, diariamente, uma pessoa melhor.

À minha irmã, Katia Seligman, que desde o início da minha graduação me incentivou o ingresso no mundo científico.

À Profa. Dra. Ione Salgado pela dedicada orientação, experiência científica e competência, mantendo-me sempre perseverante.

À Profa. Dra. Cecília Alzira Pinto-Maglio pela co-orientação e por sua importante contribuição na parte experimental de meu projeto.

À Profa. Dra. Cláudia R. B. Haddad por ceder um espaço na casa de vegetação para o cultivo das plantas de *A.thaliana*.

À profa. Dra. Eneida de Paula por ter cedido seu laboratório para os experimentos de espectrofluorimetria.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos professores Dr. Hiroshi Aoyama, Dra. Fernanda Ramos Gadelha e Dra. Eliana Regina Forni Martins pela participação no exame de qualificação com sugestões e correções enriquecedoras para o meu trabalho.

Aos colegas de trabalho do laboratório de Bioquímica de Plantas (Lab. 05), tenho que agradecer-los cada um, pela singularidade e carinho a mim dedicados durante esta jornada. Jusceley (Ju), obrigada pelas conversas divertidas, pelos momentos de descontração, pela ajuda que me ofereceu sempre que precisei e, mais importante, por não me deixar desistir dos meus objetivos. Elzira, agradeço o carinho e a preocupação, os conselhos e as conversas durante os almoços no laboratório. Halley, amigo e companheiro de turma, sou grata pelas dúvidas esclarecidas, conselhos sugeridos, por me ajudar sempre que precisei. Sem dúvida seus contos propiciaram momentos de distração durante nossa rotina de experimentos. Fefo, agradeço pela descontração nos momentos de estresse e pelos conselhos. E ao Pablo (Pablito), esta figura recém chegada ao lab, serei grata indubitavelmente pelas risadas compartilhadas, pelos momentos divertidos e pelo carinho do amigo com quem pude contar nas horas difíceis.

À Luzia V. Modolo, pois mesmo não fazendo mais parte do laboratório, foi você quem me ensinou a dar os primeiros passos no universo científico, sempre com muita paciência e disponibilidade em ajudar.

Às secretárias Andréia A. Vigilatto e Marina A. da Cruz pela amizade e auxílio nos processos burocráticos.

Ao amigo querido Raphael Morales e também companheiro de jornada. Sua amizade tornou mais divertida a conclusão do meu mestrado.

Às melhores amigas Daniela (Migu), Kívia e Lu, por compartilharem comigo os momentos de muita alegria, mas também os de dificuldades, auxiliando-me com sabedoria, carinho e palavras de conforto neste processo de crescimento profissional. Obrigada por estarem presentes sempre quando precisei e pela troca de experiência. Migu, jamais esquecerei das suas idas ao lab e das gargalhadas histéricas! Kívia, meu agradecimento especial pelo carinho e pela amizade durante toda a graduação e a pós, e pela ajuda mais do que necessária naquela noite de sábado com o Origin.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Origem biossintética do NO.....	3
1.2. NO e o Processo de Floração.....	6
1.3. Detecção de NO por indicadores fluorescentes.....	9
1.4. Estrutura e desenvolvimento floral de <i>Arabidopsis thaliana</i>	13
2. OBJETIVOS.....	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material vegetal: <i>A. thaliana</i>	17
3.2. Visualização do NO <i>in situ</i>	17
3.3. Quantificação da produção de NO por espectrofluorimetria.....	18
3.4. Análise dos Parâmetros de Indução Floral.....	19
3.5. Número amostral.....	20
4. RESULTADOS.....	20
4.1. Localização da síntese de NO pelas estruturas florais de <i>A. thaliana</i> detectada com DAF-2DA	20
4.2. Localização da síntese de NO em diferentes estágios de desenvolvimento floral de <i>A. thaliana</i> detectada com DAF-2DA	23
4.3. Emissão de NO nas estruturas florais detectada por DAF- 2DA é prevenida por CPTIO.....	27

4.4. Localização da síntese de NO em diferentes estágios de desenvolvimento floral de <i>A. thaliana</i> detectada com 1,2- DAA.....	29
4.5. Emissão de NO nas estruturas florais, detectada por 1,2- DAA, é prevenida por CPTIO.....	34
4.6. Validação dos dados de microscopia de fluorescência por espectrofluorimetria.....	35
4.7. Efeito da mutação para NR na indução floral.....	40
5. DISCUSSÃO.....	47
5.1. Síntese de NO pelas estruturas florais de <i>A. thaliana</i> detectada com DAF-2DA e 1,2- DAA.....	47
5.2. Efeito da mutação para NR na indução floral.....	50
6. CONCLUSÕES.....	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1** – Representação esquemática das reações envolvendo o indicador DAF-2DA **12**
para a detecção de NO *in vivo* por microscopia de fluorescência.
- Figura 2** – Ilustração das fases vegetativa e reprodutiva de *Arabidopsis thaliana*. **15**
- Figura 3** – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de botões florais de **15**
Arabidopsis thaliana, em diferentes estágios de desenvolvimento.
- Figura 4** – Produção de NO detectada por DAF-2DA, em botões florais de *A. thaliana* **22**
do genótipo selvagem, durante o estágio 12 de desenvolvimento floral.
- Figura 5** – Localização da produção de NO em gineceu e estames de botões florais do **25**
mutante *nia1 nia2* de *A. thaliana*, em diferentes estágios de desenvolvimento floral.
- Figura 6** – Emissão do radical NO por gineceu de plantas de *A. thaliana* do genótipo **26**
selvagem, em diferentes estágios de desenvolvimento.
- Figura 7** – Detecção de NO em gineceus e estames de *A. thaliana* é prevenida por **28**
CPTIO.
- Figura 8** – Produção de NO em gineceu e estames de botões florais de *A. thaliana* **31**
selvagem em diferentes estágios de desenvolvimento floral, detectada por 1,2- DAA.
- Figura 9** - Visualização da produção de NO *in situ* em estames de plantas de *A. thaliana* **32**
selvagem, durante o estágio de desenvolvimento floral 12.
- Figura 10** – Síntese de NO em gineceu e estames de botões florais do mutante *nia1* **33**
nia2 de *A. thaliana* em diferentes estágios de desenvolvimento floral, detectada por 1,2-
DAA.
- Figura 11** – Emissão de fluorescência por gineceu e estames de *A. thaliana* do tipo **35**
selvagem, detectada por 1,2- DAA, é prevenida por CPTIO.

Figura 12 – Espectros de emissão de fluorescência de DAF-2 e DAF-2 DA por botões 38 florais de *A. thaliana* (selvagem e mutante *nia1 nia2*) nos estágios 11 e 13 de desenvolvimento floral.

Figura 13 – Detecção da síntese de NO em botões florais de *A. thaliana* dos genótipos 39 selvagem (WT) e *nia1 nia2*, durante os estágios de desenvolvimento floral 11 e 13, por espectrofluorimetria.

Figura 14 – Emissão de fluorescência por botões florais de *A. thaliana* durante as fases 40 11 e 13 de desenvolvimento.

Figura 15 – Parâmetros de floração nos genótipos selvagem e *nia1 nia2* de *Arabidopsis* 43 *thaliana*.

Figura 16 – Análise comparativa do efeito da deficiência para a enzima NR na indução 44 floral.

Figura 17 – Parâmetros de floração em plantas de *A. thaliana* do genótipo *nia1 nia2*, 45 tratadas com arginina ou glutamina, a 10 mM.

Figura 18 – Análise comparativa do efeito dos tratamentos com arginina e glutamina, a 46 10 mM, na indução floral de plantas de *A. thaliana* do genótipo *nia1 nia2*.

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido dehidroascórbico
1- AQ	aminoantraquinona
4-AF DA	4-aminofluoresceína diacetato
ATD	1-H-antra-[1,2d]-[1,2,3]-triazol-6,11-diona
CPTIO	(2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido)
1,2-DAA	1,2- diaminoantraquinona
DAF-2 DA	4,5-diacetato de diaminofluoresceína
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DEA-NONOato	(2-oxido 2-(N,N-detilamino)-diazenolato)
DHA	Dehidroascorbato
DMSO	dimetil-sulfóxido
NO	Óxido nítrico
NR	Nitrato redutase
ROS	Espécies reativas de oxigênio
WT	Wild-type

RESUMO

O radical óxido nítrico (NO), que pode ser produzido nos organismos pela oxidação de arginina ou redução de nitrito, é uma importante molécula sinalizadora em plantas atuando como modulador de diversos processos metabólicos e de desenvolvimento. Recentemente foi identificado como um dos sinais envolvidos no processo de floração. A transição da fase de crescimento vegetativo para a fase reprodutiva é atrasada em plantas mutantes que superproduzem NO, enquanto que a floração é precoce em plantas mutantes deficientes na síntese deste radical. O principal objetivo deste trabalho foi identificar os sítios de produção de NO durante o desenvolvimento floral de *Arabidopsis thaliana* L. Foram utilizados os indicadores fluorescentes 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA) e 1,2-diaminoantraquinona (1,2-DAA) para localizar *in situ*, por microscopia de fluorescência, a produção de NO em botões florais de *A. thaliana* em diferentes estágios de desenvolvimento. Ainda, a produção de NO pelas estruturas florais foi comparada entre plantas do tipo selvagem e mutante duplo defectivo para os genes estruturais da enzima nitrato redutase - NR - (*nia1 nia2*) que apresentam conteúdo reduzido de aminoácidos e nitrito e, conseqüentemente, de NO em suas folhas. Foi analisado também o efeito do seqüestrador de NO, CPTIO, na prevenção da emissão de fluorescência. Os resultados mostraram que o NO é sintetizado em células e tecidos específicos da estrutura floral e que sua produção aumenta com o desenvolvimento floral até a antese: a fluorescência dos indicadores, prevenida pelo seqüestrador de NO, ficou restrita às papilas estigmáticas em gineceus imaturos e a grãos de pólen produzidos pela antera no estame. Plantas mutantes de *A. thaliana nia1 nia2* apresentaram o mesmo padrão de emissão de NO nos órgãos florais que o tipo selvagem. Sépalas e pétalas não apresentaram produção significativa de NO em ambos os genótipos analisados. A validação dos resultados obtidos por microscopia foi feita através da incubação de tecidos

florais intactos com DAF-2, quantificando-se, por espectrofluorimetria, o composto DAF-2T resultante da reação do indicador com o NO emitido pelos tecidos. Os dados obtidos por espectrofluorimetria mostraram que a intensidade de fluorescência emitida por botões florais foi maior durante o estágio 11 de desenvolvimento, corroborando os dados obtidos de localização por microscopia de fluorescência. Ainda, foi possível quantificar que as plantas do tipo selvagem apresentam, em média, maior intensidade de fluorescência emitida, que plantas *nia1 nia2*: 1,39 e 1,89 vezes maior nas fases 11 e 13 de desenvolvimento, respectivamente. Um segundo objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da enzima NR na indução floral. Os dados obtidos revelam que plantas *nia1 nia2* possuem floração precoce, 6 dias em média, quando comparadas com plantas do tipo selvagem. Para verificar se a floração precoce no mutante *nia1 nia2* era consequência apenas da deficiência do radical NO, ou também da deficiência de aminoácidos, foram analisados os parâmetros de indução floral em plantas *nia1 nia2* tratadas com os aminoácidos arginina ou glutamina, para a recuperação dos níveis basais de aminoácidos. A floração neste mutante permaneceu precoce, sugerindo que o fenótipo de floração precoce é consequência da deficiência de NO nestas plantas durante a fase vegetativa. Estes resultados sugerem que o NO pode ter um importante papel no processo de floração e no sucesso da reprodução vegetal.

ABSTRACT

The radical nitric oxide (NO), that can be produced in the organism by arginine oxidation or nitrite reduction, is an important signaling molecule in plants acting as modulator of several metabolic and developmental processes. Recently NO was identified as one of several signals involved in flowering. The transition from vegetative to reproductive growth is delayed in mutant plants that overproduce NO, while this process is precocious in mutant plants deficient in NO synthesis. The main objective of this study was to identify the sites of NO production during floral development of *Arabidopsis thaliana*. The fluorescent probes, 4,5-daminofluorescein diacetate and 1,2-diaminoanthraquinone, were utilized to localize *in situ*, by fluorescence microscopy, the NO production in floral buds of *A. thaliana* at different stages of development. Still, NO production by the floral structures was compared between wild-type and double defective mutant plants for structural genes of nitrate reductase enzyme - NR - (*nia1 nia2*) which have reduced content of amino acids and nitrite and, consequently, of NO in their leaves. It was also analyzed the effect of the NO scavenger, CPTIO, in preventing the fluorescence emission. The results showed that NO is synthesized in specific cells and tissues in the floral structure and its production increases with the floral development until anthesis: the fluorescence of the indicators, prevented by NO scavenger, was restricted to the stigmatic papillae, in the gynoecium, and to pollen grains produced by anther in stamen. Mutant plants of *A. thaliana nia1 nia2* showed the same pattern of NO emission by the floral organs to that observed in the wild type genotype. Sepals and petals showed no significant NO production in both genotypes analyzed. Validation of the results obtained by fluorescence microscopy was realized by incubating floral tissues with DAF-2 and quantifying, by spectrofluorimetry, the DAF-2T resulted from reaction between the probe and the NO emitted by the tissues. Data obtained by spectrofluorimetry showed that the fluorescence intensity emitted by floral

buds was higher during stage 11 of development, corroborating localization data obtained by fluorescence microscopy. Additionally, wild type plants showed greater intensity of fluorescence emission, on average, than *nia1 nia2* plants: 1,39 and 1,89 times higher in phases 11 and 13 of development, respectively. A second objective of this work was to evaluate the role of the NR enzyme in floral induction. Data obtained revealed that *nia1 nia2* plants flowers earlier, 6 days on average, than the wild-type plants. To verify whether the early flowering phenotype in *nia1 nia2* was only consequence of the NO deficiency, or was also due to the amino acids deficiency, it were analyzed the parameters of floral induction in *nia1 nia2* plants treated with the amino acids arginine or glutamine for the recovery of the amino acids levels. Flowering in this mutant remained precocious, suggesting that the early flowering phenotype is a consequence of NO deficiency in these plants during the vegetative growth. These results suggest that NO may have an important role in the flowering process and to the reproductive success of the plant.

1. INTRODUÇÃO

O radical óxido nítrico (NO) é uma molécula biologicamente ativa, que regula uma diversidade de processos biológicos em diferentes espécies (Beligni e Lamattina, 2001). É uma molécula gasosa cuja meia vida é relativamente curta, inferior a 6 s (Bethke *et al.* 2004), refletindo a natureza altamente reativa do NO – sendo esta devido à estrutura molecular do radical, que possui um elétron desemparelhado.

O NO reage rapidamente com espécies reativas de oxigênio (ROS), proteínas (principalmente aquelas que contêm aminoácidos reativos como cisteína e tirosina), assim como diversos receptores e fatores de transcrição (Romero-Puertas *et al.* 2004). A citotoxicidade deste radical está relacionada ao fato desta molécula ser lipofílica, volátil e possuir um elétron desemparelhado. Em plantas, a sinalização do NO envolve GMP cíclico, ADP ribose, Ca^{2+} , ácido salicílico e proteínas quinases. Há, ainda, uma justaposição com a sinalização do H_2O_2 (Crawford e Guo, 2005).

O radical NO atua como uma molécula mensageira em animais e está envolvido em diferentes processos biológicos como vasolidatação, neurotransmissão, defesa antimicrobiana e regulação de processos imune-inflamatórios, entre outros (Stefano *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, o NO tem se destacado como importante molécula sinalizadora para os vegetais, atuando em diversos processos de crescimento e desenvolvimento, bem como nas respostas de defesa a estresses bióticos ou abióticos (Lamattina *et al.*, 2003; Wendehenne *et al.*, 2004; Lamotte, 2005; Salgado *et al.*, 2004; Neill *et al.*, 2005, 2007). O NO atua no controle do crescimento de raízes (Gouvêa *et al.*, 1997; Stöhr *et al.*, 2001; Pagnussat *et al.*, 2002; 2004), na germinação de sementes (Keeley e Fotheringham, 1997), na extensão foliar (Leshem e Haramaty, 1996), na fotomorfogênese (Pagnussat *et al.*, 2003), na lignificação da parede celular (Ferrer e Ros-Barceló, 1999), na diferenciação de células do xilema (Gabaldon *et al.*, 2005) e na senescência de folhas e maturação dos frutos (Leshem e Haramaty, 1996). Atua, inclusive, como modulador da resistência a doenças, promovendo a morte celular hipersensitiva e ativa a

expressão de diversos genes de defesa e a produção de compostos com atividade antimicrobiana (Delledonne *et al.*, 1998; Modolo *et al.*, 2002; Romero-Puertas *et al.*, 2004; revisto por Wendehenne *et al.*, 2004). É ainda considerado um regulador do movimento estomático (Garcia-Mata e Lamattina, 2002; Desikan *et al.*, 2004), tendo influência também na via de sinalização das citocininas (Scherer e Holk, 2000; Scherer, 2005), no aumento da disponibilidade de ferro para a célula (Murgia *et al.*, 2002), na funcionalidade de mitocôndrias (Saviani *et al.*, 2002) e na sinalização durante injúria (Pedroso *et al.*, 2000), entre outros efeitos.

Exemplificando mais detalhadamente algumas funções do óxido nítrico, é conhecido que este desempenha um papel central na determinação da morfologia e no padrão de desenvolvimento de raízes (Lombardo *et al.*, 2006). As primeiras evidências acerca da participação do NO no desenvolvimento de raízes induzido por auxina foram providas por Gouvêa e colaboradores (1997). O acúmulo de NO em resposta ao tratamento com auxina foi mostrado por Pagnussat e colaboradores (2002) em enxertos de pepino durante a formação de raízes adventícias.

Ainda, foi demonstrado que a aplicação de auxina em raízes resultou na produção localizada de NO durante a formação de raízes laterais, assim como o acúmulo assimétrico de NO no ápice da raiz durante a resposta gravitrópica (Correa-Aragunde *et al.* 2004; Lombardo *et al.* 2006; Hu *et al.* 2005). A formação de raízes laterais, adventícias e convencionais, bem como a resposta gravitrópica da raiz foi prevenida pela aplicação do seqüestrador de NO CPTIO, sugerindo uma importante função do NO endógeno mediando estes processos.

O NO também atua na regulação do movimento estomático, induzindo o fechamento dos estômatos, reduzindo a taxa de transpiração e aumentando as respostas adaptativas ao estresse hídrico. Garcia-Mata e Lamattina (2002) mostraram que a aplicação exógena de NO induz o fechamento estomático de maneira Ca^{2+} -dependente, em espécies mono e dicotiledôneas.

Há, portanto, crescentes evidências de que o NO desempenha funções importantes em diversos processos (pato)fisiológicos em plantas. As enzimas que catalisam a síntese deste radical e as cascatas de sinalização que mediam os efeitos do NO são objetos de estudo e descoberta recentes, levando a um melhor entendimento de como este radical atua influenciando na resposta vegetal a vários estímulos (Wendehenne *et al.*, 2004).

1.1 – Origem biossintética do NO

Embora a origem biossintética do NO nos vegetais seja ainda controversa, várias fontes enzimáticas possíveis para a produção deste radical têm sido propostas (Corpas *et al.*, 2004), além de mecanismos não enzimáticos (Bethke *et al.*, 2004). Diversas fontes de NO em plantas podem ser distinguidas, cujas funções fisiológicas dependem da espécie, tipo de tecido ou célula, condições externas e ativação de vias de sinalização (Neill *et al.*, 2003). A síntese de NO em plantas inclui tanto vias dependentes de arginina quanto de nitrito (revisto por Arasimowicz *et al.*, 2007).

As fontes de NO mediadas por nitrito incluem nitrato redutase (NR), pH ácido do apoplasto (Bethke *et al.*, 2004), Ni-NO redutase (NiNOR) (Sthör *et al.*, 2001), possivelmente uma hemoglobina de classe-2 (Crawford e Guo, 2005) e mitocôndria (Tischner *et al.*, 2004; Planchet *et al.*, 2005, Modolo *et al.* 2005). É bem conhecido que a enzima NR é capaz de produzir NO e NO₂ a partir de nitrito, resultando na emissão de NO (Dean e Harper, 1986; Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel *et al.*, 2002). Dados recentes do nosso grupo de pesquisa, obtidos a partir de experimentos realizados com a técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR) e marcação isotópica do NO₂⁻ com ¹⁵N, puderam demonstrar inequivocamente que extratos foliares de plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes na enzima nitrato redutase

(*nia1 nia2*) apresentam a mesma capacidade de produzir ^{15}NO que plantas do tipo selvagem, quando $^{15}\text{NO}_2^-$ é exogenamente fornecido (Modolo *et al.*, 2005). Além disto, extratos foliares apresentaram substancial produção endógena de NO em plantas do tipo selvagem, contrastando com a quase ausência de produção endógena de NO nas plantas NR-deficientes. Estes resultados indicaram que, embora a enzima NR não seja essencial para a síntese de NO a partir de NO_2^- , ela é importante para originar o substrato desta atividade redutora (o nitrito). Nossos resultados mostraram ainda que folhas do mutante de *A. thaliana*, *nia1 nia2*, apresentaram conteúdo reduzido de aminoácidos livres, em especial de arginina - aproximadamente 10 vezes menor que em folhas do genótipo selvagem (Modolo *et al.*, 2006). Deste modo, plantas NR-deficientes apresentam níveis endógenos de NO reduzidos, pois possuem deficiência nos substratos (nitrito e arginina) para a síntese deste radical (Modolo *et al.*, 2006).

Além do nitrito, a produção de NO pode ser mediada por atividade do tipo óxido nítrico sintase (NOS), tendo como substrato o aminoácido arginina. Em animais, a enzima NOS é responsável pela geração de NO e catalisa a oxidação de cinco elétrons de um dos átomos de L-arginina (N^3- para N^{2+}), com participação de O_2 e cofatores (NADPH, FAD, FMN e tetrahydro-L-biopterina), resultando na formação de L-citrulina e NO (Stuehr, 1997). A NOS de mamíferos ocorre tanto na forma constitutiva (neuronal, nNOS e endotelial, eNOS) como na forma induzida, iNOS (Wang e Marsden, 1995). As primeiras evidências da presença de enzima do tipo NOS de mamíferos em plantas foram mostradas em 1996 (Leshem e Hamaraty, 1996; Ninnemann e Maier, 1996; Cueto *et al.*, 1996). Por exemplo, atividade NOS foi encontrada em raízes e nódulos de leguminosas, induzida por lipopolissacarídeos de *Rhizobium* (Cueto *et al.*, 1996). Ainda, análises de imunolocalização com anticorpos feitos contra NOS de cérebro de coelho ou NOS de macrófagos de rato mostraram reatividade com extratos de tabaco e milho, que possuíam altos níveis de NOS (Huang e Knopp, 1998; Ribeiro *et al.*, 1999). Em plantas, atividade NOS dependente de arginina tem sido detectada através da inibição da produção de

NO por inibidores de NOS de mamíferos (Ribeiro *et al.*, 1999; del Rio *et al.*, 2004). Embora vários resultados bioquímicos e imunológicos indiquem a existência de uma enzima do tipo NOS em plantas, nenhum gene ou proteína com sequência similar a NOS de mamíferos foram encontrados em *Arabidopsis thaliana*, considerada planta modelo por ter seu genoma seqüenciado (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Estes resultados sugerem que a atividade NOS em plantas provém de um tipo enzimático distinto.

Guo e colaboradores (2003) isolaram um gene do genoma de *Arabidopsis*, *AtNOS1*, que codifica proteína com atividade do tipo NOS, o qual está envolvido no processo de sinalização hormonal e crescimento, atuando também no controle da floração (He *et al.*, 2004) e na resposta de defesa induzida por lipopolissacarídeos (Zeidler *et al.*, 2004). Entretanto, análises da sequência do DNA da proteína AtNOS1 não apresentaram similaridade com isoformas de NOS de origem animal. Estudos recentes apresentam críticas a respeito da natureza de AtNOS1 (Zemojtel *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2006).

Zemojtel e colaboradores (2006) clonaram AtNOS1 (Q66GP9) e seus ortólogos de arroz (Q6YPG5) e milho (AY110367), e após purificação de proteínas recombinantes não detectaram atividade NOS com os reagentes [³H]-arginina ou pelo método de Griess, baseados em ensaios para NOS propostos por Guo e colaboradores (2003). Assim, os resultados de Zemojtel e colaboradores (2006) colocaram em questionamento a função de AtNOS1, permanecendo então elusiva a existência de uma proteína com atividade NOS em plantas. Diante desta descoberta, Crawford e colaboradores (2006) propuseram então que o gene *AtNOS1* fosse renomeado para *AtNOA1* – óxido nítrico associado 1, já que a natureza de AtNOA1 permanece elusiva e controversa (Zemojtel *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2006; Guo, 2006).

1.2 - NO e o Processo de Floração

O tempo necessário para que a transição floral ocorra tem consequências significativas para o sucesso reprodutivo dos vegetais (Henderson e Dean, 2004). A floração é a principal fase de transição no desenvolvimento do ciclo reprodutivo da planta (Simpson e Dean, 2002). Inicialmente, as plantas transitam por um período de desenvolvimento vegetativo, caracterizado pela produção de folhas pelo meristema apical (Poethig, 1990). Em fase mais avançada do desenvolvimento vegetal, este meristema passa a produzir flores, caracterizando o desenvolvimento reprodutivo da planta (Henderson e Dean, 2004). De acordo com Poethig (1990), a transição do estado vegetativo para o desenvolvimento reprodutivo é abrupta e envolve mudanças nas características do meristema, principalmente em plantas que florescem. Tanto em espécies arbustivas como herbáceas, o formato foliar é um dos sinais mais conspícuos da fase vegetativa do meristema (Poethig, 1990). Brotos jovens são usualmente caracterizados por folhas menores e mais simples em estrutura do que quando adultos, embora o contrário possa ocorrer (Poethig, 1990). Durante o desenvolvimento reprodutivo, mudanças na fase vegetativa do meristema parecem ser induzidas por fatores difusíveis que atingem o meristema apical.

Sinais exógenos e endógenos, como fotoperíodo, vernalização, giberelinas e relógio circadiano controlam o tempo de transição floral (Battey, 2000, Izawa *et al.*, 2000, Mouradov *et al.*, 2002; Simpson e Dean, 2002). Recentemente, o NO foi identificado como um fator de sinalização adicional que controlaria o processo de floração. He e colaboradores (2004), ao investigarem o efeito do NO no crescimento vegetativo, descobriram que a aplicação do doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP) resultava no atraso da floração. Estudos com mutante de *Arabidopsis* que superproduz o radical óxido nítrico mostraram que nestas plantas a floração ocorre tardiamente em relação a plantas do tipo selvagem. Ainda, mutantes apresentando

níveis endógenos de NO reduzidos florescem precocemente quando comparados ao genótipo selvagem (He *et al.*, 2004).

He e colaboradores (2004) mostraram que tratamento com o doador de NO nitroprussiato de sódio (SNP) resultou no atraso da floração de modo dose-dependente, que foi avaliado pelo aumento do número de folhas em roseta e do número de dias para o aparecimento do primeiro botão floral. Um indicador padrão do tempo de floração é o número de folhas em roseta produzido pelo meristema primário antes do aparecimento do primeiro botão floral; plantas que florescem tardiamente produzem mais folhas (Koornneef *et al.*, 1991). Ou seja, um aumento do número de folhas está diretamente relacionado com o atraso da transição floral.

Durante o processo de floração, a interação entre o pólen e o estigma consiste em um dos mais importantes estágios no ciclo de vida de plantas que florescem, já que este fato determina se a fertilização ocorrerá e, conseqüentemente, se as sementes serão formadas e posteriormente liberadas (McInnis *et al.*, 2006). Para que a fertilização seja bem sucedida é necessário que o grão de pólen possua compatibilidade molecular com o estigma, para que subsequentemente ocorra a formação do tubo polínico (McInnis *et al.*, 2006). Prado e colaboradores (2004) mostraram que o radical óxido nítrico está envolvido em guiar o tubo polínico, atuando como um regulador negativo do crescimento do tubo, capaz de induzir a reorientação do seu ápice.

Tendo em vista que a superfície do estigma é receptiva ao pólen por um curto período, o tempo para que a polinização ocorra, é, portanto, crítico (McInnis *et al.*, 2006). Sabe-se que os estigmas receptivos são caracterizados por possuir níveis elevados de atividade peroxidase (Dupuis e Dumas, 1990; McInnis *et al.*, 2006), embora ainda seja desconhecida a função destas enzimas no estigma (McInnis *et al.*, 2006).

Recentemente foi identificada e caracterizada uma peroxidase específica do estigma (SSP), de *Senecio squalidus* (McInnis *et al.*, 2005). Foi mostrado também que estigmas de

Senecio acumulam níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente H_2O_2 em suas células epidérmicas, que constituem as papilas estigmáticas, onde a SSP está localizada (McInnis *et al.*, 2006). A presença de altos níveis de ROS/ H_2O_2 na papila – local em que o pólen é recebido e discriminado – sugere que ROS/ H_2O_2 , e pela potencial associação à SSP, sejam importantes na funcionalidade do estigma (McInnis *et al.*, 2006). São atribuídas diversas funções para ROS/ H_2O_2 , relacionadas ao metabolismo celular, atuando também na sinalização de moléculas, mediando diferentes processos celulares desde o desenvolvimento até a defesa, sendo frequentemente associados ao NO (Hancock *et al.*, 2006). Sendo assim, justifica-se a especulação de que ROS/ H_2O_2 podem estar envolvidos na interação pólen - estigma. Ainda, McInnis e colaboradores (2006) investigaram a produção de NO em estigmas e em grãos de pólen aderidos à superfície estigmática de *Senecio squalidus* e *Arabidopsis thaliana*, utilizando o indicador fluorescente DAF-2 DA. É importante ressaltar que neste trabalho os autores analisaram apenas o estágio mais avançado da estrutura floral de *Arabidopsis thaliana*, não avaliaram, portanto, a produção de NO durante o desenvolvimento do botão floral de *Arabidopsis*, mas sim, somente quando a flor já estava aberta. Enquanto que os estigmas apresentaram emissão de fluorescência reduzida, refletindo a presença de baixo conteúdo de NO, nos grãos de pólen de ambas as espécies estudadas a emissão de fluorescência foi bastante intensa. De modo interessante, a produção de NO detectada pelo indicador fluorescente foi maior em tubos polínicos de ambas as espécies quando comparados com pólen não germinado ou em grãos de pólen que ainda não produziram tubos polínicos, mas que estavam aderidos à superfície estigmática. Deve existir, portanto, uma função para ROS/ H_2O_2 , peroxidases e o NO na interação do pólen – estigma (McInnis *et al.*, 2006).

1.3 - Detecção de NO por indicadores fluorescentes

A maior parte do entendimento da síntese e sinalização do NO é embasada em estudos que utilizam doadores, indicadores ou seqüestradores deste radical. Estudos celulares com o indicador fluorescente de NO 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA) mostraram que o tratamento de células guarda com ácido abscísico (ABA) induziu um aumento dos níveis de NO (Desikan *et al.*, 2002; Garcia-Mata e Lamattina, 2002; Neill *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003). Quando estas células foram tratadas com (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido) (CPTIO), seqüestrador de NO, o fechamento estomático induzido por ABA foi inibido, enquanto que tratamentos com doadores de NO induziram o fechamento dos estômatos. Ainda, tratamento com auxina elevou a concentração de NO em hipocótilos e aplicação de doadores de NO induziu a formação de raízes laterais e adventícias em *Cucumis sativus* (Pagnussat *et al.*, 2002) e em tomate (Correa-Aragunde *et al.*, 2004), enquanto que o CPTIO inibiu respostas induzidas por auxina em raízes em *Cucumis sativus* (Pagnussat *et al.*, 2002) e em tomate (Correa-Aragunde *et al.*, 2004). De modo semelhante, a aplicação de doadores de NO em segmentos de raízes de milho induziu seu alongamento, que foi prevenido pelo seqüestrador de NO azul de metileno (Gouvêa *et al.*, 1997). Corpas e colaboradores (2004) analisaram a produção de NO em folhas, caule e raízes de mudas de ervilha durante o desenvolvimento vegetal. A síntese de NO foi avaliada por microscopia confocal de fluorescência, utilizando os indicadores DAF-2 DA ou DAF-FM DA. Os resultados mostraram que o máximo de emissão de NO detectado coincide com os estágios de máximo desenvolvimento da planta, sugerindo um papel importante deste radical nos tecidos analisados.

Um dos maiores obstáculos na pesquisa do radical óxido nítrico é a exata localização e quantificação de sua formação em extratos ou tecidos de plantas (Sthör e Stremlau, 2006). As diaminofluoresceínas (DAFs) são indicadores que foram desenvolvidos para a detecção do NO

in vivo ou *in situ*, utilizando microscopia de fluorescência (Yao *et al.*, 2004), sendo amplamente utilizadas como indicadores de NO (Kojima *et al.*, 1998).

A transformação química do composto 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) está baseada na reatividade de diaminas vicinais aromáticas com o NO, em presença de O₂. A N-nitrosilação de DAFs resulta na formação de um triazol, DAF-2T, que emite fluorescência esverdeada (Kojima *et al.*, 1998) (Figura 1). DAFs não reagem diretamente com o NO, mas sim com suas formas oxidadas (revisto por Gomes *et al.*, 2006) e tem sido proposto que os mecanismos de reação desta classe de indicadores com NO envolva o N₂O₃, composto resultante da oxidação do NO (Fernandes *et al.*, 2004). Entre as DAFs mais utilizadas como indicadores de NO, tem destaque o composto permeável à membrana plasmática DAF-2 diacetato (DAF-2 DA), que ao entrar na célula é hidrolisado por estearases para formar DAF-2, sensível ao NO (Kojima *et al.*, 1998). O limite de detecção de DAF-2 DA para o NO é de, aproximadamente, 5 nM (Kojima *et al.*, 1998). Como o DAF-2 DA é capaz de entrar na célula, este indicador não pode ser utilizado para monitorar o conteúdo de NO extracelular. De modo geral, DAFs possuem propriedades favoráveis para visualização da produção de NO por amostras biológicas (Nagano, 1999); já que a excitação desta classe de indicadores está no comprimento de luz visível (causando menos danos às células), e não está sujeita a autofluorescência de amostras biológicas (Nagano, 1999). Contudo, existem alguns problemas metodológicos no uso de DAFs para aplicações biológicas. A sensibilidade ao pH deste indicador pode limitar seu uso (Halbach, 2003). Além disso, recentemente a especificidade do indicador DAF-2 ao NO foi questionada, uma vez que este indicador é capaz de reagir com ácido ascórbico (AA) ou ácido dehidroascórbico (DHA), resultando na geração de um composto que tem padrão de emissão de fluorescência semelhante ao DAF-2T, ou pode ainda reagir com espécies geradas como produtos secundários ao metabolismo do NO (Zhang *et al.*, 2002).

Tendo em vista as limitações das diaminofluoresceínas como indicadores de NO, outros marcadores têm sido desenvolvidos, como a 1,2-diaminoantraquinona (1,2-DAA) (Halbach,

2003). 1,2- DAA é um indicador de NO de alta sensibilidade, especificidade e acurácia (Halbach, 2003). Isolado, o 1,2- DAA é violeta escuro e não fluorescente. A reação deste indicador com NO resulta na formação de um composto insolúvel em água e que emite fluorescência avermelhada, denominado 1-H-antra-[1,2d]-[1,2,3]-triazol-6,11-diona (ATD). A especificidade de 1,2 - DAA ao NO parece ser maior quando comparado a DAFs. Beligni e colaboradores (2002) mostraram que células de cevada quando marcadas com os indicadores 1,2- DAA e DAF- 2DA apresentaram intensa emissão de fluorescência, que poderia ser atribuída à produção de NO por estas células. Entretanto, quando as mesmas estruturas foram submetidas ao tratamento controle, com os indicadores 1-aminoantraquinona (1- AQ) e 4-aminofluoresceína diacetato (4-AF DA), a emissão de fluorescência foi reduzida somente com 1- AQ, sugerindo que o DAF- 2DA não é tão eficiente para monitorar a produção de NO nas células de cevada. Os indicadores utilizados como controle negativo, 1- AQ e 4-AF DA, não possuem um dos grupamentos amino que se combina com o sítio ativo do NO, mas que estão presentes em 1,2-DAA e DAF-2 DA, respectivamente.

Os efeitos das reações cruzadas das diaminofluoresceínas com outros compostos que não o NO podem ser evitados por metodologia desenvolvida por Ye e colaboradores (2004), em que as amostras são incubadas diretamente com DAF-2. Neste caso, como o NO, diferentemente dos outros compostos, é uma molécula gasosa, pode então difundir dos tecidos e reagir diretamente com DAF-2, eliminando a interferência na detecção da produção do radical NO.

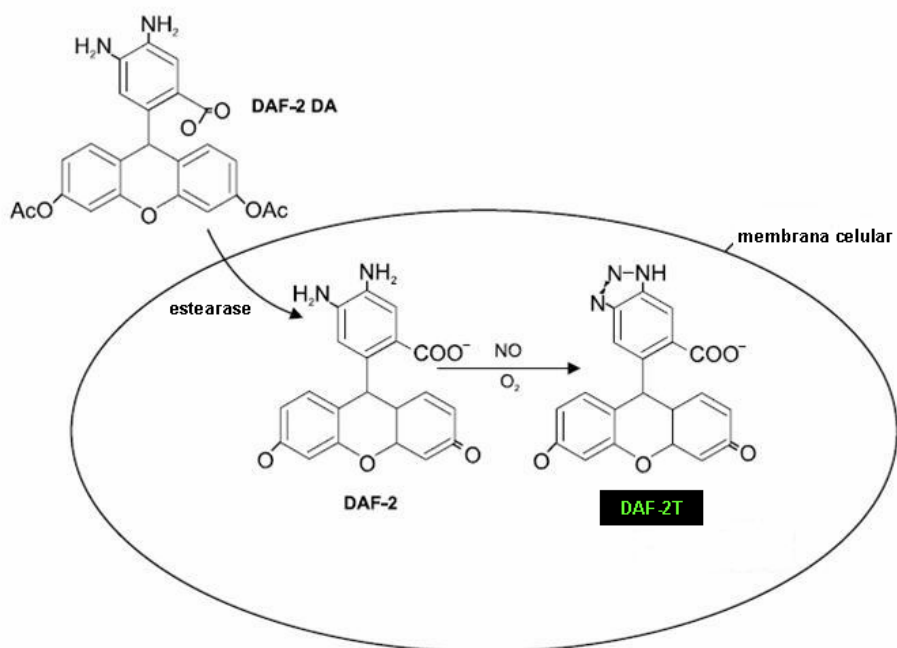


Figura 1 – Representação esquemática das reações envolvendo o indicador DAF-2DA para a detecção de NO *in vivo* por microscopia de fluorescência. DAF- 2DA é permeável através da membrana celular e é hidrolisado por estearases intracelulares a DAF- 2. DAF- 2 reage com NO para formar o composto fluorescente diaminotriazolfluoresceína (DAF- 2T). Esquema adaptado de Kojima *et al.*, 1998. **Ac**, acetil.

1.4 - Estrutura e desenvolvimento floral de *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana é uma roseta anual, com fases distintas de crescimento vegetativo e reprodutivo (Figura 2A). O meristema apical, que produz folhas na fase vegetativa, formando uma estrutura típica denominada roseta, passa a produzir flores no período reprodutivo (Bowman e Smyth, 1994). As folhas em roseta, produzidas pelo meristema juvenil durante a fase vegetativa, são pequenas e possuem a forma arredondada, enquanto que, no decorrer do desenvolvimento o meristema passa a produzir folhas mais compridas e de formato espatulado. As últimas folhas produzidas antes da transição para a floração são as folhas caulinares, pequenas e lanceoladas, ao contrário das folhas em roseta que se assemelham a um pecíolo (Bowman e Smyth, 1994).

A flor madura de *Arabidopsis* possui uma estrutura simples, típica da família das Brassicaceae. A flor contém um cálice com quatro sépalas e corola com quatro pétalas, cujas posições são alternadas e interiores às das sépalas (Figuras 2B e C). O androceu consiste de quatro estames medianos ou longos e dois laterais, curtos. As anteras possuem deiscência longitudinal e a liberação do pólen pode resultar na autofertilização da flor. O gineceu é súpero, sésil e ocupa o centro da flor. É formado da fusão de dois carpelos, cujos lóculos são separados por um falso septo, do qual óvulos emergem com placentação do tipo parietal (Bowman e Smyth, 1994).

O desenvolvimento das estruturas florais em *A. thaliana* foi classificado em 20 estágios definidos por eventos específicos (Smyth *et al*, 1990). Os estágios de 1 a 6 progridem desde o início da formação do botão floral no meristema apical até o aparecimento de sépalas, pétalas e estames, sendo que estes se tornam maiores rapidamente enquanto que as pétalas crescem de forma lenta. É ainda no estágio 6 que o gineceu começa a se desenvolver. O estame começa a se tornar mais longo no estágio 7, e as anteras desenvolvem lóculos no estágio subsequente.

No estágio 8, o botão floral apresenta aumento no tamanho do estame, principalmente em relação às pétalas (Figura 3A). A antera e o filamento dos estames já se encontram diferenciados, sendo que a antera corresponde à maior parte do peso do órgão neste estágio. Durante o estágio 9, as células precursoras de micrósporos (células mães de grão-de-pólen) se separam umas das outras na antera e ocorre a meiose (microsporogênese) para a formação das tétrades. No estágio 10, nas anteras, os micrósporos maduros se separam e ficam livres no interior do saco polínico. Na fase seguinte, 11, as papilas estigmáticas aparecem no topo do gineceu (Figura 3B). O estilete começa a se tornar morfológicamente distinto do ovário, e no interior deste ocorre a megasporogênese. No interior das anteras, as células do tapete (tapetum) e o tecido microesporogínico degeneram. As pétalas crescem rapidamente e atingem a altura dos estames médios (ou longos) no estágio 12, que é o último estágio antes da abertura do botão floral (Figura 3C). Nas anteras, o tecido microesporogínico desenvolve numerosas paredes fibrosas, e posteriormente, à degeneração do tapete, a epiderme do saco polínico mostra sinais de murchamento. Durante o estágio 12, os integumentos do óvulo em desenvolvimento crescem e quase cobrem o nucelo, a megagametogênese ocorre, e os óvulos começam a apresentar orientação anátropa. A parte superior do gineceu torna-se diferenciada, levemente constrita na base. Um tênue limite separa o topo do estilete das papilas estigmáticas, que no decorrer do desenvolvimento floral tornam-se mais compridas. Neste estágio o estigma já está receptivo ao grão de pólen. Esta fase termina quando o botão floral abre (estágio 13), tornando as pétalas visíveis e a antese ocorre. Neste estágio, o botão passa para a fase considerada flor. As fases de 14 a 20 caracterizam-se pelo desenvolvimento da siliqua (fruto) e senescência das demais estruturas reprodutivas, terminando com a liberação das sementes no estágio 20.

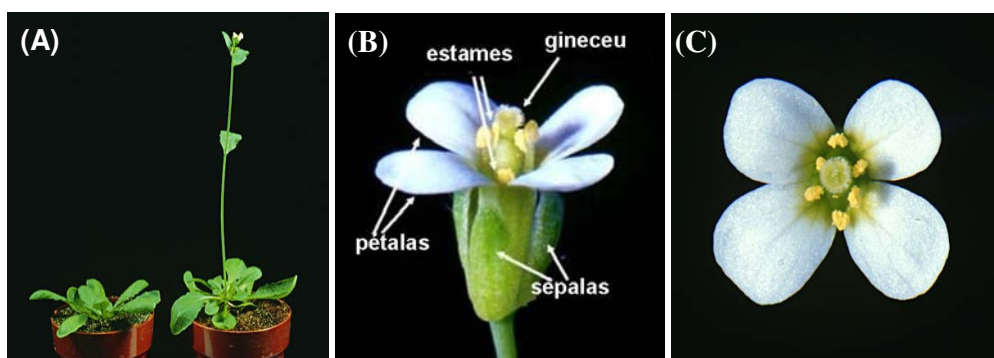


Figura 2 – *Arabidopsis thaliana* nas fases vegetativa (esquerda) e reprodutiva (direita) (A) e flor de *A.thaliana* do tipo selvagem (B) e (C).

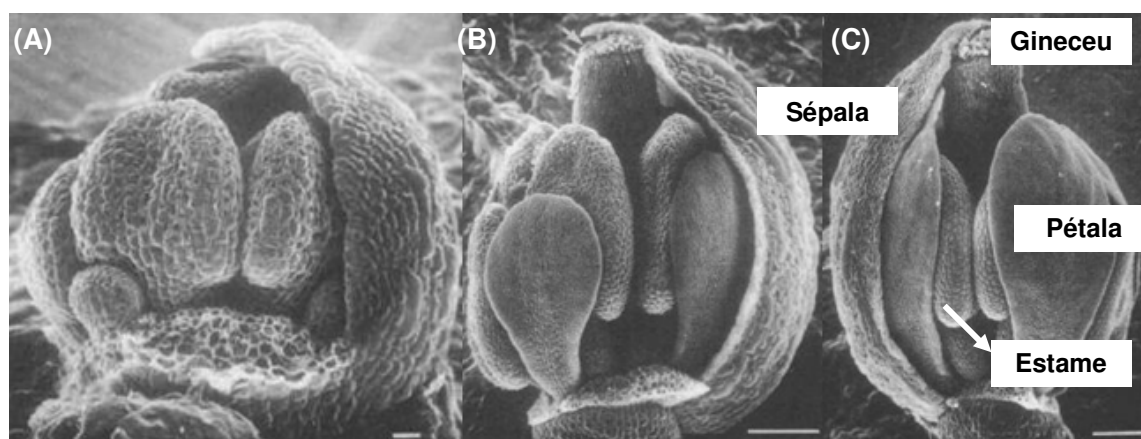


Figura 3 – Imagens de microscopia eletrônica de varredura de botões florais de *Arabidopsis thaliana*, em diferentes estágios de desenvolvimento. Os estágios 8, 11 e 12 de desenvolvimento floral estão representados em A, B e C, respectivamente. Barra = 10 μ m em A, e 100 μ m em B e C.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se determinar a importância do óxido nítrico no desenvolvimento e na indução floral, procurando avaliar os locais de produção deste radical nas diferentes estruturas florais da planta modelo *Arabidopsis thaliana* e como a mutação para a NR afeta esta produção e a indução da floração nestas plantas. Para atingir tais objetivos, as seguintes metas foram propostas:

1. Localizar a produção de NO nos diferentes órgãos florais durante o desenvolvimento reprodutivo de *Arabidopsis thaliana*, utilizando os indicadores fluorescentes para NO, DAF-2 DA e 1,2- DAA;
2. Comparar o padrão de produção de NO durante o desenvolvimento floral entre o genótipo selvagem (WT) e o mutante *nia1 nia2*, que possui nível endógeno de NO diminuído nas folhas;
3. Validar os resultados de microscopia de fluorescência quantificando, por espectrofluorimetria, a emissão de NO por botões florais, detectada com a forma livre da diaminofluoresceína;
4. Avaliar como a deficiência na produção de NO durante a fase vegetativa de crescimento da planta afeta a transição floral, comparando os parâmetros de indução floral de plantas selvagens com aqueles do mutante *nia1 nia2*;
5. Analisar os parâmetros de indução floral em plantas selvagens e no mutante *nia1 nia2* tratado com glutamina ou arginina, na tentativa de se recuperar os níveis de aminoácidos da planta selvagem.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Material vegetal: *A. thaliana*

Os ensaios foram realizados com plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia-0 e plantas da mesma linhagem, mutantes para os genes estruturais *NIA1* *NIA2* para a enzima nitrato redutase (NR), que as tornam deficientes na assimilação de nitrogênio (Wilkinson e Crawford, 1993). As sementes foram esterilizadas com hipoclorito de sódio a 0,3%, e as plantas cultivadas em vasos com vermiculita/perlita (1:1). Plantas do tipo selvagem foram irrigadas com meio líquido de Murashige e Skoog (1962), à metade da concentração, e sem adição de glicose e glicina. Para o cultivo das plantas mutantes foi utilizado o meio descrito por Wilkinson e Crawford (1991), que contém quantidade de nitrato reduzida e amônia como fonte de nitrogênio. As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento sob umidade de 100%, 24 ° C e fotoperíodo de 12 horas. Para os experimentos foram utilizados botões florais em diferentes estágios de desenvolvimento, conforme descrito por Smyth e colaboradores (1990).

3.2 - Visualização do NO *in situ*

Amostras de botões florais de *A. thaliana* foram tratadas com 10 µM de 4,5-diacetato de diaminofluoresceína (DAF-2 DA; Calbiochem-Novabiochem., San Diego, CA), para a visualização do NO, conforme descrito por Pedroso e colaboradores (2000). As amostras permaneceram incubadas por 30 minutos a 25°C, sob agitação no escuro. Alternativamente, amostras de botões florais foram incubadas com 50µM do marcador 1,2-diaminoantraquinona (1,2-DAA; Calbiochem-Novabiochem.), preparado em dimetil-sulfóxido (DMSO) 100%, por 30 minutos a 25°C, sob agitação no escuro. Os controles negativos foram feitos incubando-se os diferentes órgãos florais em água, por 30 minutos a 25°C, sob agitação no escuro, ou com o

seqüestrador de NO, CPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-oxido) (Calbiochem).

Após os tratamentos, as amostras foram montadas em lâminas com vectashield contendo 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). O vectashield tem a propriedade de retardar a perda da fluorescência dos corantes marcadores (*antifading*) quando expostos à luz; e o DAPI presente no vectashield, atua como contra corante, colorindo (destacando) a cromatina.

As amostras foram visualizadas utilizando-se um microscópio de fluorescência Olympus BX50, equipado com uma câmara digital tipo CCD (Charge Coupled Device), Olympus Q-Color, com refrigeração. Para análise de amostras ao microscópio de fluorescência foram usados os seguintes cubos de filtros da Olympus: U-MNB2 com comprimento de onda de excitação a 450nm e de emissão a 570 nm para o indicador DAF-2DA (Kojima *et. al.*, 1998); U-N41005 com excitação em 535 - 550 nm e emissão em 645 - 675nm para o indicador 1,2-DAA (Halbach, 2003); e o filtro U-MWU para o DAPI com excitação a 372 nm e emissão a 456 nm (Lakowicz *et. al.*, 1999). As imagens foram adquiridas através de um sistema computadorizado de captura e análise de imagens equipado com o software Image-Pro Plus versão 6 (Media Cybernetics, Inc. Silver Spring, MD, USA) e processadas utilizando-se o software Corel Photo Paint.

3.3 - Quantificação da produção de NO por espectrofluorimetria

Partes florais de *A. thaliana* de ambos os genótipos (selvagem e *nia1 nia2*) foram incubadas por 1h em 200 µL de solução contendo o indicador 4,5-diaminofluoresceína na sua forma livre (DAF-2) ou esterificada (DAF- 2DA), a 75 µM, preparado em tampão fosfato (pH 7,2), à temperatura ambiente, sob abrigo de luz. Após o tratamento, as diferentes partes florais foram retiradas do meio de reação, o volume foi completado para 1500 µL com tampão fosfato (pH 7,2), resultando em uma concentração final do indicador de 10 µM. As amostras foram então centrifugadas por 5 minutos, em centrífuga Eppendorf (modelo 5417R), a 7500 x g e

posteriormente congeladas a -78°C , para leitura do sobrenadante em espectrofluorímetro após 24h. O volume final de cada amostra analisada foi de 1,5 mL. Esta metodologia foi adaptada de Ye e colaboradores (2004).

A emissão de fluorescência (varredura entre 500-600 nm) de cada tratamento foi monitorada sob excitação de 495 nm em espectrofluorímetro (F 4500, Hitachi, Tokyo, Japan). A quantificação da fluorescência obtida foi calculada com o software Microsoft Excel, utilizando os dados referentes à emissão em 515 nm, que é considerado o comprimento de emissão do DAF-2T (Kojima *et al.*, 1998). A concentração de NO emitida pelos botões florais foi estimada através do preparo de uma solução de DEA-NONOato (2-óxido 2-(N,N-detilamino)-diazênolato), preparado em tampão fosfato (pH 7,2) 0,1 M na concentração de 0,5 mM. Neste preparo, o composto foi dissolvido em tampão gelado e previamente deaerado com argônio; após a dissolução o frasco foi vedado com tampa de borracha e mantido à temperatura ambiente por 30 min para produzir uma solução concentrada de NO. Alíquotas desta solução de NO foram adicionadas à solução de DAF-2 preparada em tampão fosfato (pH 7,2) com a finalidade de se construir uma curva padrão para estimar a concentração de NO produzida pelas diferentes partes florais.

3.4 - Análise dos Parâmetros de Indução Floral

Para se avaliar o efeito da mutação da NR na indução floral, ou seja, na transição do estado vegetativo para o estado reprodutivo, foram analisados os seguintes parâmetros (He *et al.*, 2004), tanto em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem quanto para mutantes NR-deficientes, *nia1 nia2* tratadas com glutamina ou arginina, bem como na mutante sem o tratamento de recuperação dos níveis de aminoácidos:

- (a) Número de dias para o aparecimento do primeiro botão floral desde a semeadura;
- (b) Número de dias para a ocorrência da antese (abertura do botão floral);

- (c) Intervalo de dias entre o aparecimento do primeiro botão floral e a antese;
- (d) Número de folhas em roseta e caulinares no dia da antese.

3.5 - Número amostral

As imagens apresentadas nos resultados, referentes às marcações com os indicadores fluorescentes DAF- 2DA ou 1,2- DAA, são representativas de pelo menos 5 ou 3 experimentos independentes, respectivamente.

As análises realizadas em espectrofluorímetro são representativas de três experimentos independentes, sendo que cada experimento foi realizado com, no mínimo, 15 botões florais. Os dados obtidos foram analisados através da média aritmética e cálculo do desvio padrão, com auxílio do software Microsoft Excel.

Os parâmetros de indução floral foram avaliados em três lotes de florações diferentes, sendo que em cada uma delas foram utilizados dados de pelo menos 20 plantas dos genótipos selvagem e *nia1 nia2*. Os dados obtidos foram analisados realizando-se a média aritmética dos parâmetros de indução floral, o cálculo do desvio e do erro padrão dos valores coletados, com auxílio do software Microsoft Excel.

4. RESULTADOS

4.1 - Localização da síntese de NO pelas estruturas florais de *A. thaliana*, detectada com DAF-2DA

Conforme apresentado na Figura 4, apenas gineceus e estames apresentaram elevada produção de NO (Figuras 4A e B, respectivamente), indicada pela emissão de fluorescência esverdeada do composto DAF-2T, resultante da reação do indicador com o radical NO. Sépalas e pétalas não emitiram fluorescência esverdeada (Figuras 4C e D, respectivamente). A emissão

de fluorescência avermelhada pelas sépalas se deve à autofluorescência dos cloroplastos neste comprimento de onda. Controles onde as estruturas florais foram incubadas apenas com água não apresentaram emissão de fluorescência no espectro do DAF- 2T (Figuras 4E-H).

A Figura 4A mostra ainda que nos gineceus a produção de NO ficou restrita à região das papilas estigmáticas. Em estames, a emissão de fluorescência esverdeada ficou limitada às anteras que produziam grãos de pólen (Figura 4B), sugerindo que nesta fase de desenvolvimento estas células germinativas são capazes de sintetizar NO.

As estruturas florais do mutante *nia1 nia2*, quando marcadas com DAF-2DA, apresentaram o mesmo padrão de emissão de fluorescência (resultados não mostrados) que o genótipo selvagem, indicando que a deficiência na NR não alterou os locais de produção de NO nas estruturas florais nesta fase de desenvolvimento. Através das análises por microscopia de fluorescência não foi possível quantificar se a intensidade de produção de NO variou entre os genótipos.

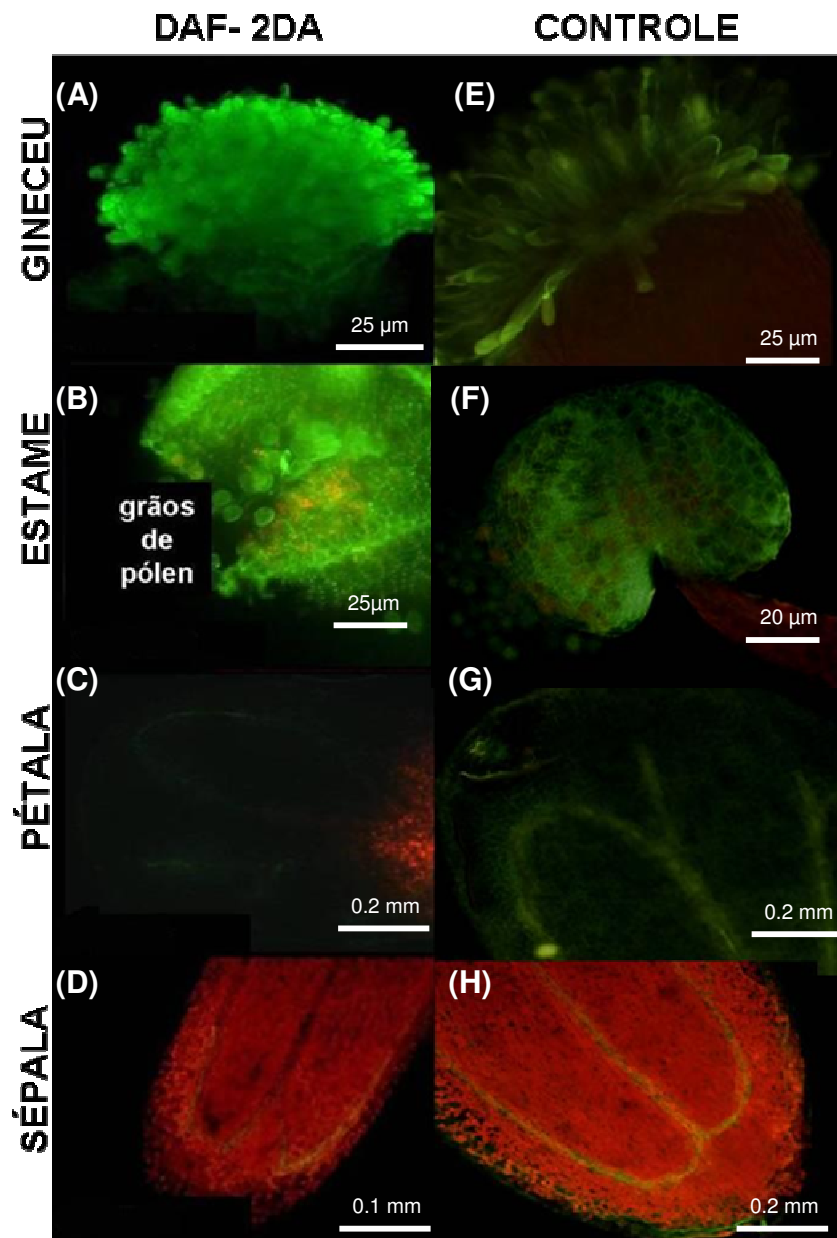


Figura 4 – Produção de NO detectada por DAF-2DA, em botões florais de *A. thaliana* do genótipo selvagem, durante o estágio 12 de desenvolvimento floral. As diferentes partes florais foram tratadas com 10 µM do indicador de NO DAF-2DA, ou apenas com água (controle), conforme indicado. A emissão de fluorescência esverdeada indica produção de NO. A fluorescência emitida em vermelho representa a autofluorescência dos cloroplastos neste comprimento de onda.

4.2 - Localização da síntese de NO em diferentes estágios de desenvolvimento floral de *A. thaliana*, detectada com DAF-2 DA

A produção de NO por botões florais de *A. thaliana* foi avaliada em diferentes estágios de desenvolvimento floral.

Em gineceus de plantas mutantes *nia1 nia2*, durante o estágio 8 de desenvolvimento floral, a produção de NO visualizada após tratamento com DAF-2DA ficou restrita à região onde posteriormente no desenvolvimento se encontrarão as papilas estigmáticas (Figura 5A - seta). A região correspondente ao estilete do gineceu apresentou emissão de fluorescência avermelhada, atribuída à presença de clorofila. No estágio 11 de desenvolvimento floral, em que as papilas estigmáticas estão recém diferenciadas e aparecem no topo do gineceu, observou-se uma intensa produção de NO (Figura 5B). No estágio 12, (conforme já mostrado na Figura 4 para o tipo selvagem), as papilas completamente diferenciadas ainda apresentam intensa emissão de fluorescência esverdeada (Figura 5C). Neste estágio de desenvolvimento a produção de NO pareceu estar restrita a determinadas regiões da papila estigmática. No estágio 13 já não se observa produção de NO pelas papilas (Figura 5D).

Os estames de *nia1 nia2* na fase 8 de desenvolvimento floral (que iniciaram sua diferenciação, mas ainda não produzem grãos de pólen) não apresentaram fluorescência esverdeada, que seria indicativo da produção de NO (Figura 5E). Neste estágio de desenvolvimento os estames apresentam apenas emissão de fluorescência avermelhada no comprimento de onda analisado, indicando a autofluorescência da clorofila. Nas fases 11, 12 e 13 de desenvolvimento (Figura 5F, G, H, respectivamente) a síntese de NO ocorreu somente nas anteras em que havia produção de grãos de pólen, assim como anteriormente mostrado no estágio 12 de desenvolvimento no tipo selvagem (Figura 4).

A Figura 6 mostra resultados de marcação com DAF-2DA realizados em gineceu de *A. thaliana* do genótipo selvagem. Como é possível perceber na Figura 6A, as papilas estigmáticas

na fase 11 de desenvolvimento apresentam maior emissão de NO, seguido da fase 12, em que esta mesma estrutura apresenta menor emissão de fluorescência (Figura 6B). No estágio 13 (em que a antese já havia ocorrido) a emissão de fluorescência esverdeada pelas papilas praticamente já não se observa, quando comparada aos demais estágios florais analisados (Figura 6C). É possível perceber nitidamente a existência de grãos de pólen aderidos às papilas observando-se a Figura 6D, que representa a imagem obtida através de microscopia de contraste diferencial da Figura 6C. A microscopia de contraste diferencial utiliza filtros polarizadores e prismas para separar e recombinar trajetos de luz dando às amostras uma aparência tridimensional.

Os resultados mostram que o padrão de emissão de fluorescência entre os genótipos foi semelhante nas diferentes fases de desenvolvimento floral. Para ambos os genótipos a produção de NO se mostrou máxima nas papilas estigmáticas jovens e à medida que os gineceus se desenvolvem, a produção de NO por estas estruturas foi diminuída. Nos estames a produção de NO ficou restrita aos grãos de pólen, que só se formam nos estágios mais adiantados do desenvolvimento floral.

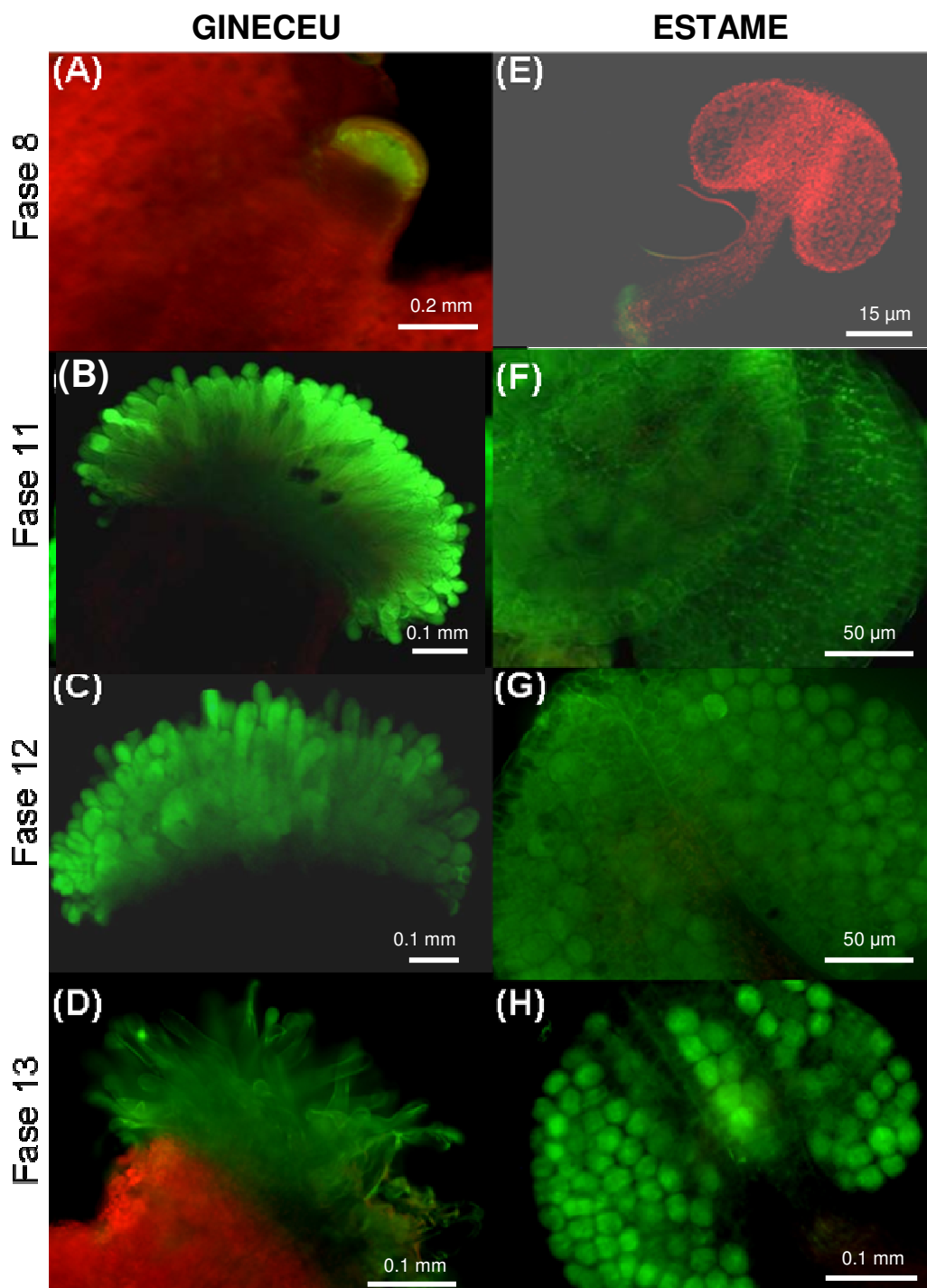


Figura 5 – Localização da produção de NO em gineceu e estames de botões florais do mutante *nia1 nia2* de *A. thaliana*, em diferentes estágios de desenvolvimento floral. As estruturas florais (gineceus e estames), removidas de botões nas fases de desenvolvimento indicadas, foram tratadas com 10 μ M do indicador de NO DAF-2DA.

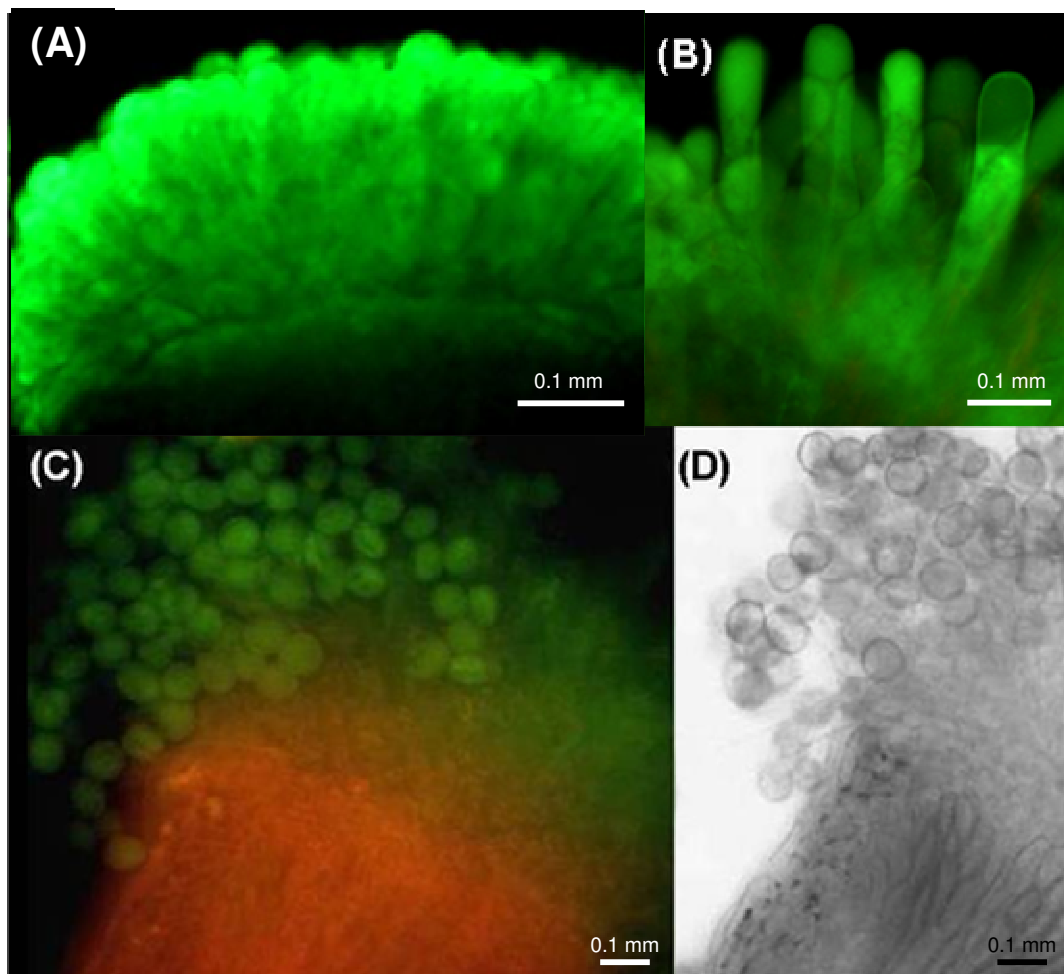


Figura 6 – Emissão do radical NO por gineceu de plantas de *A. thaliana* do genótipo selvagem, em diferentes estágios de desenvolvimento. Os tecidos foram tratados com o indicador fluorescente de NO, DAF-2DA, a 10 μ M. Fases 11, 12 e 13 de desenvolvimento floral estão representadas em A, B e C, respectivamente. Em D está representada a imagem de contraste diferencial de C.

4.3 - Emissão de NO nas estruturas florais detectada por DAF- 2DA é prevenida por CPTIO

A emissão de fluorescência esverdeada nas estruturas florais tratadas apenas com DAF-2 DA ficou restrita às papilas estigmáticas do gineceu (Figura 7A) e aos grãos de pólen nas anteras (Figura 7B). No tratamento com CPTIO (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido), um composto que seqüestra NO do meio (Pfeiffer *et al.*, 1997) a emissão de fluorescência foi significativamente reduzida, tanto no gineceu (Figura 7C) como nos estames (Figura 7D), indicando que a fluorescência emitida nos controles positivos, deve-se à síntese de NO. Nos estames, embora o CPTIO tenha reduzido significativamente a emissão de fluorescência esverdeada (Figura 7D), alguns micrósporos ainda apresentaram níveis basais de fluorescência esverdeada, o que pode indicar que a concentração utilizada de CPTIO não foi suficiente para seqüestrar todo NO, ou que mesmo assim exista uma produção basal deste radical nestas células.

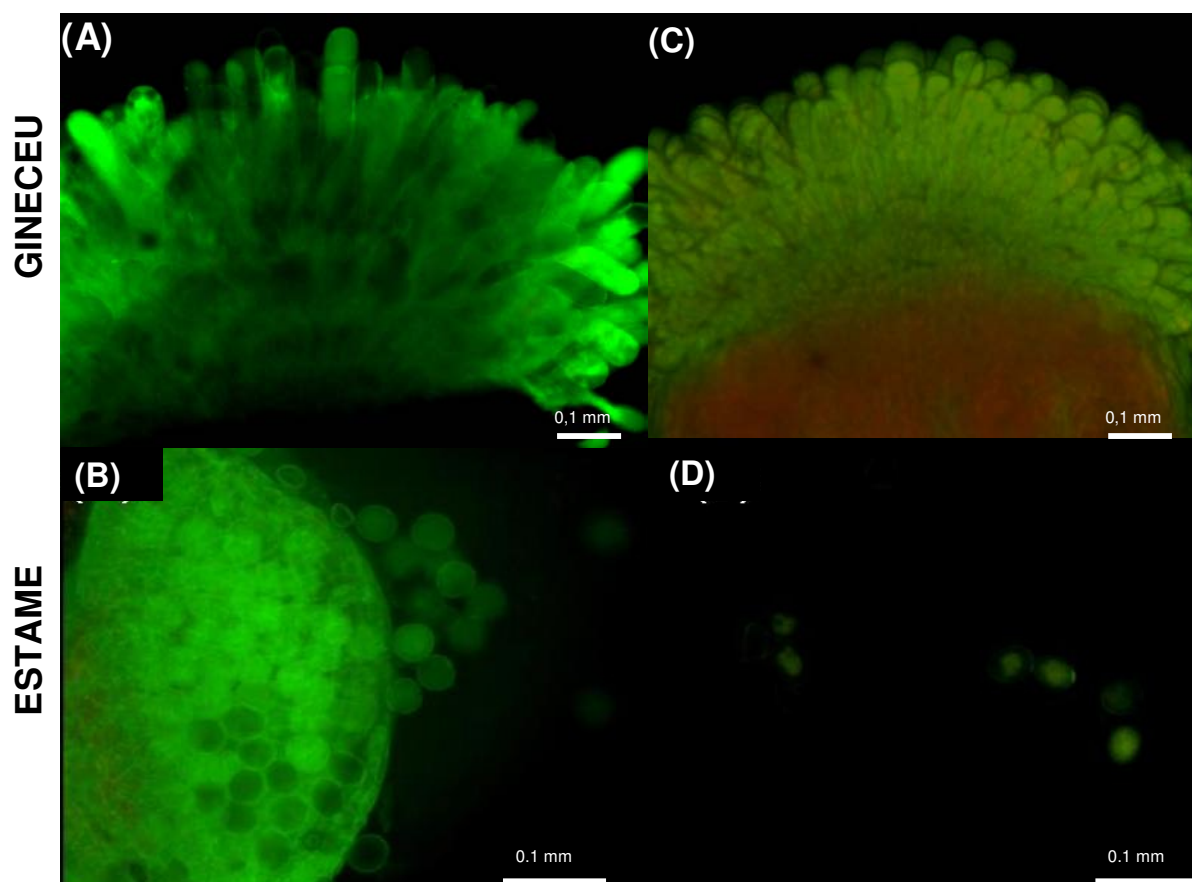


Figura 7 – Detecção de NO em gineceus e estames de *A. thaliana* é prevenida por CPTIO.

Amostras de botões no estágio 12 de desenvolvimento floral de plantas do genótipo selvagem foram incubadas com o indicador fluorescente para NO, DAF-2DA, a 10 μ M (A, B) ou pré-tratadas com o sequestrador de NO (CPTIO 1mM), antes dos tratamentos com DAF-2DA (C, D).

4.4 - Localização da síntese de NO em diferentes estágios de desenvolvimento floral de *A. thaliana* detectada com 1,2- DAA

Em gineceus de plantas de *A. thaliana* do genótipo selvagem, durante o estágio 11 de desenvolvimento floral, a produção de NO visualizada após tratamento com 1,2 - DAA ficou restrita às papilas estigmáticas, que pode ser observada pela intensa emissão de fluorescência avermelhada (Figura 8A). Entretanto, a intensidade da emissão de NO foi máxima durante a fase 11 (Figura 8A), sendo diminuída no estágio 12 (Figura 8B) e bastante reduzida no estágio 13 de desenvolvimento (Figura 8C). Estes resultados são condizentes com os observados com o indicador DAF- 2DA, mostrados anteriormente.

Em estames, a produção de NO em *A. thaliana* do tipo selvagem ficou restrita às anteras que produziam grãos de pólen. Durante a fase 11, é possível perceber que os micrósporos não sintetizam NO, uma vez que o tratamento com 1,2- DAA não resultou na emissão de fluorescência avermelhada (Figura 8D). Entretanto, à medida que a microsporogênese ocorre, com o decorrer do desenvolvimento floral, os grãos de pólen passam a sintetizar NO (Figuras 8E e F, para os estágios 12 e 13 de desenvolvimento, respectivamente).

Amostras de estames de plantas do tipo selvagem, na fase 12 de desenvolvimento floral, foram incubadas com o indicador 1,2- DAA e contra coradas com o indicador DAPI, específico para visualizar o núcleo das células. Esta dupla marcação possibilitou acompanhar a evolução da microsporogênese. Anteras produzindo grãos de pólen, após tratamento com 1,2- DAA, apresentaram emissão de fluorescência avermelhada (Figura 9A). É possível observar que à medida que a microsporogênese progride (dados observados com o indicador DAPI) nas anteras, os micrósporos apresentam emissão crescente de NO (Figuras 9B e C, sendo que em C, o grão de pólen apresenta maior intensidade de fluorescência – seta). A Figura 9D mostra a antera marcada com DAPI, já nas Figuras 9E e F são mostradas a fluorescência do núcleo de micrósporos ou grãos de pólen (seta), contra corados com DAPI.

Botões florais de plantas NR-deficientes apresentaram o mesmo padrão de emissão de fluorescência que o observado em plantas do genótipo selvagem, para ambas as estruturas florais tratadas (gineceu e estame). A síntese de NO foi maior em papilas estigmáticas de gineceu na fase 11 (Figura 10A), tendo sua produção diminuída no estágio 12 (Figura 10B) e quase ausente no estágio 13 de desenvolvimento (Figura 10C). Em estames incubados com 1,2- DAA, durante as fases 11 e 12 de desenvolvimento floral (Figuras 10D e E, respectivamente), não foi observada emissão de fluorescência avermelhada, sendo esta restrita apenas às anteras que produziam grãos de pólen, de botões no estágio 13 de desenvolvimento (Figura 10F).

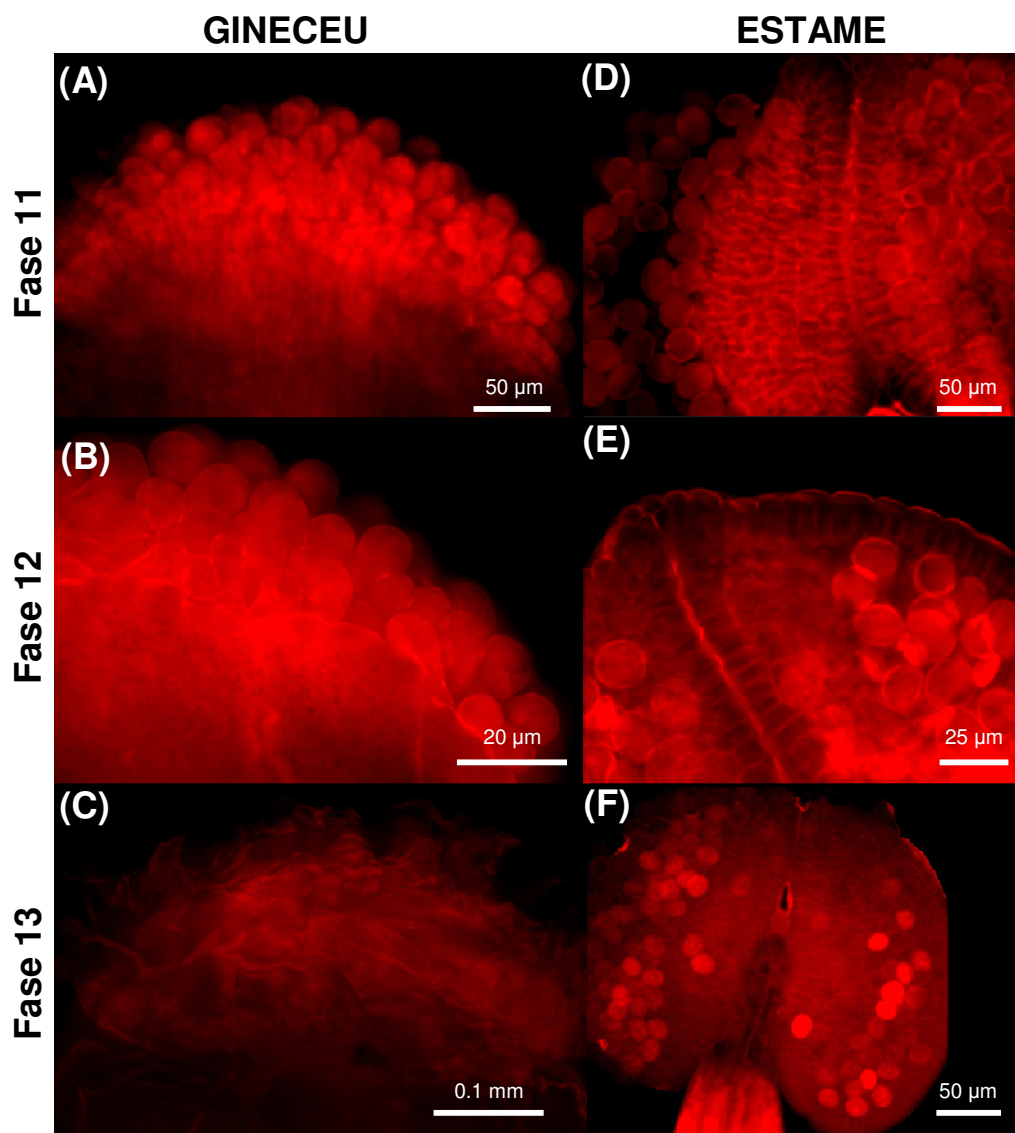


Figura 8 – Produção de NO em gineceu e estames de botões florais de *A. thaliana* selvagem em diferentes estágios de desenvolvimento floral, detectada por 1,2- DAA. Amostras de gineceu e estames de plantas nos estágios 11, 12 e 13 de desenvolvimento floral, foram tratadas com 50 μ M do indicador de NO 1,2-DAA.

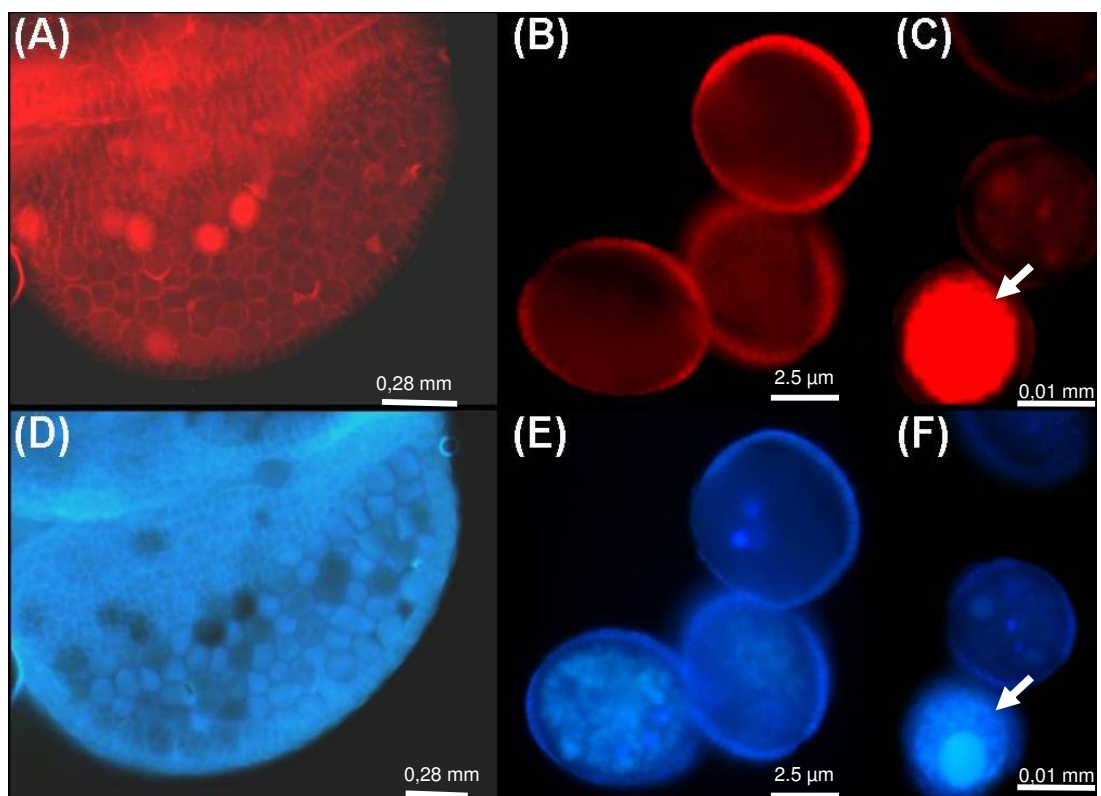


Figura 9 - Visualização da produção de NO *in situ* em estames de plantas de *A. thaliana* selvagem, durante o estágio de desenvolvimento floral 12. Os tecidos foram tratados com o indicador fluorescente de NO, 1,2-DAA, a 50 μ M. Em D, E e F são mostradas as marcações do núcleo com o indicador DAPI. As setas indicam maior emissão de NO em C, que corresponde ao núcleo do grão de pólen, em F.

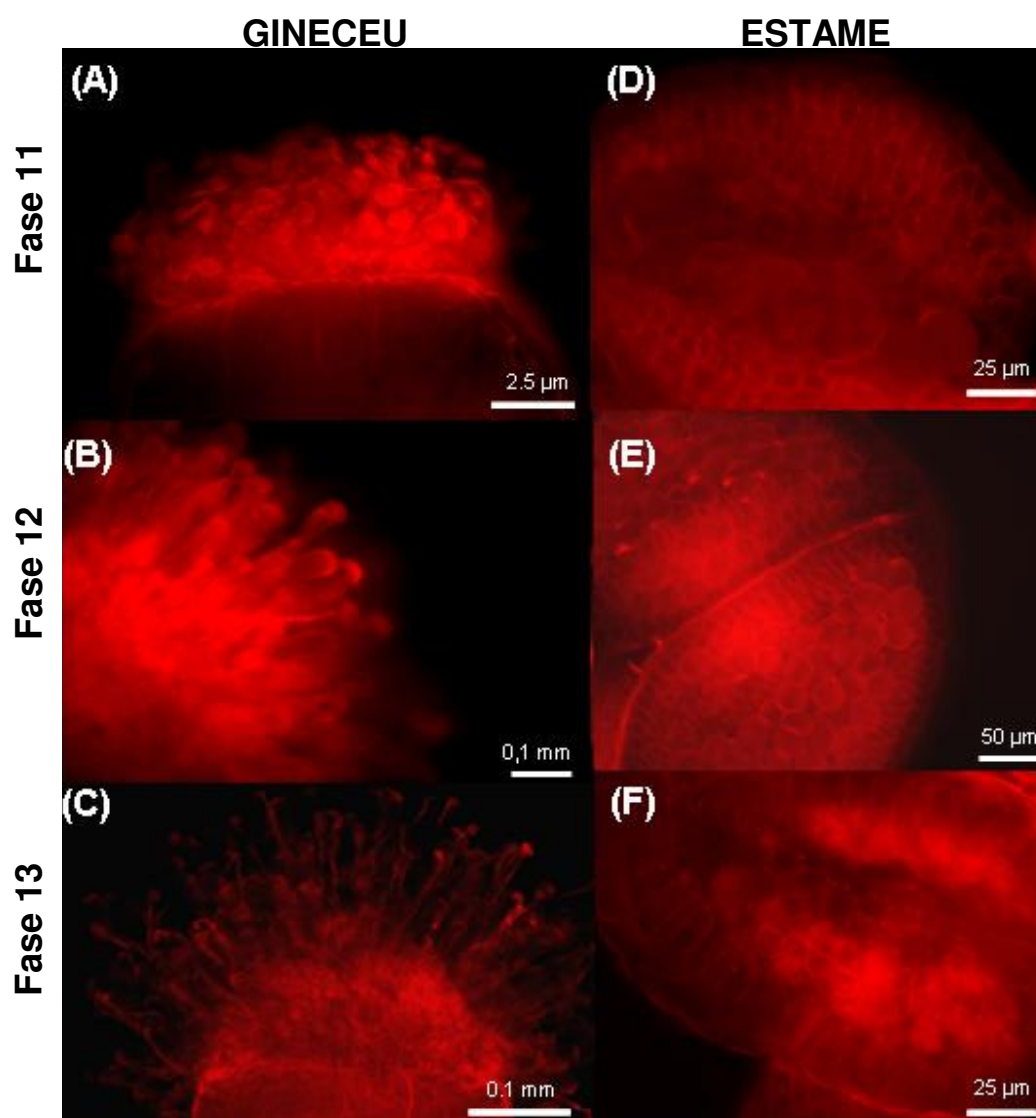


Figura 10 – Síntese de NO em gineceu e estames de botões florais do mutante *nia1 nia2* de *A. thaliana* em diferentes estágios de desenvolvimento floral, detectada por 1,2- DAA. Amostras de gineceu e estames de plantas nos estágios 11, 12 e 13 de desenvolvimento floral, foram tratadas com 50 µM do indicador de NO 1,2-DAA.

4.5 - Emissão de NO nas estruturas florais detectada por 1,2-DAA é prevenida por CPTIO

Gineceus de plantas selvagens, durante o estágio 12 de desenvolvimento floral, quando incubados com 1,2-DAA, exibiram intensa emissão de fluorescência avermelhada na região das papilas estigmáticas, que não foi observada no tratamento controle com o seqüestrador de NO, CPTIO (Figura 11), em que as partes florais foram previamente incubadas por 30 minutos em CPTIO e posteriormente tratadas com o indicador 1,2-DAA. Estes resultados indicam que a emissão de fluorescência nas papilas estigmáticas pode ser atribuída à síntese de NO neste local. De forma análoga, quando estames foram incubados com o mesmo indicador fluorescente, os grãos de pólen presentes na antera revelaram intensa emissão de fluorescência avermelhada, que foi totalmente suprimida no tratamento com o seqüestrador de NO (Figura 11), já que não se observa emissão de fluorescência. Ainda, na Figura 11 são mostradas imagens de microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC), representando imagens tridimensionais dos controles negativos, tratados com CPTIO.

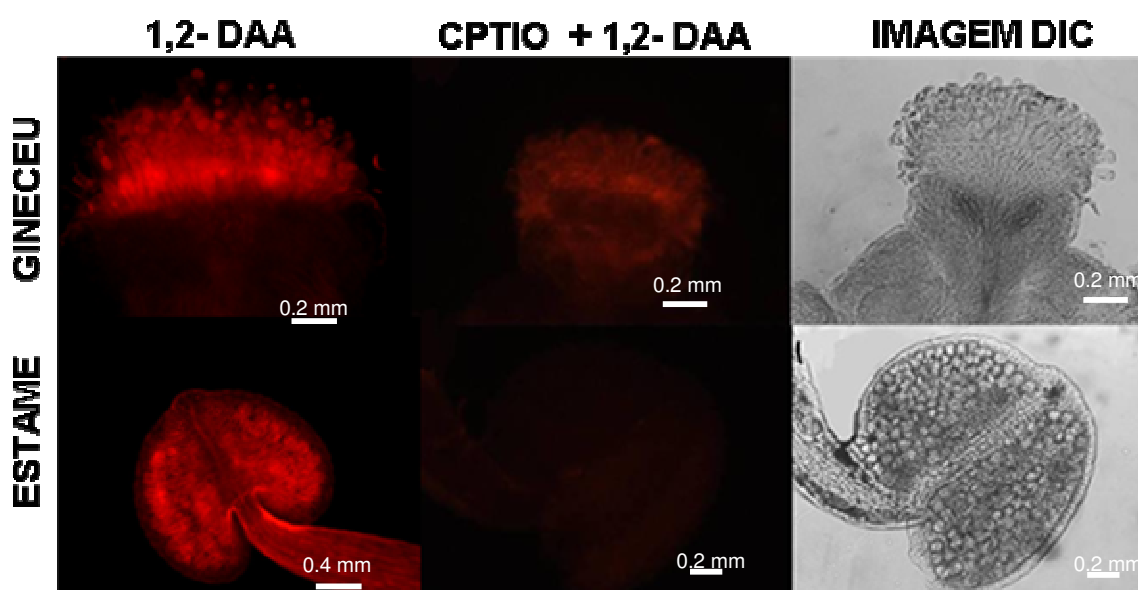


Figura 11 – Emissão de fluorescência por gineceu e estames de *A. thaliana* do tipo selvagem, detectada por 1,2- DAA, é prevenida por CPTIO. Os tecidos foram tratados com o indicador fluorescente de NO, 1,2-DAA, a 50 μ M. Controle negativo foi realizado com pré-tratamento com 20mM de CPTIO. Imagens de interferência de contraste (DIC) correspondem às amostras de gineceu e estame tratados com o sequestrador de NO, CPTIO.

4.6 - Validação dos dados de microscopia de fluorescência por espectrofluorimetria

Considerando que os dados obtidos através de microscopia de fluorescência são apenas qualitativos, foram realizados experimentos incubando-se os botões florais de *A. thaliana* com os indicadores fluorescentes para NO, DAF- 2 ou DAF-2 DA, com a finalidade de se quantificar a produção de NO e validar os resultados observados nas imagens de microscopia de fluorescência. Adaptando-se metodologia desenvolvida por Ye e colaboradores (2004), os botões florais foram incubados com DAF-2; durante o período de incubação, o radical NO emitido pelo tecido floral pôde ser liberado para a solução e reagir com o indicador. Após uma hora de incubação, a temperatura ambiente, as amostras foram congeladas a -78° C, com

a finalidade de aumentar a detecção de NO, uma vez que o NO pode ser emitido a partir de amostras biológicas mesmo quando congeladas (Ye *et al.*, 2004). A emissão de NO foi detectada por espectrofluorimetria a partir do sobrenadante das amostras.

Para avaliar a especificidade do marcador ao NO, uma vez que este indicador tem sido questionado por sofrer interferências de outros compostos, como o ácido ascórbico (AA) e dehidroascorbato (DHA), foram comparados os resultados de emissão de fluorescência das partes florais incubadas com DAF-2 ou DAF-2 DA, ambos a 10 μ M. A Figura 12 mostra os espectros de fluorescência das amostras de botões florais durante as fases 11 e 13 de desenvolvimento, tratados com DAF-2. É possível notar pelos espectros que a máxima emissão de fluorescência é observada em 515 nm, que corresponde ao comprimento de onda de emissão de fluorescência do DAF-2T. Deste modo, para as análises quantitativas foram utilizados os valores de fluorescência obtidos em 515 nm. Ainda na Figura 12 é possível perceber que botões florais de plantas do tipo selvagem, WT, apresentaram maior emissão de fluorescência que a mutante *nia1 nia2*, em ambas as fases de desenvolvimento avaliadas (sendo que durante a fase 11 a intensidade de fluorescência emitida foi maior que durante a fase 13, em ambos os genótipos).

Na Figura 13, é possível visualizar claramente que a intensidade de fluorescência emitida por botões florais incubados com DAF-2 foi maior do que quando os botões foram tratados com DAF-2 DA. Ainda, esta emissão foi maior em ambos os genótipos durante o estágio 11 de desenvolvimento floral. Botões florais de plantas do tipo selvagem e *nia1 nia2*, incubados com DAF-2 durante o estágio 11 de desenvolvimento floral apresentaram em média concentração de $14,83 \pm 0,63$ e $10,66 \pm 0,92$ nmol de NO, respectivamente. No estágio 13, sob este mesmo tratamento, plantas do tipo selvagem e *nia1 nia2* apresentaram $4,88 \pm 0,57$ e $2,57 \pm 0,37$ nmol de NO, respectivamente. Já no tratamento com DAF-2 DA, a concentração de NO emitida por botões florais do tipo selvagem e *nia1 nia2*, durante o estágio 11 foi em média 0,09

$\pm 0,02$ e $0,52 \pm 0,06$ nmol, respectivamente, e durante a fase 13, $0,5 \pm 0,09$ e $0,18 \pm 0,04$ nmol, respectivamente (Figura 13).

Considerando os resultados mostrados nas figuras anteriores (Figuras 12 e 13), é possível afirmar, então, que o indicador que reage com o NO (ou seus produtos derivados) é o DAF-2. Deste modo, os demais experimentos foram realizados com este marcador. Como mostra a Figura 14, botões florais de plantas do tipo selvagem incubados com o indicador DAF-2 a $10 \mu\text{M}$, durante a fase 11 de desenvolvimento, apresentaram emissão de fluorescência maior quando comparada com o estágio 13 de desenvolvimento (em média $8,97 \pm 1,18$ e $4,65 \pm 0,9$ nmol de NO, respectivamente). Botões florais de planta mutante *nia1 nia2* também apresentaram maior conteúdo de NO no estágio 11 de desenvolvimento, quando comparada ao estágio 13 ($5,88 \pm 0,54$ e $2,29 \pm 0,48$ nmol de NO, respectivamente). De maneira interessante, a intensidade de fluorescência emitida por botões florais de plantas do tipo selvagem foi maior quando comparada com a mutante *nia1 nia2* (1,39 e 1,89 vezes maior nas fases 11 e 13 de desenvolvimento, respectivamente).

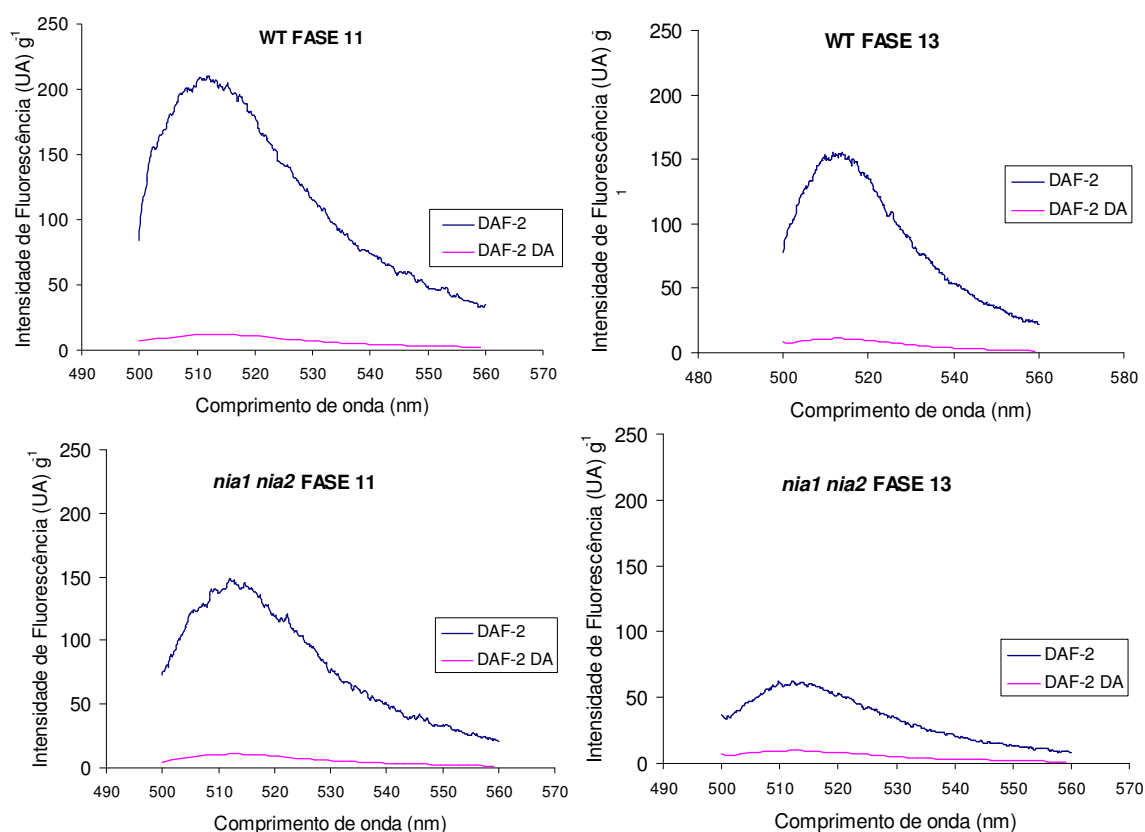


Figura 12 – Espectros de emissão de fluorescência de DAF-2 e DAF-2 DA por botões florais de *A. thaliana* (selvagem e mutante *nia1 nia2*) nos estágios 11 e 13 de desenvolvimento floral. Os espectros foram obtidos após 1h de exposição ao indicador fluorescente DAF- 2 ou DAF- 2DA, a 10 μ M, à temperatura ambiente, e posterior congelamento por 24h a -78^o.C.

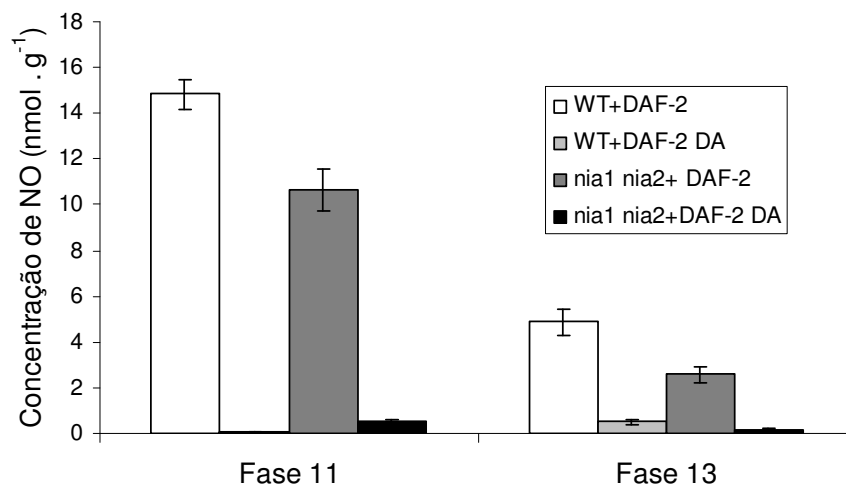


Figura 13 – Detecção da síntese de NO em botões florais de *A. thaliana* dos genótipos selvagem (WT) e *nia1 nia2*, durante os estágios de desenvolvimento floral 11 e 13, por espectrofluorimetria. A produção de NO foi avaliada após tratamento com DAF- 2 ou DAF-2DA, a 10 μ M, por 1h e posterior congelamento a -78° . C por 24h. Os dados representam médias dos valores da concentração de NO, em nmol, por grama de tecido \pm erro padrão.

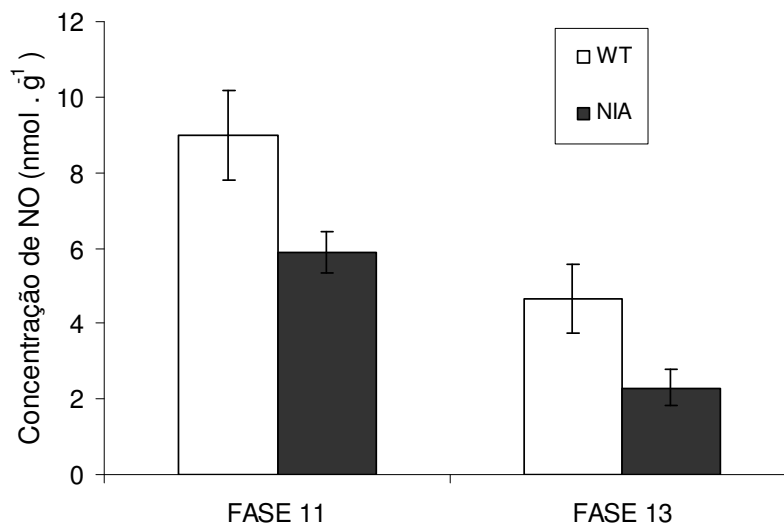


Figura 14 – Emissão de fluorescência por botões florais de *A. thaliana* durante as fases 11 e 13 de desenvolvimento. As amostras foram incubadas com o indicador fluorescente para NO DAF- 2, a 10 μ M, por 1h à temperatura ambiente e posteriormente congeladas a -78° . C por 24h. As análises foram realizadas por espectrofluorimetria, conforme descrito na metodologia. Os valores apresentados representam as médias dos valores \pm erro padrão.

4.7 - Efeito da mutação para NR na indução floral

Com a finalidade de se analisar o efeito da deficiência na enzima NR na transição da fase vegetativa para a reprodutiva, foram comparados os parâmetros de indução floral entre os genótipos selvagem e mutante conforme descrito na metodologia. Estas análises foram realizadas em pelo menos 20 plantas dos genótipos selvagem e *nia1 nia2*, sendo que os dados foram amostrados em três florações independentes. Os dados obtidos foram analisados realizando-se a média aritmética dos parâmetros de indução floral, o cálculo do desvio e do erro padrão dos valores coletados.

Conforme mostra a Figura 15, em média, sob as condições de crescimento das plantas utilizadas em nossos experimentos, o aparecimento do primeiro botão floral em plantas do tipo selvagem ocorreu $37,09 \pm 0,78$ dias após a semeadura, enquanto que em mutantes *nia1 nia2* o primeiro botão floral apareceu precocemente, $31,69 \pm 0,31$ dias após a semeadura. De forma análoga, a antese, ou seja, a abertura do botão floral ocorreu primeiramente em plantas *nia1 nia2* ($35,56 \pm 0,31$ dias após a semeadura), enquanto que em plantas do tipo selvagem a antese ocorreu após $40,87 \pm 0,99$ dias desde que as sementes foram plantadas. Entretanto, após o surgimento do primeiro botão floral, o intervalo de dias para que a antese ocorresse foi semelhante em ambos os genótipos ($3,78 \pm 0,37$ dias para o tipo selvagem e $3,89 \pm 0,23$ dias para *nia1 nia2*). Em geral, os resultados mostram que a mutação para a enzima NR afetou significativamente o tempo de floração em plantas de *A. thaliana*, acarretando no adiantamento de 5,4 dias, em média, para o aparecimento do primeiro botão floral. Outro parâmetro de indução floral afetado pela mutação para a NR foi o tempo necessário para que a antese ocorresse, uma vez que esta ocorreu em plantas *nia1 nia2* 5,31 dias antes, em média, que em plantas do tipo selvagem.

Ainda, foi analisado o número de folhas em roseta (características do estado vegetativo) e de folhas caulinares (características do estado reprodutivo) no dia em que a antese ocorreu em plantas de ambos os genótipos. Em média, plantas do tipo selvagem e mutante *nia1 nia2* apresentavam $10,26 \pm 0,28$ e $8,56 \pm 0,32$ folhas em roseta, respectivamente. O número de folhas caulinares praticamente não diferiu entre os genótipos ($1,74 \pm 0,18$ no tipo selvagem e $1,97 \pm 0,12$ em *nia1 nia2*). Esta correlação pode ser visualizada na Figura 16.

Com a finalidade de verificar se a floração precoce em mutantes NR-deficientes era consequência apenas da deficiência do radical NO, ou também da deficiência de aminoácidos, foram analisados os parâmetros de indução floral em plantas *nia1 nia2* tratadas com os aminoácidos arginina (Arg) ou glutamina (Gln), a 10 mM. É importante salientar que os tratamentos de recuperação de aminoácidos no mutante *nia1 nia2* faz parte do trabalho de

doutorado de aluno do nosso grupo de pesquisa. Estas plantas foram utilizadas para as análises de indução floral. Em média, o aparecimento do primeiro botão floral em plantas *nia1 nia2* tratadas com Arg ocorreu $31,18 \pm 0,75$ dias após semeadura e em $29 \pm 0,61$ dias após semeadura em plantas de mesmo genótipo tratadas com Gln (Figura 17 e Tabela 1). A antese ocorreu após $34,21 \pm 0,78$ dias em plantas *nia1 nia2* tratadas com Arg e após $32,32 \pm 0,21$ dias em plantas da mesma linhagem tratadas com Gln (Figura 17 e Tabela 1). Em geral, os resultados mostram que apesar dos níveis de aminoácidos terem sido recuperados com os tratamentos com arginina ou glutamina, o fenótipo de floração precoce – quando comparado com o genótipo selvagem – se manteve, levando ao adiantamento de, em média, 5,91 e 8,09 dias para o aparecimento do primeiro botão floral em plantas *nia1 nia2* tratadas com Arg 10mM ou Gln 10mM, respectivamente. Foi também analisado o número de folhas em roseta e de folhas caulinares no dia em que a antese ocorreu em plantas *nia1 nia2* de ambos os tratamentos. Em média, plantas tratadas com Gln apresentavam 1,36 folhas em roseta a mais que a mutante *nia1 nia2* tratada com Arg, enquanto que o número de folhas caulinares não diferiu (1,71 em ambos os tratamentos). Esta correlação pode ser visualizada na Figura 18 e na Tabela 1.

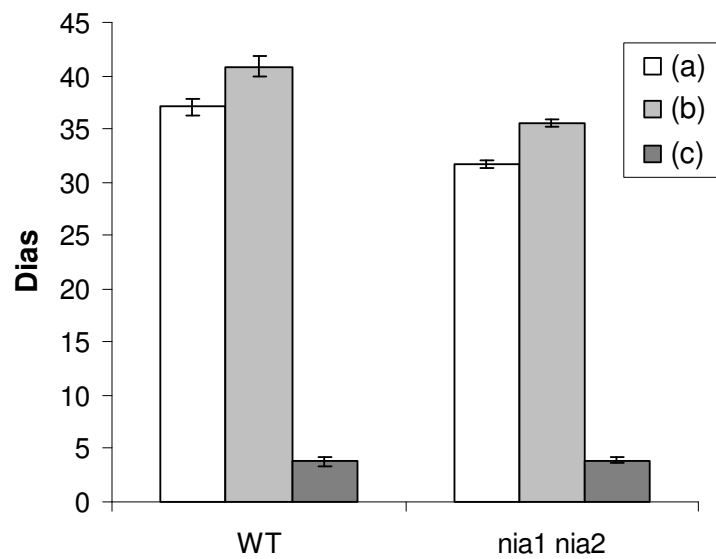


Figura 15 – Parâmetros de floração nos genótipos selvagem e *nia1 nia2* de *Arabidopsis thaliana*. (a) Número de dias para o aparecimento do primeiro botão floral desde a semeadura. (b) Número de dias para a ocorrência da antese (abertura do botão floral). (c) Intervalo de dias entre o aparecimento do primeiro botão floral e a antese. Os valores apresentados representam as médias dos valores \pm erro padrão.

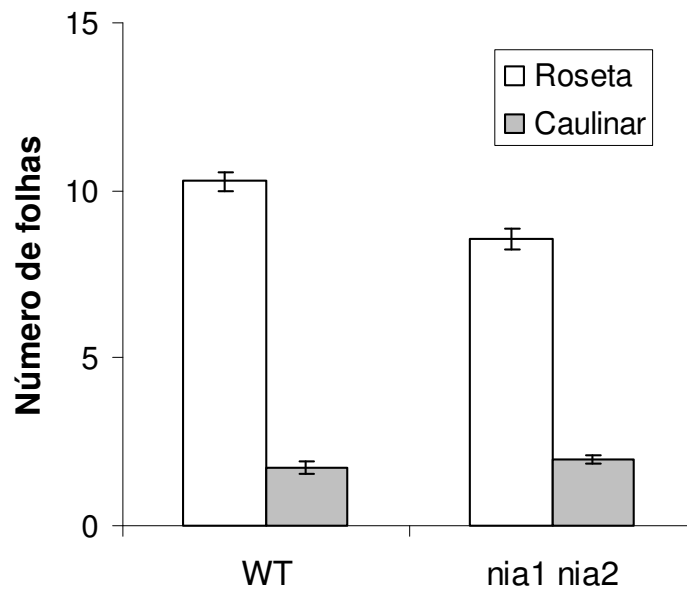


Figura 16 – Análise comparativa do efeito da deficiência para a enzima NR na indução floral. A transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva (indução floral) é representada pela formação de folhas caulinares em detrimento das folhas em roseta, características da fase vegetativa. Os valores apresentados representam as médias dos valores \pm erro padrão.

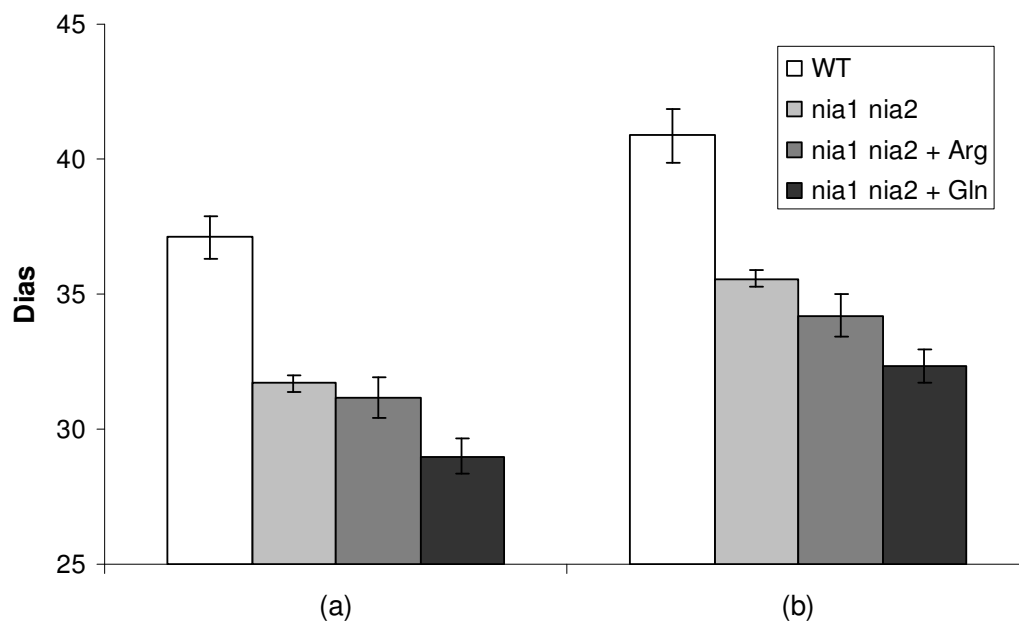


Figura 17 – Parâmetros de floração em plantas de *A. thaliana* do genótipo *nia1 nia2*, tratadas com arginina ou glutamina, a 10 mM. (a) Número de dias para o aparecimento do primeiro botão floral desde a semeadura. (b) Número de dias para a ocorrência da antese (abertura do botão floral). Foi representada a média dos valores \pm erro padrão.

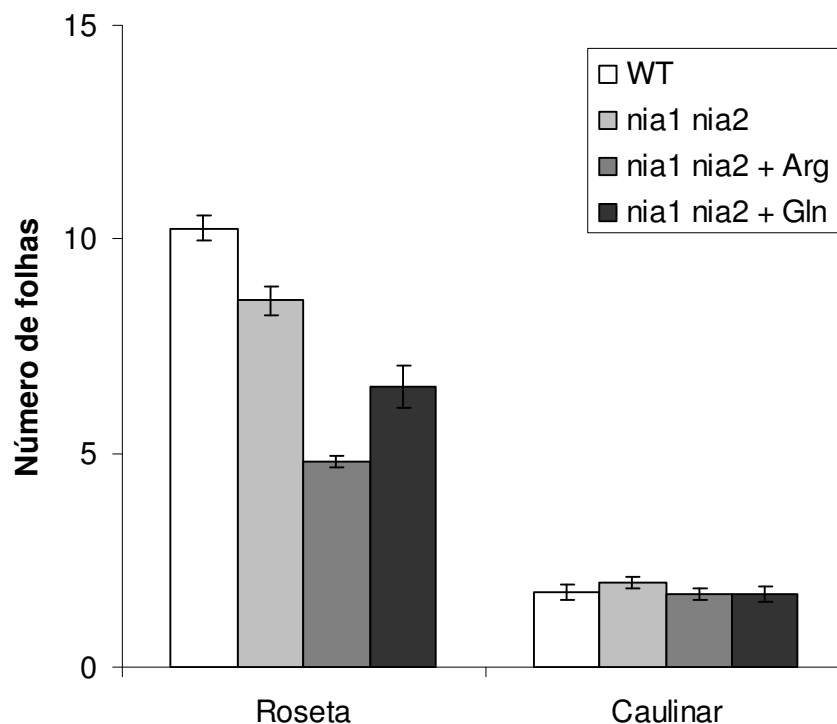


Figura 18 – Análise comparativa do efeito dos tratamentos com arginina e glutamina, a 10 mM, na indução floral de plantas de *A. thaliana* do genótipo *nia1 nia2*. A transição da fase vegetativa para a fase reprodutiva (indução floral) é representada pela formação de folhas caulinares em detrimento das folhas em roseta, características da fase vegetativa. Foi representada a média dos valores \pm erro padrão.

Tabela 1 - Parâmetros de indução floral de plantas *Arabidopsis thaliana* do tipo selvagem e mutantes duplo defectivas para NR (*nia1 nia2*). (a) Número de dias para o aparecimento do primeiro botão floral desde a semeadura. (b) Número de dias para a ocorrência da antese (abertura do botão floral). R = número de folhas em roseta. C = número de folhas caulinares. Os dados são representativos da média \pm erro padrão.

Genótipo	(a)	(b)	R	C
WT	37,09 \pm 0,78	40,87 \pm 0,99	10,26 \pm 0,28	1,74 \pm 0,18
<i>nia1 nia2</i>	31,69 \pm 0,31	35,56 \pm 0,31	8,56 \pm 0,32	1,97 \pm 0,12
<i>nia1 nia2</i> Arg 10 mM	31,18 \pm 0,75	34,21 \pm 0,78	4,82 \pm 0,14	1,71 \pm 0,14
<i>nia1 nia2</i> Gln 10 mM	29 \pm 0,67	32,32 \pm 0,21	6,56 \pm 0,51	1,71 \pm 0,17

5. DISCUSSÃO

5.1 - Síntese de NO pelas estruturas florais de *A. thaliana* detectada com indicadores fluorescentes

No presente trabalho, além do indicador fluorescente DAF-2 DA, utilizou-se também o marcador de NO diaminoantraquinona (1,2-DAA) para localizar a produção de NO durante o desenvolvimento floral de *Arabidopsis thaliana*. O conjunto dos resultados mostra que a emissão deste radical é específica a alguns tipos de células do gineceu e do estame. No gineceu, a produção de NO ficou restrita às células das papilas estigmáticas e esta não foi afetada pela deficiência da enzima nitrato redutase, uma vez que no mutante *nia1 nia2* também se observou emissão de fluorescência esverdeada ou avermelhada, dependendo do indicador utilizado (DAF-2 DA ou 1,2-DAA, respectivamente). No estame, apenas anteras produzindo células germinativas (micrósporos ou grãos de pólen) mostraram emissão de NO e esta foi observada tanto em plantas selvagens como em plantas duplo defectivas para NR, mostrando

que a deficiência na enzima NR não afetou na produção do radical NO nas anteras dos estames.

Como os indicadores de NO podem reagir de modo não específico nas células em geral (Zhang *et. al.*, 2002) e alguns tecidos podem também apresentar autofluorescência na região do espectro em que as amostras são analisadas, o uso do seqüestrador de NO (CPTIO) como controle negativo foi importante para mostrar que a fluorescência emitida pelos diferentes órgãos florais deve ser atribuída, de fato, à síntese de NO nestes locais.

Os resultados gerais mostram que a emissão intensa de fluorescência ocorreu em estruturas florais específicas em estágios de desenvolvimento mais avançado, coincidindo com a diferenciação morfológica do gineceu e com a microsporogênese, em anteras. Deste modo, o radical óxido nítrico deve desempenhar um papel importante no desenvolvimento floral. Ainda, sépalas e pétalas marcadas com o indicador DAF-2 DA não apresentaram emissão de NO, evidenciando que apenas partes florais diretamente envolvidas no sistema reprodutivo é que sintetizam óxido nítrico. Resumidamente, os resultados sugerem que o NO é produzido em fases e tecidos específicos das estruturas reprodutivas das plantas e deve, portanto, desempenhar um papel importante no processo de reprodução sexuada em vegetais.

Os resultados mostraram também que a produção de NO nas papilas estigmáticas aumenta com o estágio de desenvolvimento, alcançando produção máxima na fase 11 de desenvolvimento, em que as papilas estão recém diferenciadas e aparecem no topo do gineceu. Como *A. thaliana* é uma planta que se reproduz por autofertilização (Bowman e Smyth, 1994), é provável que os estigmas estejam receptivos ao grão de pólen momentos antes de ocorrer a antese, uma vez que após a abertura do botão floral o gineceu já está fertilizado. Este fato pode explicar os resultados observados, onde papilas estigmáticas de gineceus na fase 11 de desenvolvimento apresentaram intensa síntese de NO, que foi significativamente reduzida no final do estágio 12 ou início da fase 13 (em ambos os genótipos analisados), sendo quase

inexistente no estágio em que o botão floral sofreu a antese. Flores de *A. thaliana* na fase 13 de desenvolvimento, em que havia estigmas com grãos de pólen aderidos às papilas, quando incubadas com o indicador fluorescente DAF-2 DA, mostraram uma redução significativa de emissão de NO, o que coincide com os dados apresentados pelo grupo de McInnis (2006). Este grupo mostrou que estigmas de flores em estágio avançado de desenvolvimento, de *Senecio squalidus* e *Arabidopsis thaliana*, apresentaram emissão de fluorescência reduzida quando analisados com o indicador DAF- 2DA, refletindo a presença de baixo conteúdo de NO, enquanto que nos grãos de pólen de ambas as espécies estudadas, a emissão de fluorescência foi bastante intensa. Em grãos de pólen de plantas de ambos os genótipos, os resultados obtidos mostram que à medida que a microsporogênese progride, a emissão de NO pelas células germinativas é aumentada, atingindo níveis máximos quando o grão de pólen está formado.

Deste modo, o radical óxido nítrico pode ter importante papel no desenvolvimento do botão floral e pode estar relacionado ao sucesso reprodutivo da planta, uma vez que sua presença é intensa em órgãos reprodutivos da flor, especialmente em estágio de desenvolvimento anterior à antese em flores de *A. thaliana*.

Com a finalidade de quantificar e verificar a especificidade da localização do NO *in situ* no tratamento das estruturas florais de *A. thaliana* com DAF-2 DA, a emissão de fluorescência do composto DAF-2T foi quantificada após a incubação das partes florais com a forma livre do indicador, DAF-2. Quando o DAF-2 é diretamente utilizado para quantificar a emissão de NO, a interferência por algumas moléculas, como ácido ascórbico ou dehidroascorbato, pode ser evitada (Ye *et al.*, 2004). Apesar dos dados de microscopia de fluorescência não apresentarem diferenças quanto ao padrão de emissão de NO em plantas selvagem e *nia1 nia2*, os resultados obtidos por espectrofluorimetria evidenciam que a síntese deste radical é diminuída no mutante *nia1 nia2*. Estes resultados são condizentes com os anteriormente obtidos com folhas de

plantas NR-deficientes, em que não se observou produção de NO (Modolo *et al.*, 2006). Existe, portanto, uma deficiência no conteúdo deste radical em botões florais do mutante *nia1 nia2* quando comparado ao tipo selvagem.

5.2 - Efeito da mutação para NR na indução floral

O complexo controle do tempo de floração garante que as plantas floresçam em condições favoráveis para o sucesso reprodutivo (revisto por Simpson, 2005). O papel do radical óxido nítrico na floração foi mostrado por He e colaboradores (2004), atuando como repressor da transição floral em *A. thaliana*. Análise de plantas tratadas com NO, assim como mutantes que superproduziam NO, mostrou que estas floresceram tardiamente; enquanto que plantas mutantes produzindo níveis de NO reduzidos floresceram precocemente. A ação do óxido nítrico nas vias de floração está relacionada com o controle do tempo de floração, sendo que este radical atua reprimindo a amplificação da expressão do gene dependente do relógio circadiano, e promove o acúmulo do RNA mensageiro que codifica um repressor chave da floração, *FLC* (He *et. al.*, 2004). Os resultados mostraram que plantas com níveis endógenos de NO reduzidos devido à deficiência na enzima NR durante a fase vegetativa apresentaram diferenças significativas na maioria dos parâmetros de floração quando comparados ao tipo selvagem, resultando na floração precoce. Estes resultados, utilizando uma mutação diferente para reduzir os níveis endógenos de NO na planta, corroboram a proposição de He e colaboradores (2004) de que o radical NO pode ser considerado como um fator envolvido no controle do tempo de floração. Assim, os resultados sugerem que, além do NO ser fundamental na determinação da transição do estágio vegetativo para o estágio reprodutivo, há o envolvimento da enzima NR no controle do desenvolvimento reprodutivo, sendo significativa a importância deste radical no desenvolvimento floral.

O controle do tempo de floração, em plantas superiores, é essencial para garantir a eficiência reprodutiva, uma vez que plantas que florescem em condições desfavoráveis para sua reprodução morrerão sem deixar progênie (Attolico e De Tullio, 2006). A maioria das plantas utiliza sinais ambientais para regular a transição floral, já que todos os indivíduos de uma mesma espécie precisam florescer sincronicamente para que o cruzamento seja bem sucedido, e porque todas as espécies precisam completar sua reprodução sexual sob condições externas favoráveis (Bernier *et al.*, 1993). Adicionalmente, sinais endógenos atuam no controle da transição floral, garantindo o sucesso reprodutivo (He *et al.*, 2004).

Tendo em vista que a transição para a floração requer a integração de diferentes estímulos e é regulada por múltiplos sinais, endógenos (como via sinalização hormonal) ou ambientais (como estímulos de luz, temperatura), fatores estressantes para a planta podem alterar seu tempo de floração (Attolico e De Tullio, 2006). Modolo e colaboradores (2005) mostraram que o mutante *nia1 nia2* apresenta deficiência no conteúdo total de aminoácidos, em especial arginina, cujo conteúdo foi de aproximadamente 10 vezes menor que em folhas do genótipo selvagem. Deste modo, para verificar se a floração precoce em mutantes NR-deficientes observada em nossos resultados era de fato consequência apenas da deficiência do radical NO durante o estado vegetativo ou se isto poderia ser atribuído também ao fato deste mutante ser também deficiente em aminoácidos, foram analisados também os parâmetros de indução floral no mutante *nia 1 nia2* tratados com arginina ou glutamina, na tentativa de se recuperar os níveis de aminoácidos da planta selvagem. Estes tratamentos de recuperação dos níveis de aminoácidos em plantas NR-deficientes foram realizados pelo aluno de doutorado do nosso grupo de pesquisa. De forma interessante, apesar dos níveis de aminoácidos das plantas *nia1 nia2* terem sido recuperados (dados não mostrados), o fenótipo de antecipação da transição floral permaneceu inalterado, o que sugere que a floração precoce neste mutante é consequência, portanto, da deficiência de NO durante a fase vegetativa.

É interessante observar que, apesar da deficiência na NR ter afetado a transição floral, os locais de produção de NO durante o desenvolvimento da flor não foi alterado no mutante *nia1 nia2*, embora os dados da validação por espectrofluorimetria mostrem que a produção de NO neste mutante é reduzida, quando comparada ao genótipo selvagem. Estes resultados sugerem que durante o desenvolvimento floral devam existir mecanismos de controle para manter a produção de NO em tecidos específicos dos órgãos reprodutivos.

O entendimento detalhado dos mecanismos que controlam a transição para o estado reprodutivo não é essencial somente para melhorar o conhecimento sobre a reprodução em plantas, mas também é um tema importante no gerenciamento da colheita (Attolico e De Tullio, 2006). A floração precoce é altamente desejada em colheitas que são utilizadas para a produção de sementes e flores, enquanto que a floração tardia é vantajosa para plantas comercialmente usadas em seu estado vegetativo (Attolico e De Tullio, 2006).

Os resultados aqui apresentados acrescentam informações acerca da importância do radical óxido nítrico durante o processo de floração, tanto no desenvolvimento do botão floral como na indução da floração, contribuindo para a elucidação e o entendimento dos processos fisiológicos envolvidos no controle da floração. Futuramente, os dados podem ser utilizados para o manejo de colheitas, dependendo da comercialização das mesmas, levando em conta se o interessante é atrasar ou adiantar a floração destas plantas.

6. CONCLUSÕES

Os resultados gerais indicam que a produção de NO durante o desenvolvimento floral e a indução da floração são afetadas no mutante *nia1 nia2*, revelando um importante papel da NR no controle da floração e na reprodução vegetal. Durante o desenvolvimento de botões florais de *A. thaliana* a fonte de síntese de NO mais significativa parece advir da enzima NR, uma vez que os baixos níveis de NO durante o crescimento vegetativo do mutante *nia1 nia2* (deficiente

na NR) resultaram na precocidade da transição floral. O presente trabalho evidencia, ainda, a importância do radical óxido nítrico e seu envolvimento durante o desenvolvimento do botão floral e na indução floral, demonstrando a importância desta molécula como um fator de sinalização que controla o processo de floração.

7. REFERÊNCIAS

- Arasimowicz, M. e Floryszak-Wieczorek, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses. *Plant Science*. 172(5): 876-887.
- Attolico, A. D. e De Tullio, M. C. (2006) Increased ascorbate content delays flowering in long-day grown *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 462-466.
- Batley, N.H. (2000) Aspects of seasonality. *J. Exp. Bot.* 51: 1769-1780.
- Beligni, M. V. e Lamattina, L. (2001) Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant, Cell & Environment*. 24(3): 267-278.
- Beligni, M. V., Fath, A., Bethke, P. C., Lamattina, L. e Jones, R. L. (2002) Nitric Oxide Acts as an Antioxidant and Delays Programmed Cell Death in Barley Aleurone Layers. *Plant. Physiol.* 129: 1642-1650.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. e Lejeune, P. (1993) Physiological Signals That Induce Flowering. *The Plant Cell*, 5: 1147-1155.
- Bethke, P.C., Badger, M. R. e Jones, R. L. (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16: 332-341.
- Bowman, J. L. e Smyth, D. R. (1994) Flowers. In: "Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development". (J. L. Bowman Ed.) Springer-Verlag. New York, USA.
- Corpas, F. J., Barroso, J. B., Carreras, A., Quirós, M., León, A. M., Romero-Puertas, M. C., Esteban, F. J., Valderrama, R., Palma, J. M., Sandalio, L. M., Gómez, M. e del Río, L. A.

- (2004) Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* 136(1): 2722-2733.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. e Lamattina, L. (2004) Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta.*, 218(6): 900-905.
- Crawford, N. M. e Guo, F-Q. (2005) New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends Plant Sci.* 10(4): 195-200.
- Crawford, N. M., Galli, M., Tischner, R., Heimer, Y. M., Okamoto, M., Mack, A. (2006) Response to Zemojtel *et al*: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.*, 11(11): 526-527.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M. L., Rodrigo, J., Lamas, S., Golvano, M. P. (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *Febbs Letters.* 398(2-3): 159-164.
- Dean, J. V. e Harper, J. E. (1986) Nitric Oxide and Nitrous Oxide Production by Soybean and Winged Bean during the in Vivo Nitrate Reductase Assay. *Plant Physiol.*, 82(3): 718-723.
- del Rio, L. A., Corpas, F. J., Barroso, J. B. (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783-792.
- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., Neill, S. (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 16314-16318.
- Desikan, R., Cheung, M.K., Bright, J., Henson, D., Hancock, J.T. and Neill, S.J. (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signaling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* 55: 205-212.
- Dupuis, I. e Dumas, C. (1990) Biochemical markers of female receptivity in maize (*Zea mays* L.) assessed using *in vitro* fertilization. *Plant Science*, 70: 11-20.

- Fernandes, E., Costa, D., Toste, S. A., Lima, J. L. F. C., Reis, S. (2004). *In vitro* scavenging activity for reactive oxygen and nitrogen species by nonsteroidal anti-inflammatory indole, pyrrole, and oxazole derivative drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1895–1905.
- Ferrer, M. A. e Ros-Barceló, A. (1999). Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell. Environ.* 22: 891-897.
- Gabaldon, C., Gómez Ros, L. V., Pedreño, M. A., Ros Barceló, A. (2005). Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytol.* 165: 121-130.
- Garcia-Mata, C. e Lamattina, L. (2002) Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiol.* 128: 790-792.
- Gomes, A., Fernandes, E., Lima, J. (2006) Use of Fluorescence Probes for Detection of Reactive Nitrogen Species: A Review. *Journal of Fluorescence* 16(1): 119-129.
- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J. F., Magalhães, A. C. N., Martins, I. S. (1997). NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.* 21(3): 183-187.
- Guo, F-Q., Okamoto, M., and Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100-103.
- Guo, F-Q (2006). Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: AtNOS1 is just the beginning. *Trends in Plant Science.* 11(11): 527-528.
- Halbach, O. (2003) Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 9: 217-228.
- Hancock, J. T., Smirnoff, N., Foyer, C. H. (2006). Oxygen metabolism coming up ROSES: a holistic view of the redox metabolism of plant cells. *Journal of Experimental Botany*, 57:iv.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., Pei, Z.M. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968-1971.

- Henry, Y. A., Ducastel, B., Guissani, A. (1997) Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. In YA Henry, B Ducastel, A Guissani, eds, Nitric oxide research from chemistry to biology: EPR spectroscopy of nitrosylated compounds, R.G. Landes Company, Austin, USA, pp 15-46.
- Henderson, I.R. e Dean, C. (2004) Control of *Arabidopsis* flowering: the chill before the bloom. *Development* 131: 3829-3838.
- Huang, J-S. e Knopp, J.A. (1998) Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction in tobacco. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*. Edited by Prior P., Elphinstone J., Allen C. Berlin: INRA and Springer Editions, pp 218-224.
- Hu, X., Neill, S., Tang, Z., Cai, W. (2005) Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* 137:663–670
- Izawa, T., Oikawa, T., Tokutomi, S., Okuno, K., Shimamoto, K. (2000). Phytochromes confer the photoperiodic control of flowering in rice (a short-day plant). *The Plant Journal* , 22(5): 391–399.
- Keeley, J. E. e Fotheringham, C. J. (1997) Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* 276: 1248-1250.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., Nagano, T. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 70: 2446-2453.
- Koornneef, M., Hanhart, C. J., van der Veen, J. H. (1991). A Genetic and Physiological Analysis of Late Flowering Mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet* 229(1): 57-66
- Lakowicz, J.R., Gryczynski, I, Gryczynski, Z. (1999) High throughput screening with multiphoton excitation. *J. Biomolec. Screen.* 4: 355-361.

- Lamattina, L., Garcia-Mata, C., Graziano, M., Pagnussat, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54: 109-136.
- Lamotte, O., Courtois, C., Barnavon, L., Pugin, A., Wendehenne, D. (2005) Nitric oxide in plants: the biosynthesis and cell signalling properties of a fascinating molecule. *PLANTA* 221(1): 1-4.
- Leshem, Y.Y. e Haramaty, E.J. (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.*, 148: 258-263.
- Lombardo, M. C., Graziano, M., Polacco, J., Lamattina, L. (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1:28–33
- McInnis, S. M., Costa, L. M, Gutiérrez-Marcos, J. F., Henderson, C. A., Hiscock, S. J. (2005) Isolation and characterization of a polymorphic stigma-specific class III peroxidase gene from *Senecio squalidus* L. (Asteraceae). *Plant Molecular Biology*, 57: 659-677.
- McInnis, S.M., Desikan, R., Hancock, J.T., Hiscock, S.J. (2006) Production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species by angiosperm stigmas and pollen: potential signaling crosstalk. *New Phytol.* 172: 221-228.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., Salgado, I. (2002) Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. *Plant Physiol.* 130: 1288-1297.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhaes, J.R., Salgado, I. (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* 579: 3814-3820.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Pinto-Maglio, C.A.F., Oliveira, H.C., Seligman, K., Salgado, I. (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* 171: 34-40.

- Mouradov, A., Cremer, F., Coupland, G. (2002) Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* 14(Suppl): S111-S130.
- Murashige, T., e Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C. (2002) Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* 15: 473-497.
- Nagano, T. (1999) Pratical methods for detection of nitric oxide. *Luminescence.* 14: 283-290.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T. (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* 128: 13-16.
- Neill, S. J., Desikan, R., Hancock, J. T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol* 159: 11–35.
- Neill, S.J. (2005). NO way to die – nitric oxide, programmed cell death and xylogenesis. *New Phytol.* 165: 5-7.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson, I. (2007) Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany*, 59(1): 25-35.
- Ninnemann, H. e Maier, J. (1996) Indications for the occurence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochemistry and Photobiology.* 64(2): 393-398.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S., Lamattina, L. (2002) Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiol.* 129: 954-956.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lamattina, L. (2003) Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.* 132: 1241-1248.
- Pagnussat, G. C., Lanteri, M. L., Lombardo, M. C., Lamattina, L. (2004) Nitric oxide mediates the indole acetic acid induction activation of a mitogen-activated protein kinase cascade involved in adventitious root development. *Plant Physiol.* 135: 279-286.

- Pedroso, M.C., Magalhães, J.R., Durzan, D. (2000) A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *J. Exp. Bot.* 51: 1027-1036.
- Pfeiffer, S., Leopolda, E., Hemmens, B., Schmidt, K., Werner, E. R., Mayer, B. (1997) Interference of carboxy-PTIO with nitric oxide and peroxynitrite-mediated reactions. *Free Radical Biology & Medicine.* 22(5): 787-794.
- Planchet, E., Gupta, K.J., Sonoda, M., Kaiser, W. M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspension: rate-limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal*, 41: 732-743.
- Poethig, R. S. (1990) Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250: 923-930.
- Prado, A.M., Porterfield, D.M. and Feijó, J.A. (2004) Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714.
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, M.S.C., Martins, I.S. (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* 445: 283-286.
- Rockel, P., F., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W. M. (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 53: 1–8.
- Romero-Puertas, M. C, Perazzolli, M., Zago, E. D., Delledonne, M. (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell. Microbiol* 6: 795-803.
- Salgado, I., Saviani, E.E., Modolo, L.V., Braga, M.R. (2004) Nitric oxide signaling in plant defence responses to pathogen attack. In *Advances in Plant Physiology*. Edited by Hemantaranjan, A. Vol 7. pp 117-137. Scientific Publishers, Jodhpur, India
- Saviani, E. E., Orsi, C. H., Oliveira, J. F. P., Pinto-Maglio, C. A. F., Salgado, I. (2002) Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death. *FEBS Lett.* 510: 136-140.
- Scherer, G. F. E. e Holk, A. (2000) NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regul.* 32: 345-350.

- Scherer, G. F. E. (2005) Nitric Oxide as a potential second messenger in cytokinin signaling. In: "Nitric Oxide Signaling in Higher Plants". (J R Magalhaes, R P Singh, Eds.) The Science Tech. Publisher. LCC. Houston, USA.
- Simpson, C. G. e Dean, C. (2002) *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296: 285-289.
- Simpson, G. G. 2005 NO flowering *BioEssays* 27: 239-241.
- Smyth, D.R., Bowman, J.L., Meyerowitz, E.M. (1990) Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2: 755-767.
- Stefano, M., Vandelle, E., Polverari, A., Ferrarini, A., Delledonne, M. (2006) Nitric Oxide-Mediated Signaling Functions During the Plant Hypersensitive Response. In: "Plant Cell Monographs". Springer-Verlag, Heidelberg, Berlim. pp 207-222.
- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W. R., Rockel, P. (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta*, 212: 835-841.
- Sthör, C. e Stremlau, S. (2006) Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany*, 57(3): 463-470.
- Stuehr, D.J. (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37: 339-359.
- The Arabidopsis Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408: 796-815.
- Tischner, R., Planchet, E., Kaiser, W. M. (2004). Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS Lett.*, 576(1-2):151-155.
- Wang, Y. e Marsden, P.A. (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol.* 34:71-90.
- Wendehenne, D., Durner, J., Klessig, D. F. (2004) Nitric oxide: a new player in plant signalling and defense responses. *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7: 449-455.

- Wilkinson, J. Q. e Crawford, N. M. (1991). Identification of the *Arabidopsis chl3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *The Plant Cell* 3: 461-471.
- Wilkinson, J. Q. e Crawford, N. M. (1993). Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol. Gen. Gen.* 239: 289-297.
- Yamasaki, H. e 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.
- Yao, D., Vlessidis, A. G., Evmiridis, N. P. (2004) Determination of nitric oxide in biological samples. *Microchimica Acta*, 147: 1-20.
- Ye, X., Kim, W.S., Rubakhin, S.S., Sweedler, J.V. (2004) Measurement of nitric oxide by 4,5-diaminofluorescein without interferences. *Analyst* 129: 1200-1205.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., Durner, J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 102: 15811-15816.
- Zemojtel, T., Fröhlich, A., Palmieri, M. C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L. S., Wanker, E. E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P., Durner, J. (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *TRENDS in Plant Science*, 11(11): 524-525.
- Zhang, X., Kim, W., Hatcher, N., Potgieter, K., Moroz, L. L., Gillette, R., Sweedler, J. V. (2002) Interfering with nitric oxide measurement. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(50): 48472-48478.