

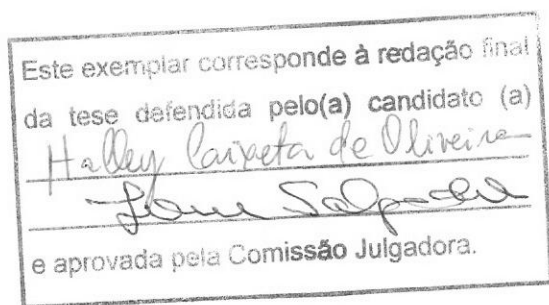
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



HALLEY CAIXETA DE OLIVEIRA

**“ESTUDO DA HOMEOSTASE DO RADICAL ÓXIDO NÍTRICO  
NA BIONERGÉTICA MITOCONDRIAL E NA RESPOSTA DE  
DEFESA VEGETAL AO ATAQUE DE PATÓGENOS”**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Doutor em Biologia Funcional e Molecular, na área de Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Campinas, 2010

**OL42e**

Oliveira, Halley Caixeta de  
Estudo da homeostase do radical óxido nítrico na bioenergética mitocondrial e na resposta de defesa vegetal ao ataque de patógenos / Halley Caixeta de Oliveira. – Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientadora: Ione Salgado.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Expressão gênica. 2. Fitopatologia. 3. Mitocôndria. 4. Nitrato redutases. 5. Óxido nítrico. I. Salgado, Ione. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

(rcdt/ib)

**Título em inglês:** Study of nitric oxide homeostasis in mitochondrial bioenergetics and in plant defense response to pathogen attack.

**Palavras-chave em inglês:** Gene expression; Phytopathology; Mitochondria; Nitrate reductases; Nitric oxide.

**Área de concentração:** Bioquímica.

**Titulação:** Doutor em Biologia Funcional e Molecular.

**Banca examinadora:** Ione Salgado, Ivan de Godoy Maia, Márcia Regina Braga, Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Paulo Mazzafera.

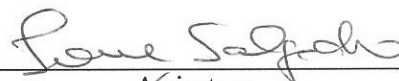
**Data da defesa:** 24/03/2010.

**Programa de Pós-Graduação:** Biologia Funcional e Molecular.

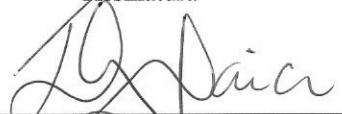
Campinas, 24 de março de 2010

**BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)

  
Assinatura

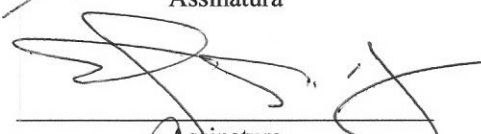
Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia

  
Assinatura

Profa. Dra. Marcia Regina Braga

  
Assinatura

Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira

  
Assinatura

Prof. Dr. Paulo Mazzafera

  
Assinatura

Profa. Dra. Eny Iochevet Segal Floh

Assinatura

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

“ Depois da forte subida, paramos diante da porteira que ficava lá no alto da serra. Eu nunca tinha andado além desse ponto. Tudo o que viria pela frente seria um mundo desconhecido. Talvez fosse árduo o trajeto. Contudo, eu vivenciaria novas emoções. Paisagens jamais visitadas. Descobertas. (...) Com os olhos bem abertos, parecia-me que tudo havia ficado mais claro. O terreno mais arenoso e macio. Ao longe, um ou outro buriti podia ser vislumbrado na vegetação menos densa. Tinha impressão inclusive de escutar o canto distante das araras. Sentindo uma indescritível emoção, fechei a porteira e subi novamente no cavalo. Daí, seguimos o caminho que nos levaria até a terra das águas mágicas. Ou até onde a minha imaginação permitisse.”

*O caminho para as veredas*

“Agora é a tua vez. Não esqueças: sonhar é expandir idéias.”

*Sonhando com Lígia*



**Dedico esta tese aos meus pais  
Reni e Imaculada. É graças a vocês  
que pude chegar onde estou hoje!**

## AGRADECIMENTOS

- Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me concedido saúde e por ter iluminado sempre o meu caminho.
- Aos meus pais **Reni e Imaculada**, por terem se esmerado pela minha formação não apenas profissional, mas também como ser humano.
- À **Julia**, por ter me mostrado, com o seu amor, que a realidade pode ser bem melhor que qualquer sonho maravilhoso. Muito obrigado por fazer parte da minha vida!
- À minha irmã **Lorena**, pelo imenso carinho e apoio dispensados ao longo desta caminhada.
- À minha avó **Mariza** e aos meus avós ausentes, **Arnaldo, João e Conceição**, por serem eternos exemplos de vida e de perseverança.
- A todos os meus tios, primos e demais familiares, cuja lista infindável me impede de citá-los individualmente. Muito obrigado pelo constante incentivo!
- À **Profa. Dra. Ione Salgado**, por ter acreditado em mim desde o início e por ter contribuído, com a sua dedicada orientação, para a minha formação como pesquisador e docente.
- À **Elzira** e à **Jusceley**, que, além de prestarem uma ajuda incondicional nos experimentos, se mostraram, sobretudo, como grandes amigas nesses sete anos de convívio no Laboratório de Bioquímica de Plantas.

- Às secretárias **Marina** e **Andréia**, pela constante disponibilidade.
- Ao **Pablo**, grande amigo, pelas conversas e momentos compartilhados no laboratório e fora dele, até mesmo nas distantes terras do velho continente. Estendo esses agradecimentos aos demais companheiros do laboratório, **Plínio**, **Lucas**, **Bolinha** e **Maria Angélica**.
- Aos amigos da graduação, em especial ao **Marcel**, pelo companheirismo e amizade, à **Kelly**, pelo nosso convívio também no laboratório, à **Dani**, pelas nossas conversas e pela sua disponibilidade em ajudar sempre, e a tantos outros que fizeram parte da melhor turma da história da Biologia na UNICAMP.
- Aos amigos mais recentes, em particular **Paula** e **Antonio**, afinal foi graças a vocês que conheci o amor da minha vida.
- Aos companheiros da saudosa república, **Marcel**, **Henrique**, **Dotô**, **Tiago**, **Jugs**, **Matuki**, **Eduardo**, **Cunha** e **Rafael**, pelos momentos divertidos que vivemos juntos.
- Ao **Prof. Dr. Ladaslav Sodek**, pela importante colaboração, e ao seu aluno **Gilberto**, pelo auxílio nas análises de aminoácidos.
- À **Profa. Dra. Ohara Augusto**, por ter cedido a solução saturada de NO, e à **Edlaine Linares**, por tê-la preparado.
- À **Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha**, por ter me iniciado na técnica da fluorimetria.

- À **Profa. Dra. Eneida de Paula** por ter disponibilizado o seu fluorímetro e aos membros do Laboratório de Biomembranas que me auxiliaram na utilização desse aparelho.
- Ao **Prof. Dr. Hiroshi Aoyama, Prof. Dr. Ladaslav Sodek, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Prof. Dr. Paulo Mazzafera e Prof. Dr. Michel Vincentz** por terem participado da minha qualificação.
- Aos membros da minha banca de defesa, **Prof. Dr. Ivan de Godoy Maia, Profa. Dra. Marcia Regina Braga, Profa. Dra. Eny Iochet Segal Floh, Prof. Dr. Gonçalo Amarante Guimarães Pereira, Prof. Dr. Paulo Mazzafera, Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha e Profa. Dra. Anete Pereira de Souza**, pela disponibilidade e interesse em contribuírem para o meu trabalho.
- Ao **Prof. Dr. Massimo Delledonne** pela oportunidade de fazer o estágio no seu laboratório.
- À **Profa. Dra. Diana Bellin**, por ter me apoiado em tudo o que estava ao seu alcance antes e durante a minha estadia na Itália, auxiliando-me na procura de moradia, na obtenção do visto, na realização de experimentos, na discussão de resultados e até no apoio moral durante as conversas com o Delledonne.
- Ao **Alberto Ferrarini, Noel e Paola**, pela ajuda nos experimentos com microarranjos de DNA.

- Ao **Jan**, pelo seu companheirismo e pelas inúmeras sugestões e discussões produtivas, além de ter tornado possível a fumigação das plantas com o óxido nítrico, tão importante para o meu trabalho.
- Aos demais companheiros de laboratório em Verona, **Raman, Ling, Barbara, Elodie, Frank e Enrico**, por terem me apoiado e ajudado durante os momentos difíceis no exterior.
- Em especial, agradeço à **FAPESP**, pelo apoio financeiro e por ter, inclusive, tornado possível a realização do estágio na Itália.
- A todos aqueles que, apesar de não terem sido citados, contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho.

## RESUMO

O controle da homeostase do óxido nítrico (NO), determinada pelo balanço entre os processos de síntese e degradação, é essencial para suas funções sinalizadoras. O presente estudo teve como objetivo geral buscar um melhor entendimento da homeostase do NO em plantas, enfocando a importância dessa molécula na bioenergética mitocondrial e na resposta de defesa vegetal ao ataque de patógenos. Inicialmente, foi realizada a caracterização de uma atividade de degradação de NO por mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, observando-se um consumo mitocondrial dependente de sua reação com o ânion superóxido, estimulado na presença de NAD(P)H. Ensaio com diferentes substratos e inibidores respiratórios evidenciaram as NAD(P)H desidrogenases externas, além do complexo III, como os principais sítios de geração de ânion superóxido para o consumo de NO. Por outro lado, numa análise comparativa com mitocôndrias isoladas de fígado de rato, uma atividade NAD(P)H oxidase mitocondrial não associada à cadeia respiratória foi detectada como uma fonte de superóxido, em adição ao vazamento de elétrons nos complexos I e III, para o consumo de NO. Em ambos os casos, a existência de mecanismos mitocondriais de degradação de NO mostrou-se importante para o controle de seus efeitos inibitórios sobre a atividade respiratória. Adicionalmente, a importância da síntese de NO para a defesa vegetal foi analisada utilizando-se como modelo a interação *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae*. Trabalhos anteriores já haviam demonstrado que o mutante de *A. thaliana* duplo-deficiente para a nitrato redutase (*nia1 nia2*) apresenta reduzida produção de NO e susceptibilidade à *P. syringae*, o que poderia resultar de sua prejudicada assimilação de nitrogênio. No presente estudo, plantas *nia1 nia2* foram cultivadas com glutamina ou arginina para aumentar os níveis foliares de aminoácidos. Entretanto, esse mutante continuou a desenvolver uma baixa emissão de NO e permaneceu susceptível à infecção bacteriana, indicando que a susceptibilidade não resulta do reduzido conteúdo de aminoácidos. Por outro lado, a fumigação com baixas concentrações do gás NO de plantas *nia1 nia2* com os níveis de aminoácidos recuperados restabeleceu a resposta de resistência. Coerentemente, uma análise do perfil transcriptômico utilizando microarranjos de DNA mostrou que o tratamento com NO induziu diversos genes

relacionados à defesa em folhas *nia1 nia2* infectadas, como aqueles relacionados às vias de sinalização do ácido salicílico e do cálcio, as proteínas relacionadas à patogênese, a reorganização da parede celular e a síntese de compostos com atividade antimicrobiana. Ainda, essa análise indicou novos genes como potenciais alvos do NO, sugerindo aspectos até então desconhecidos do papel dessa molécula sinalizadora na interação fitopatogênica e na fisiologia vegetal. Em especial, destacou-se o possível envolvimento do NO na alteração de transcritos relacionados à sinalização hormonal de forma a permitir um controle atenuador de mecanismos da resposta de defesa.

## ABSTRACT

The control of nitric oxide (NO) homeostasis, determined by a balance between the rate of synthesis and degradation, is essential for its signaling functions. The present study aimed a better understanding of NO homeostasis in plants, focusing on the importance of this molecule in mitochondrial bioenergetics and in plant defense response to pathogen attack. Initially, we carried out a characterization of an NO degradation activity by mitochondria isolated from potato tubers, observing a superoxide-dependent NO consumption, that was stimulated in the presence of NAD(P)H. Assays with different respiratory substrates and inhibitors evidenced the external NAD(P)H dehydrogenases, in addition to complex III, as the main sites of superoxide anion generation for NO consumption. On the other hand, in a comparative analysis with mitochondria isolated from rat liver, a mitochondrial NAD(P)H oxidase activity, non-associated to the respiratory chain, emerged as a superoxide source, in addition to the electron leakage from complexes I and III, for NO consumption. In both cases, the existence of mitochondrial mechanisms of NO degradation was important for the control of its inhibitory effects on respiratory activity. Additionally, the importance of NO synthesis for plant defense was analyzed using the interaction *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* as a model. Previous works have shown that the nitrate reductase double-deficient mutant of *A. thaliana* (*nia1 nia2*) presents reduced NO production and susceptibility to *P. syringae*, that could result from its impaired nitrogen assimilation. Here, *nia1 nia2* plants were cultivated with glutamine or arginine to increase the leaf amino acid content. Despite this, this mutant continued to develop a low NO emission and remained susceptible to bacterial infection, indicating that the susceptibility does not result from reduced amino acid levels. On the other hand, the fumigation of amino acid-recovered *nia1 nia2* plants with low concentrations of NO gas reestablished the resistance response. Accordingly, a transcriptomic analysis using DNA microarrays showed that NO treatment induced diverse defense-related genes in infected *nia1 nia2* leaves, as those associated to salicylic acid and calcium signaling pathways, pathogenesis-related proteins, cell wall reorganization and synthesis of antimicrobial compounds. Additionally, this analysis indicated new genes as potential targets of NO action, suggesting previously unknown



aspects about the role of this signaling molecule in phytopathogenic interactions. In special, we can highlight the possible involvement of NO in the modulation of transcripts related to hormonal signaling in order to allow an attenuating control of certain mechanisms of the defense response.

## SUMÁRIO

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| AGRADECIMENTOS .....             | vi    |
| RESUMO .....                     | x     |
| ABSTRACT .....                   | xii   |
| LISTA DE ABREVIATURAS .....      | xv    |
| LISTA DE FIGURAS .....           | xx    |
| LISTA DE TABELAS .....           | xxiii |
| INTRODUÇÃO .....                 | 1     |
| OBJETIVOS .....                  | 15    |
| CAPÍTULO 1 .....                 | 17    |
| CAPÍTULO 2 .....                 | 27    |
| CAPÍTULO 3 .....                 | 34    |
| CAPÍTULO 4 .....                 | 42    |
| CONCLUSÕES.....                  | 121   |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... | 124   |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**5PTase (“Inositol polyphosphate 5-phosphatase”):** inositol polifosfato 5-fosfatase

**A:** absorbância

**ABC (“ATP-binding cassette”):** cassete de ligação de ATP

**ACC:** 1-aminociclopropano-1-carboxilato

**ACD6 (“accelerated cell death 6”):** morte celular acelerada 6

**ADP (“adenosine diphosphate”):** adenosina difosfato

**AIA:** ácido indol 3-acético;

**AIA GT:** ácido indol 3-acético glicosiltransferase

**Ala (“alanine”):** alanina

**Ala(CN):** β-cianoalanina

**ANHB:** antranilato N-hidroxicinamoil/benzoiltransferase

**Anti-A (“antimycin-A”):** antimicina-A

**AntS:** antranilato sintase

**AOX (“alternative oxidase”):** oxidase alternativa

**ARD1:** aci-reductona dioxigenase 1

**Arg (“L-arginine”):** L-arginina

**aRNA:** RNA “antisense”

**Asn (“asparagine”):** asparagina

**Asp (“aspartate”):** aspartato

**ATP (“adenosine triphosphate”):** adenosina trifosfato

**avr (“avirulent”):** avirulenta

**bHLH (“basic helix-loop-helix”):** domínio básico hélice-laço-hélice

**BSA (“bovine serum albumine”):** albumina soro bovina

**Ca<sup>2+</sup> (“calcium”):** cálcio

**CAD (“cinnamyl-alcohol dehydrogenase”):** cinamil-álcool desidrogenase

**CaOMT (“caffeic acid 3-O-methyltransferase”):** ácido caféico 3-O-metiltransferase

**CCR (“cinnamoyl-CoA reductase”):** cinamoil-CoA redutase

**cDNA:** DNA complementar

**cfu (“colony-forming units”):** unidades formadoras de colônias

**CHS:** chalcona sintase

**Cit (“citrulline”):** citrulina

**Cit c:** citocromo c

**CIT GT:** citocinina glicosiltransferase;

**CLM (“calmodulin”):** calmodulina

**CNGC (“cyclic nucleotide gated-channel”):** canal modulado por nucleotídeos cíclicos

**COX (“cytochrome c oxidase”):** citocromo c oxidase

**cPTIO [“2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide”]:** 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

**DAF-2 (“4,5-diaminofluorescein”):** 4,5-diaminofluoresceína

**DNA:** ácido desoxirribonucléico

**EDS (“enhanced disease susceptibility”):** susceptibilidade aumentada a doenças

**EGTA [“ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N’,N’-tetraacetic acid”]:** ácido etileno glicol-bis(2-aminoetiléter)-N,N,N’,N’-tetraacético

**FAD:** flavina adenina dinucleotídeo

**FCCP (“carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone”):** carbonil cianeto 4-(trifluorometóxi)fenilhidrazona

**FMN:** flavina mononucleotídeo

**Gln (“glutamine”):** glutamina

**Glu (“glutamate”):** glutamato

**Gly (“glycine”):** glicina

**GMP (“guanosine monophosphate”):** guanosina monofosfato

**GS/GOGAT:** glutamina sintetase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase

**GSH:** glutatona reduzida;

**GSNO (“S-nitrosoglutathione”):** S-nitrosoglutatona

**GSNOR:** S-nitrosoglutatona redutase

**GSSG:** glutatona oxidada

**GTPase (“guanosine triphosphatase”):** guanosina trifosfatase

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (“hydrogen peroxide”):** peróxido de hidrogênio

**Hb:** hemoglobina não-simbiótica

**HEPES (“N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N’-(2-ethanesulfonic acid)”):** N-(2-hidroxietyl)piperazina-N’-(ácido 2-etanosulfônico)

**HPL:** hidroperóxido liase

**HR (“hypersensitive response”):** resposta hipersensitiva

**IAN:** indol acetonitrila

**IPase (“Inositol-phosphate phosphatase”):** inositol-fosfato fosfatase

**IPMK (“Inositol polyphosphate multikinase”):** inositol polifosfato multiquinase

**LOX:** lipoxigenase

**LRR (“leucine-rich receptor”):** receptor rico em leucina

**LTP (“lipid transfer protein”):** proteína transferidora de lipídios

**LURP (“late upregulated in response to *Hyaloperonospora parasitica*”):** tardiamente induzida em resposta a *Hyaloperonospora parasitica*

**mΔψ (“inner mitochondrial membrane electrical potential”):** potencial elétrico da membrana mitocondrial interna

**MAL (“malate”):** malato

**MIOX:** mio-inositol oxigenase

**MIPS1:** mio-inositol 1-fosfato sintase 1

**Myxo (“myxothiazol”):** mixotiazol

**NADH (“reduced nicotinamide adenine dinucleotide”):** nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

**NADPH (“reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate”):** nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

**NAM (“no-apical meristem”):** nenhum meristema apical

**NDex:** NADH desidrogenase externa

**NDin:** NADH desidrogenase interna

**NDPex:** NADPH desidrogenase externa

**NDPin:** NADPH desidrogenase interna,

**NI:NOR (“nitrite:nitric oxide reductase”):** nitrito:óxido nítrico redutase

**NIMIN (“NIM interacting protein”):** proteína que interage com NIM

**NiR:** nitrito redutase

**NIT:** nitrilase

**NO (“nitric oxide”):** óxido nítrico

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (“nitrite”):** nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (“nitrate”):** nitrato

**NOS (“nitric oxide synthase”):** óxido nítrico sintase

**NOX [“NAD(P)H oxidase”]:** NAD(P)H oxidase

**NPR (“non-expressor of pathogenesis-related genes”):** não expressa genes relacionados à patogênese

**NR (“nitrate reductase”):** nitrato redutase

**O<sub>2</sub> (“oxygen”):** oxigênio

**O<sub>2</sub><sup>-</sup> (“superoxide anion”):** aniôn superóxido

**ONOO<sup>-</sup> (“peroxynitrite”):** peroxinitrito

**PAE:** pectina acetiltransferase

**PAL (“phenylalanine ammonia lyase”):** fenilalanina amônia liase

**PL:** pectato liase;

**PLA (“phospholipase A”):** fosfolipase A

**PLC (“phospholipase C”):** fosfolipase C

**PME:** pectina metiltransferase

**PR (“pathogenesis-related protein”):** proteína relacionada à patogênese

**Psm:** *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*

**Pst:** *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

**PUMP (“plant uncoupling mitochondrial protein”):** proteína desacopladora mitocondrial de plantas

**RNA (“ribonucleic acid”):** ácido ribonucléico

**Rubisco:** Ribulose-1,5-bifosfato-carboxilase-oxidase

**SABP (“salicylic acid binding protein”):** proteína ligante de ácido salicílico

**SAM DC2:** S-adenosilmetionina decarboxilase 2

**Ser (“serine”):** serina

**SOD (“superoxide dismutase”):** superóxido dismutase

**SUCC (“succinate”):** succinato

**UQ:** ubiquinona

**UV (“ultraviolet”):** ultravioleta

**vir (“virulent”):** virulenta

**WT (“wild-type”):** tipo selvagem

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO

|                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Mecanismos de síntese e degradação do NO controlam a homeostase desse radical em vegetais .....                                              | 5  |
| <b>Figura 2.</b> Esquema representativo da cadeia respiratória vegetal .....                                                                                  | 9  |
| <b>Figura 3.</b> Representação do processo de assimilação do nitrogênio em vegetais e da importância da NR em prover os substratos para a síntese de NO ..... | 13 |

### CAPÍTULO 1

|                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> NO degradation and O <sub>2</sub> consumption by potato tuber mitochondria energized with different respiratory substrates .....                  | 19 |
| <b>Figure 2.</b> Effect of NO from a pure solution or from the donor GSNO on the mΔψ of energized potato tuber mitochondria .....                                  | 20 |
| <b>Figure 3.</b> The requirement for oxygen in NADH-dependent NO degradation by potato tuber mitochondria .....                                                    | 21 |
| <b>Figure 4.</b> Superoxide dismutase prevents NAD(P)H-dependent NO degradation by potato mitochondria .....                                                       | 21 |
| <b>Figure 5.</b> Effect of inhibitors of mitochondrial respiration on NO degradation by potato tuber mitochondria .....                                            | 21 |
| <b>Figure 6.</b> Ca <sup>2+</sup> -dependent NO degradation by potato tuber mitochondria .....                                                                     | 22 |
| <b>Figure 7.</b> Peroxide production by potato tuber mitochondria .....                                                                                            | 22 |
| <b>Figure S1.</b> Effect of NO released from GSNO on O <sub>2</sub> consumption by potato tuber mitochondria energized with different respiratory substrates ..... | 25 |



|                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure S2.</b> Kinetics of NO degradation by potato tuber mitochondria as a function of NAD(P)H concentration ..... | 26 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## CAPÍTULO 2

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> NO degradation by isolated rat liver mitochondria .....                                                   | 29 |
| <b>Figure 2.</b> NO degradation and oxygen consumption by rat liver mitochondria .....                                     | 30 |
| <b>Figure 3.</b> Effect of treatment of rat liver mitochondria with proteinase K on NO degradation .....                   | 30 |
| <b>Figure 4.</b> Effect of purification of isolated rat liver mitochondria with a Percoll gradient on NO degradation ..... | 31 |
| <b>Figure 5.</b> Peroxide production by rat liver mitochondria .....                                                       | 31 |
| <b>Figure S1.</b> NO degradation and oxygen consumption by rat liver mitochondria using GSNO as NO donor .....             | 33 |

## CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 1.</b> Effects of glutamine (Gln) or arginine (Arg) treatment on free amino acid content and phenotypic aspect of NR double-deficient <i>A. thaliana</i> plants .....                        | 37 |
| <b>Figure 2.</b> Effect of amino acid treatments on hypersensitive response induced by the bacteria <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (Psm) in <i>nia1 nia2 A. thaliana</i> leaves ... | 38 |
| <b>Figure 3.</b> Effect of amino acid treatments on disease evolution in <i>nia1 nia2 A. thaliana</i> leaves infiltrated with Psm .....                                                                | 39 |
| <b>Figure 4.</b> Effect of amino acid treatments on bacterial growth in <i>nia1 nia2 A. thaliana</i> .....                                                                                             | 40 |

|                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figure 5.</b> Effect of amino acid treatments and Psm inoculation on NO emission by <i>A. thaliana</i> ..... | 40 |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## CAPÍTULO 4

|                                                                                                                                                                                     |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Efeito da fumigação com NO nos sintomas macroscópicos e no crescimento de Pst em folhas de plantas <i>nia1 nia2</i> cultivadas com glutamina .....                 | 78 |
| <b>Figura 2.</b> Efeito da fumigação com NO no crescimento de suspensões de Pst .....                                                                                               | 79 |
| <b>Figura 3.</b> Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos em folhas <i>nia1 nia2</i> após a fumigação com NO .....                                              | 80 |
| <b>Figura 4.</b> Esquema das vias de sinalização de defesa moduladas transcriptomicamente pelo NO .....                                                                             | 81 |
| <b>Figura 5.</b> Esquema das proteínas de reorganização da parede celular e do metabolismo de lipídios moduladas transcriptomicamente pelo NO .....                                 | 82 |
| <b>Figura 6.</b> Esquema das proteínas da síntese de ácido jasmônico e outras oxilipinas moduladas transcriptomicamente pelo NO .....                                               | 83 |
| <b>Figura 7.</b> Esquema das proteínas da síntese e da via de sinalização das auxinas e citocininas moduladas transcriptomicamente pelo NO .....                                    | 84 |
| <b>Figura 8.</b> Esquema das proteínas da síntese de etileno e da via de salvamento da metionina moduladas transcriptomicamente pelo NO .....                                       | 85 |
| <b>Figura 9.</b> Esquema representativo do papel de NIMIN-1 e, possivelmente, de NIMIN-2 na atenuação da expressão de genes de defesa induzida por ácido salicílico via NPR-1 ..... | 86 |
| <b>Figura 10.</b> Esquema das proteínas da via do mio-inositol moduladas transcriptomicamente pelo NO .....                                                                         | 87 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela I.</b> Lista de genes relacionados à defesa cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> , previamente cultivadas com glutamina (5 mM) e infectadas com $5 \times 10^6$ cfu.mL <sup>-1</sup> de Pst, foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com $15 \pm 5$ ppm de gás NO ..... | 88 |
| <b>Tabela II.</b> Lista de genes relacionados à reorganização da parede celular cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                                                              | 90 |
| <b>Tabela III.</b> Lista de genes relacionados ao metabolismo e à sinalização de compostos lipídicos cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                                         | 92 |
| <b>Tabela IV.</b> Lista de genes relacionados à homeostase e à sinalização de hormônios vegetais cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                                             | 93 |
| <b>Tabela V.</b> Lista de genes relacionados à homeostase redox e à proteção contra o estresse oxidativo cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                                     | 95 |
| <b>Tabela VI.</b> Lista de genes relacionados à fotossíntese, bioenergética mitocondrial e outros processos do metabolismo de açúcares cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                       | 96 |
| <b>Tabela VII.</b> Lista de outros genes relacionados à transdução de sinal cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                                                                  | 98 |

|                                                                                                                                                                                                                                                      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Tabela VIII.</b> Lista de outros genes relacionados à regulação da transcrição cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                           | 100 |
| <b>Tabela IX.</b> Lista de genes relacionados ao catabolismo e à modificação conformacional de proteínas cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                    | 102 |
| <b>Tabela X.</b> Lista de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                  | 104 |
| <b>Tabela XI.</b> Lista de genes relacionados ao metabolismo de ácidos nucléicos, à síntese protéica e ao ciclo celular cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....     | 106 |
| <b>Tabela XII.</b> Lista de genes relacionados ao metabolismo de flavonóides e antocianinas e a outras glicosiltransferases cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO ..... | 108 |
| <b>Tabela XIII.</b> Lista de genes relacionados ao transporte de substâncias cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                | 109 |
| <b>Tabela XIV.</b> Lista de outros genes relacionados a funções diversas cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                                                    | 111 |
| <b>Tabela XV.</b> Lista de genes relacionados a proteínas desconhecidas ou de função não determinada cuja expressão em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO .....                        | 114 |

# **INTRODUÇÃO**

### *As múltiplas funções do radical óxido nítrico como uma molécula sinalizadora*

O óxido nítrico (NO) é uma importante molécula sinalizadora em vários sistemas biológicos. Desde sua identificação como o fator derivado do endotélio responsável pelo relaxamento de vasos sanguíneos de mamíferos (Ignarro et al., 1987; Palmer et al., 1987), o envolvimento do NO em inúmeros processos metabólicos e fisiológicos em células animais tem sido demonstrado, incluindo a contração muscular, a agregação de plaquetas, a atividade neuronal e a resposta imune (revisado por Gao, 2010). Ainda, uma produção não controlada de NO está relacionada a uma série de situações patológicas, tais quais doenças neurodegenerativas, diabetes, hipertensão e outras doenças cardiovasculares (Aliyev et al., 2004; Napoli e Ignarro, 2009).

A capacidade de os vegetais produzirem NO foi inicialmente observada em plantas de soja tratadas com herbicidas (Klepper, 1979). Entretanto, somente alguns anos após a descoberta de suas amplas atividades biológicas em mamíferos, estudos foram realizados no sentido de se verificar a atuação do NO como uma molécula sinalizadora em plantas. De fato, foi demonstrado que o NO participa de vários processos da fisiologia vegetal, incluindo a germinação de sementes, o crescimento de raízes, a expansão foliar, o movimento estomático, a floração, o crescimento do tubo polínico e a senescência (revisado por Lamattina et al., 2003; del Rio et al., 2004; Wilson et al., 2008). Além de seu envolvimento em vias de transdução de sinal relacionadas ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal, o NO está envolvido na resposta das plantas a estresses bióticos e abióticos (revisado por Mur et al., 2006; Qiao e Fan, 2008). Por exemplo, a resposta a estresses mecânicos (Huang et al., 2004), a proteção contra a radiação ultravioleta (Shi et al., 2005), a aclimação ao frio (Zhao et al., 2009) e a defesa ao ataque de patógenos (Delledonne et al., 1998) são influenciadas por esse radical.

As amplas ações do NO em sistemas biológicos são decorrentes de suas propriedades físico-químicas, que as fazem uma das moléculas sinalizadoras mais versáteis. O NO é um radical livre gasoso sem carga elétrica, com uma meia-vida relativamente longa (aproximadamente 5 s) se comparada à de outros radicais (Stamler et al., 1992). Como uma das menores moléculas diatômicas, ele é altamente difusível e capaz de migrar facilmente

por compartimentos hidrofóbicos e hidrofílicos das células como as membranas e o citossol (Stamler et al., 1992).

Muitas das funções do NO nas células são resultantes de modificações pós-translacionais de proteínas causadas por esse radical ou por compostos dele derivados (revisado por Leitner et al., 2009). Uma das principais reações do NO consiste na formação de complexos nitrosil com metais de transição em moléculas alvo (Cooper, 1999). Essa interação com o ferro hêmico ou com o ferro em proteínas Fe-S representa um dos primeiros mecanismos de ação do NO caracterizado nas células vegetais, regulando a atividade de enzimas como aconitase e citocromo P450 (Enkhhardt e Pommer, 2000; Navarre et al., 2000). O NO pode causar também a *S*-nitrosilação de proteínas ou de compostos de baixo peso molecular pela sua reação com grupamentos –SH em resíduos de cisteína, o que vem sendo considerado um mecanismo essencial na via de transdução de sinal mediada por NO em células animais (Hess et al., 2005). Em vegetais, diversos polipeptídeos foram detectados como alvos de *S*-nitrosilação, tendo sua função biológica modulada por esse processo (Lindermayr et al., 2005; Romero-Puertas et al., 2007). Ainda, o NO pode alterar indiretamente a atividade protéica através da nitração de resíduos de tirosina, por meio da ação de seu derivado NO<sub>2</sub> ou do peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), formado pela reação não enzimática do NO com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), sendo que este último mecanismo de nitração protéica já foi descrito em plantas (Cecconi et al., 2009).

Ao provocar modificações pós-translacionais de proteínas, o NO pode controlar os níveis de mensageiros secundários em células vegetais. De forma análoga ao observado em mamíferos, plantas apresentam um acúmulo de GMP cíclico em resposta ao NO (Durner et al., 1998), apesar de que uma enzima guanilato ciclase sensível ao NO não tenha ainda sido encontrada em vegetais (Leitner et al., 2009). Além disso, vários estudos tem verificado o envolvimento do cálcio na via de sinalização dependente de NO, já que esse radical é capaz de modular canais protéicos, controlando as concentrações intracelulares desse importante cátion sinalizador (revisado por Courtois et al., 2008). Por sua vez, o aumento dos níveis de cálcio está relacionado a um estímulo da síntese de NO em diversas situações (Courtois et al., 2008)

A participação do NO como intermediário ou efector na via de transdução de sinal de diversos hormônios vegetais também tem sido verificada (revisado por Lamattina et al., 2003). Num trabalho pioneiro, Gouvêa e colaboradores (1997) propuseram a participação do NO na via de sinalização da auxina durante a indução do crescimento de segmentos de raízes de milho. O NO também foi demonstrado como um intermediário no fechamento estomático induzido por ácido abscísico (Desikan et al., 2002) e na respostas às citocininas (Tun et al., 2008). Por outro lado, o NO parece ter um efeito negativo sobre a via de sinalização do etileno, inibindo a síntese desse hormônio durante a maturação do fruto (Leshem et al., 1998).

A ação sinalizadora do NO em plantas envolve em muitos casos o controle da expressão gênica (revisado por Grun et al., 2006). Conforme demonstrado por análises transcriptômicas em larga escala, o NO é capaz de modular a expressão de genes relacionados a vários processos como a transdução de sinal, a resposta a estresses, o transporte celular e o metabolismo básico (Parani et al., 2004; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008).

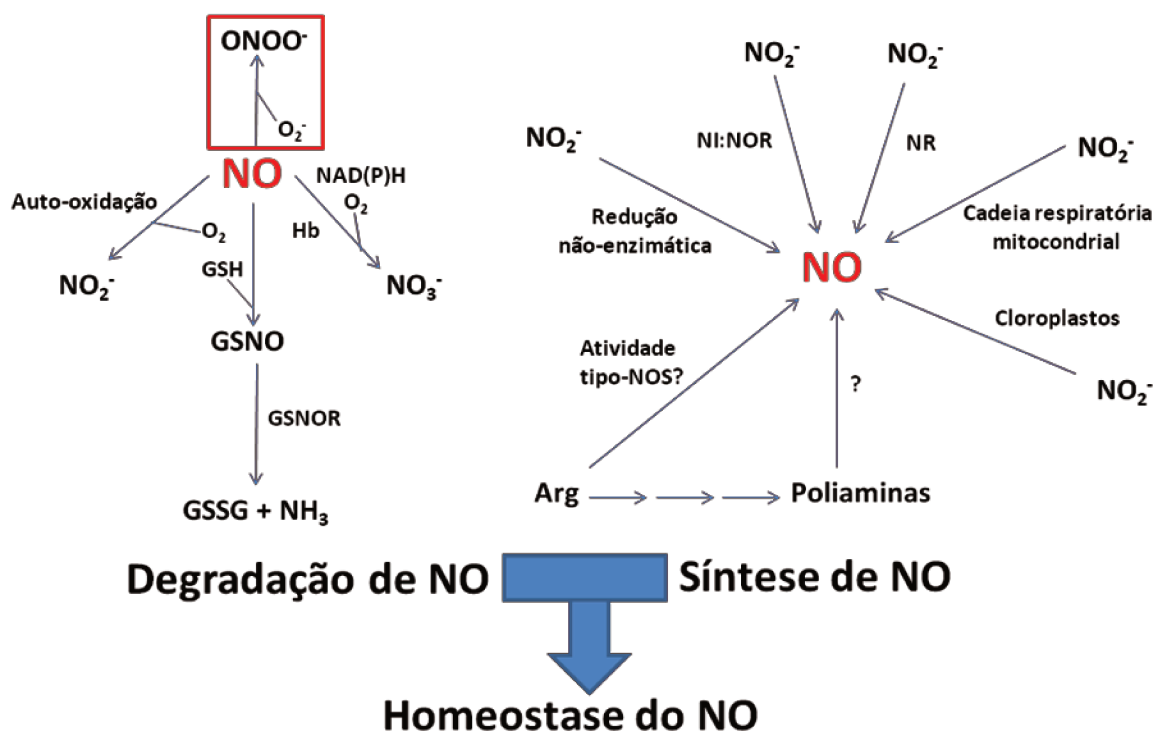
Essa incrível habilidade do NO em interagir de diferentes maneiras com alvos distintos na célula pode explicar os papéis múltiplos desse radical em sistemas biológicos. Por essa razão, o interesse no estudo do NO como uma molécula sinalizadora em plantas tem aumentado exponencialmente nos últimos anos, trazendo novos horizontes a diversos aspectos da (pato)fisiologia e do metabolismo vegetal.

### ***A importância dos mecanismos de degradação do NO: a dupla face dessa molécula na bioenergética mitocondrial***

Apesar de exercer vários efeitos benéficos para os sistemas biológicos, o NO pode, em certas condições, ser tóxico às células, levando por exemplo à morte celular apoptótica ou necrótica (Murphy, 1999). Assim, para que esse radical exerça suas funções sinalizadoras, é essencial o controle de sua homeostase, permitindo a obtenção de suas concentrações em níveis adequados para diferentes situações fisiológicas ou de estresse. Os níveis endógenos do NO são determinados pelo balanço entre as taxas de síntese e



degradação desse radical (Figura 1). Apesar de as vias de síntese do NO serem extensivamente estudadas (Salgado et al., 2006; Moreau et al., 2010), menos estudos tem abordado os mecanismos pelos quais o NO é degradado nas células vegetais.



**Figura 1.** Mecanismos de síntese e degradação do NO controlam a homeostase desse radical em vegetais. Estão representados apenas mecanismos já descritos em plantas. Apesar de a reação não-enzimática do NO com o O<sub>2</sub><sup>-</sup> ser bem conhecida (destacada com um retângulo vermelho), ela foi caracterizada como um mecanismo de degradação de NO em mitocôndrias vegetais apenas no presente trabalho. Abreviaturas: Arg, L-arginina; GSH, glutathiona reduzida; GSSG, glutathiona oxidada; GSNO, S-nitrosoglutathiona; GSNOR, S-nitrosoglutathiona redutase; Hb, hemoglobina não-simbiótica; NI:NOR, nitrito:NO redutase; NOS, NO sintase; NR, nitrato redutase.

Em soluções aquosas aeróbicas, o decaimento de NO dá-se pela sua auto-oxidação a nitrito (Figura 1; Kharitonov et al., 1994). Entretanto, essa reação não é rápida o suficiente para explicar a meia-vida extremamente curta do NO em sistemas biológicos, indicando a existência de mecanismos adicionais para sua degradação (Coffey et al., 2001). De fato, diversos organismos possuem formas de inativar o NO. Alguns mecanismos enzimáticos para a conversão de NO a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) foram identificados em animais, incluindo reações que envolvem lipooxigenases (Coffey et al., 2001), prostaglandina H sintase (O'Donnell et al., 2000), peroxidases (Abu-Soud e Hazen, 2000) e catalase (Brunelli et al., 2001). Além disso, uma atividade heme-dependente de conversão de NO a nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), similar à NO dioxigenase descrita em *Escherichia coli*, foi observada em células de mamíferos (Gardner et al., 2001).

Um número menor de mecanismos de degradação de NO já foi verificado em células vegetais (Figura 1). Culturas de células de alfafa expressando a hemoglobina de cevada apresentaram uma atividade semelhante à NO dioxigenase, com a hemoglobina agindo juntamente com uma flavoproteína para metabolizar NO a  $\text{NO}_3^-$ , num processo dependente de oxigênio e NAD(P)H (Igamberdiev et al., 2004). Em outro trabalho, a hemoglobina não-simbiótica AHb1 de *Arabidopsis thaliana* apresentou uma atividade semelhante (Perazzolli et al., 2004). Dessa forma, tem sido proposto um papel das hemoglobinas não-simbióticas de plantas na proteção contra o NO, especialmente em situações de hipóxia (Igamberdiev et al., 2005). O NO pode reagir também com a glutatona reduzida, formando S-nitrosoglutatona (GSNO), um composto que pode funcionar como um reservatório natural de NO ou como um agente transnitrosilador (Rustérucci et al., 2007). Dessa forma, a atividade da enzima GSNO redutase, que catalisa a quebra de GSNO a glutatona oxidada e amônia, vem sendo considerada um outro mecanismo de manutenção da homeostase do NO em plantas (Leitner et al., 2009).

As mitocôndrias são um importante sítio de ação do NO, representando um bom exemplo da dupla face desse radical e da importância da existência de mecanismos que levam a sua degradação. O NO se liga, em concentrações nanomolares, à citocromo c oxidase (COX ou complexo IV), resultando numa inibição reversível do consumo de oxigênio (Cleeter et al., 1994). Esse efeito inibitório competitivo sobre a COX é considerado um mecanismo fisiológico de regulação da respiração mitocondrial pelo NO, já

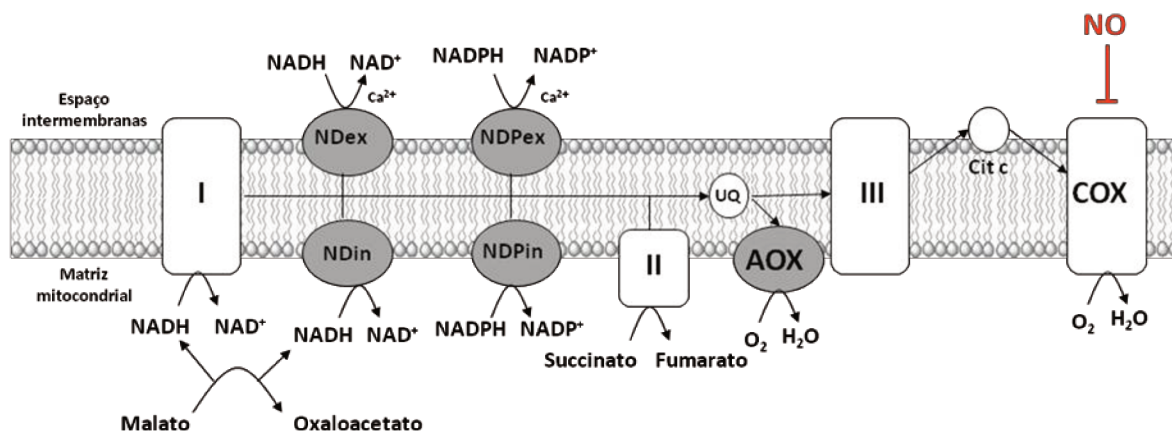
que ele permite um aumento da disponibilidade de oxigênio para células distantes dos vasos sanguíneos (Cooper e Giulivi, 2007). Entretanto, a exposição prolongada ao NO pode inibir persistentemente a atividade respiratória devido à S-nitrosilação de componentes da cadeia respiratória, como o complexo I (Clementi et al., 1998; Brown e Borutaite, 2004), estando associada ao desenvolvimento de condições patológicas (Moncada e Bolaños, 2006). Diante de seu efeito dual sobre a bioenergética mitocondrial, fica evidente que mecanismos que levem ao controle dos níveis de NO nessa organela seriam essenciais ao controle da sinalização e da toxicidade desse radical.

A oxidação enzimática do NO a  $\text{NO}_2^-$  por ação da COX de origem animal foi proposta, ao menos *in vitro*, como um processo mitocondrial de degradação de NO (Torres et al., 2000). Todavia, a rápida reação não-enzimática do NO com o  $\text{O}_2^-$  tem sido considerada o principal mecanismo de consumo de NO por mitocôndrias de mamíferos (Poderoso et al., 1996, 1999; Chen et al., 2006). Quando a respiração mitocondrial é inibida pelo NO, esse mecanismo contribui para a degradação de NO no meio, reativando a COX e permitindo a recuperação do consumo de oxigênio (Poderoso, 2009). O vazamento de elétrons no complexo III foi demonstrado como um importante sítio de geração de  $\text{O}_2^-$  para a degradação de NO pela cadeia respiratória de mamíferos (Poderoso et al., 1999; Chen et al., 2006). Apesar disso, outras enzimas mitocondriais foram documentadas como capazes de produzir  $\text{O}_2^-$  em animais, como o complexo I, a succinato desidrogenase e a citocromo *b5* redutase (Andrejev et al., 2005). Dessa forma, a degradação de NO dependente de  $\text{O}_2^-$  pelas mitocôndrias de mamíferos ainda necessita ser melhor caracterizada.

As mitocôndrias vegetais também constituem importantes alvos da ação do NO (Blokina e Fagerstedt, 2010). Vários estudos demonstraram que o NO inibe a COX de plantas de uma forma semelhante à de mamíferos (Millar e Day, 1996; Yamasaki et al., 2001; Zottini et al., 2002), representando um mecanismo para evitar o estabelecimento da anóxia em tecidos submetidos à deficiência de oxigênio (Borisjuk e Rolletschek, 2009). Apesar dessa função fisiológica, o tratamento prolongado com doadores de NO causa a morte celular por afetar as funções normais das mitocôndrias de *Citrus sinensis* e cenoura (Saviani et al., 2002; Zottini et al., 2002), sugerindo que, em certas condições, o NO pode exercer efeitos deletérios também em mitocôndrias vegetais.

Os componentes respiratórios das mitocôndrias vegetais são muito semelhantes aos de outras mitocôndrias eucarióticas, apresentando os quatro complexos protéicos presentes na cadeia respiratória de mamíferos. Entretanto, a membrana interna das mitocôndrias vegetais também apresenta vias alternativas para o transporte de elétrons (Figura 2). Essas vias incluem a oxidase alternativa, que desvia o fluxo de elétrons dos complexos III e IV (Millenaar e Lambers, 2003), e ao menos quatro NAD(P)H desidrogenases que desviam o fluxo de elétrons do complexo I (Rasmusson et al., 2004). Duas dessas desidrogenases estão voltadas para o espaço intermembranas e apresentam propriedades distintas, oxidando separadamente NADH e NADPH citossólicos. No lado interno, as outras duas desidrogenases oxidam separadamente o NADH e NADPH gerados na matriz (Rasmusson et al., 2004). O transporte de elétrons por essas enzimas alternativas não é acoplado à translocação de prótons, de forma que a energia é dissipada na forma de calor, não sendo conservada para a síntese de ATP. Variações nos níveis de expressão dessas desidrogenases em diferentes tecidos, assim como durante o desenvolvimento e a exposição de diversos tipos de estresses, sugerem que essas enzimas possuem importantes funções nas células vegetais (Rasmusson et al., 2004).

Não obstante a singularidade das mitocôndrias vegetais e a importância da regulação de sua atividade respiratória pelo NO, a habilidade de essas organelas degradarem o NO não havia ainda sido investigada. Assim, considerou-se relevante neste trabalho analisar o envolvimento de proteínas alternativas da cadeia respiratória vegetal, como as NAD(P)H desidrogenases externas, na degradação de NO, comparando-se com o processo observado em mitocôndrias de mamíferos.



**Figura 2.** Esquema representativo da cadeia respiratória vegetal. As proteínas destacadas em cinza não são encontradas em mitocôndrias de mamíferos. A ação inibitória do NO sobre a COX também está representada. Abreviaturas: AOX, oxidase alternativa; Cit c, citocromo c; COX, citocromo c oxidase; NDex, NADH desidrogenase externa; NDPex, NADPH desidrogenase externa; NDin, NADH desidrogenase interna; NDPin, NADPH desidrogenase interna, UQ, ubiquinona.

### *Mecanismos de síntese do NO e a importância dessa molécula na resposta de defesa vegetal*

Além dos mecanismos de degradação, os processos de síntese do NO são determinantes para o controle da homeostase desse radical (Figura 1). De fato, em certas situações, é necessário que haja um estímulo de mecanismos que levem à produção de NO, propiciando um aumento dos níveis endógenos dessa molécula. Isso ocorre, por exemplo, durante a resposta de defesa vegetal ao ataque de diversos tipos de patógenos. Num trabalho pioneiro, Delledonne e colaboradores (1998) verificaram a indução da produção de NO por células de soja em resposta à inoculação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. Além disso, a aplicação de inibidores da síntese de NO prejudicou o estabelecimento da resposta de resistência de folhas de *A. thaliana* a uma linhagem avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) (Delledonne et al., 1998). Desde então, vários estudos demonstraram que a produção de NO pelas plantas aumenta durante diferentes interações fitopatogênicas e em resposta a inúmeros eliciadores

microbianos (revisado por Romero-Puertas et al., 2004). Ainda, outros trabalhos observaram que a redução dos níveis de NO *in planta*, obtida por diversas estratégias, leva a uma resposta de defesa deficiente (Zeidler et al., 2004; Zeier et al., 2004; Boccara et al., 2005; Modolo et al., 2006).

Esses trabalhos sugeriram o envolvimento do NO nas vias de sinalização da resistência vegetal ao ataque patogênico. De fato, foi demonstrado que o NO participa, juntamente com espécies reativas de oxigênio, do desenvolvimento da resposta hipersensitiva, que consiste na morte celular localizada, desenvolvida no tecido vegetal para prevenir a proliferação do patógeno a partir do sítio de infecção (Delledonne et al., 2001). A resposta hipersensitiva é induzida durante interações incompatíveis, em que o patógeno expressa o gene de avirulência, cujo produto é reconhecido pela planta que possui o gene *R* de resistência correspondente (Dangl e Jones, 2001). Ainda, o NO está envolvido no estabelecimento da resposta imune inata em plantas, induzida por padrões moleculares associados a patógenos, incluindo lipopolissacarídeos (Zeidler et al., 2004).

O NO pode atuar também regulando a expressão de diversos genes envolvidos na resposta de resistência vegetal contra patógenos, como os codificantes para proteínas relacionadas à patogênese (PRs), para componentes de vias de sinalização de defesa e para proteínas de proteção contra o estresse oxidativo (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Zeier et al., 2004; Parani et al., 2004; Ferrarini et al., 2008). Dentre os genes induzidos pelo NO, encontram-se aqueles que codificam isoformas da fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS), enzimas chave da via dos fenilpropanóides (Delledonne et al., 1998; Zeier et al., 2004). Dessa forma, o NO ativa vias de produção de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular, denominados fitoalexinas, os quais podem ter um papel na resistência de plantas ao ataque microbiano (Hammerschmidt, 1999). Trabalhos com tubérculos de batata (Noritake et al., 1996), cotilédones de soja (Modolo et al., 2002) e plantas de trigo (Guo et al., 2004) tem dado suporte à importância do NO como mediador da produção de metabólitos secundários na resposta de defesa.

Adicionalmente, a ativação da PAL pelo NO está relacionada a um estímulo da síntese de ácido salicílico, já que esse composto é derivado de um intermediário da via dos fenilpropanóides (Durner et al., 1998; Zeier et al., 2004). Além de atuar em respostas locais

induzindo o “burst” oxidativo, a morte celular e a expressão de genes de defesa (Mur et al., 2000), o ácido salicílico participa do estabelecimento da resposta sistêmica adquirida, um mecanismo de defesa induzida que confere proteção prolongada em toda a planta contra diversos tipos de patógenos (Durrant e Dong, 2004). De fato, a aplicação local de doadores de NO leva ao estabelecimento de uma resposta sistêmica ao vírus do mosaico do tabaco dependente de ácido salicílico (Song e Goodman, 2001). Adicionalmente, compostos derivados do NO, como a GSNO, tem sido sugeridos como possíveis sinais móveis, produzidos por células infectadas, que induziriam a resposta sistêmica em tecidos sadios (Rustérucci et al., 2007).

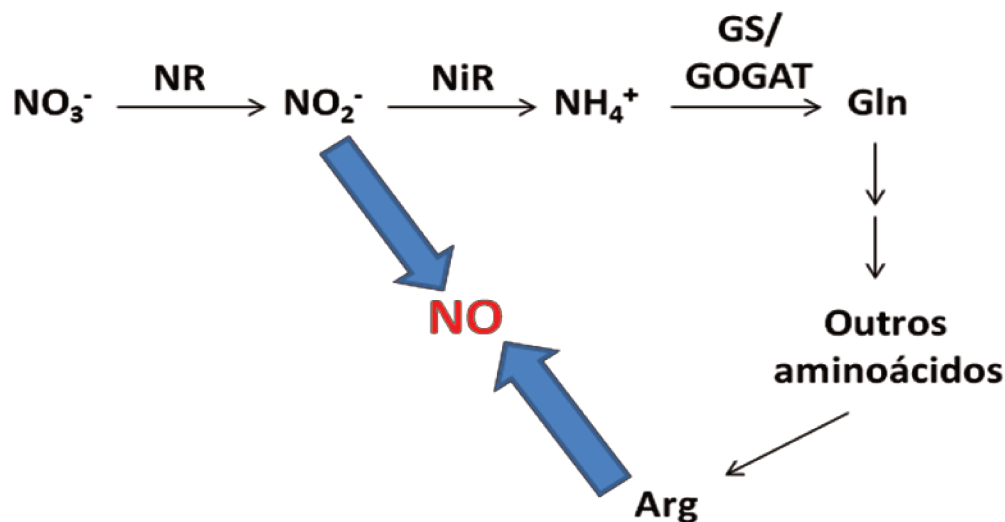
Apesar dessas evidências a respeito da importância do NO como uma molécula sinalizadora na resposta de defesa vegetal, os mecanismos moleculares responsáveis por sua síntese durante a interação fitopatogênica ainda não estão completamente esclarecidos (revisado por Salgado et al., 2006). Em mamíferos, está bem estabelecido que a família de enzimas NO sintases (NOSs) é um importante sistema responsável pela síntese de NO (Stuehr, 1997). As NOSs catalisam a formação de NO e L-citrulina a partir da oxidação do aminoácido L-arginina (Arg), numa reação dependente de oxigênio, NADPH, heme, tetrahydrobiopterina, calmodulina, FAD e FMN (Stuehr, 1997). Vários tecidos vegetais apresentam uma produção de NO sensível a inibidores das NOSs de mamíferos ou uma atividade de formação de L-citrulina a partir de Arg, estimulada pelo ataque patogênico (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Modolo et al., 2002; revisado por del Rio et al., 2004). Todavia, um gene com homologia às NOSs de origem animal não foi encontrado em plantas (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Ainda, a proteína AtNOA1, inicialmente considerada uma enzima do tipo NOS em *Arabidopsis thaliana* (Guo et al., 2003), foi posteriormente identificada como uma GTPase relacionada ao metabolismo ribossomal, deixando ainda controversa a síntese de NO a partir de Arg em vegetais (Moreau et al., 2008). Recentemente, a oxidação de poliaminas foi sugerida como uma potencial via de produção de NO em plantas (Tun et al., 2006). Dessa forma, é possível que a Arg, como um precursor biossintético das poliaminas, estimule a produção de NO indiretamente (Figura 1; Flores et al., 2008).

Além da Arg, o  $\text{NO}_2^-$  tem sido considerado uma importante fonte de NO em vegetais (Figura 1). Diversos mecanismos de síntese de NO a partir de  $\text{NO}_2^-$  tem sido propostos, incluindo processos não enzimáticos tais quais sua redução nas condições ácidas do apoplasto (Bethke et al., 2004) ou na presença de compostos redutores como ácido ascórbico ou fenóis (Yamasaki et al., 1999). Dentre os mecanismos enzimáticos, foram propostas uma atividade nitrito:NO redutase (NI:NOR) presente na membrana plasmática de raízes de tabaco (Stohr et al., 2001) e a atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$  da nitrato redutase (NR) (Yamasaki e Sakihama, 2000). A NR catalisa a redução dependente de NAD(P)H do  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$ , o qual é posteriormente reduzido a amônio pela nitrito redutase (Figura 3). O amônio por sua vez é posteriormente incorporado em aminoácidos pelo sistema enzimático glutamina sintetase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase (Figura 3). Dessa forma, a NR é uma proteína essencial para a assimilação de nitrogênio nas plantas (Lea, 1993). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a NR pode também produzir NO e  $\text{N}_2\text{O}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$ , resultando na emissão de NO (Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002). Resultados sugerem a participação da NR na síntese de NO durante o fechamento estomático de *A. thaliana* (Desikan et al., 2002), a germinação de sementes de sorgo (Simontacchi et al., 2004) e a resposta ao estresse de frio em *A. thaliana* (Zhao et al., 2009), bem como após os tratamentos com eliciadores microbianos em *Nicotiana benthamiana* (Yamamoto-Katou et al., 2006), com auxina em raízes de *A. thaliana* (Kolbert et al., 2008) e com toxinas de *Verticillium dahliae* também em *A. thaliana* (Shi e Li, 2008).

Contudo, em um estudo de nosso grupo, uma atividade mitocondrial redutora de  $\text{NO}_2^-$ , independente da NR, foi identificada como uma importante fonte de NO em *A. thaliana* em resposta à inoculação com a bactéria Psm (Modolo et al., 2005). Essa atividade foi também observada na alga *Chlorella sorokiniana* (Tischner et al., 2004), em células em suspensão de tabaco (Planchet et al., 2005), em mitocôndrias isoladas de várias espécies vegetais (Gupta et al., 2005) e em células de origem animal e de leveduras (Kozlov et al., 1999; Castello et al., 2006), sugerindo que esse pode ser um mecanismo comum dos organismos vivos para a produção de NO independente de Arg. Além da cadeia respiratória mitocondrial, a redução do  $\text{NO}_2^-$  a NO por transportadores de elétrons dos cloroplastos foi reportada (Jasid et al., 2006).



Plantas de *A. thaliana* do genótipo mutante *nia1 nia2*, deficientes para os genes estruturais *NIA1* e *NIA2* da NR, apresentam uma produção reduzida de NO em resposta à inoculação com Psm (Modolo et al., 2005). Todavia, quando  $\text{NO}_2^-$  é infiltrado em folhas *nia1 nia2*, a produção de NO é recuperada, indicando que a inabilidade de plantas deficientes para a NR em sintetizar o NO pode ser decorrente de seu baixo conteúdo endógeno de  $\text{NO}_2^-$  (Modolo et al., 2005; 2006). Além disso, o mutante *nia1 nia2* apresenta níveis reduzidos de aminoácidos em suas folhas, inclusive Arg, como consequência de sua deficiente assimilação de nitrogênio (Modolo et al., 2006). Dessa forma, a reduzida produção de NO pelo mutante *nia1 nia2* poderia resultar também de seu baixo conteúdo de Arg (Modolo et al., 2006), sugerindo um importante papel da NR em prover os dois substratos principais para a geração de NO em plantas (Figura 3; Salgado et al., 2006).



**Figura 3.** Representação do processo de assimilação do nitrogênio em vegetais e da importância da NR em prover os substratos para a síntese de NO. Abreviaturas: Arg, L-arginina; Gln, glutamina; GS/GOGAT, sistema enzimático glutamina sintetase-glutamina-2-oxoglutarato transaminase; NR, nitrato redutase; NiR, nitrito redutase.

Interessantemente, a inoculação da bactéria Psm causa uma severa clorose em folhas do mutante *nia1 nia2*, enquanto que a resposta hipersensitiva é induzida nas plantas selvagens (Modolo et al., 2006). Essa observação indicou que a resposta de defesa ao ataque de patógenos é comprometida no mutante *nia1 nia2*, o que poderia estar relacionado a sua produção deficiente de NO (Modolo et al., 2006). Todavia, os baixos níveis de aminoácidos e outras alterações metabólicas pleiotrópicas decorrentes da deficiente assimilação de nitrogênio do mutante *nia1 nia2* poderia afetar a resposta de defesa, independente da produção de NO. Dessa forma, considerou-se essencial analisar se tratamentos que promovessem a incorporação do nitrogênio e recuperassem o conteúdo de aminoácidos de *nia1 nia2* teriam efeito na resposta de defesa prejudicada desse mutante. Além disso, seria importante determinar se a recuperação dos níveis de Arg alteraria a baixa emissão de NO por folhas *nia1 nia2*, o que poderia trazer informações sobre a possível importância desse composto como uma fonte de NO na interação patogênica. Ainda, o tratamento com o gás NO seria essencial para se determinar inequivocamente se a susceptibilidade de *nia1 nia2* é resultante de sua produção deficiente de NO.

## **OBJETIVOS**

O presente estudo visou propiciar um melhor entendimento da homeostase do NO em plantas, enfocando na importância dessa molécula na bioenergética mitocondrial e na resposta de defesa vegetal ao ataque de patógenos. Mais especificamente, ele teve como objetivos:

- Analisar a atividade de degradação de NO por mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, verificando o envolvimento da cadeia respiratória vegetal, em especial das NAD(P)H desidrogenases externas, nesse processo.
- Caracterizar a atividade de degradação de NO por mitocôndrias isoladas de fígado de rato, comparando-se com os mecanismos apresentados pelas mitocôndrias vegetais.
- Verificar o efeito da recuperação dos níveis endógenos de aminoácidos (inclusive Arg) na emissão de NO e na resposta de defesa de folhas *nia1 nia2* à bactéria *Pseudomonas syringae*.
- Verificar o efeito da fumigação com baixas concentrações do gás NO na resposta de defesa e no perfil transcriptômico de folhas *nia1 nia2* inoculadas com *P. syringae*.

A fim de contemplar cada um desses objetivos específicos, a presente tese encontra-se dividida em quatro capítulos, apresentados na forma de artigos científicos.

## **CAPÍTULO 1**



# Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: Evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases

Halley Caixeta de Oliveira, Alfredo Wulff, Elzira Elisabeth Saviani, Ione Salgado \*

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 17 January 2008

Received in revised form 20 February 2008

Accepted 26 February 2008

Available online 6 March 2008

### Keywords:

Nitric oxide degradation

External NAD(P)H dehydrogenases

Plant mitochondria

Superoxide anion

Electron leakage

Potato tuber

## ABSTRACT

The mechanisms of nitric oxide (NO) synthesis in plants have been extensively investigated. NO degradation can be just as important as its synthesis in controlling steady-state levels of NO. Here, we examined NO degradation in mitochondria isolated from potato tubers and the contribution of the respiratory chain to this process. NO degradation was faster in mitochondria energized with NAD(P)H than with succinate or malate. Oxygen consumption and the inner membrane potential were transiently inhibited by NO in NAD(P)H-energized mitochondria, in contrast to the persistent inhibition seen with succinate. NO degradation was abolished by anoxia and superoxide dismutase, which suggested that NO was consumed by its reaction with superoxide anion ( $O_2^-$ ). Antimycin-A stimulated and myxothiazol prevented NO consumption in succinate- and malate-energized mitochondria. Although favored by antimycin-A, NAD(P)H-mediated NO consumption was not abolished by myxothiazol, indicating that an additional site of  $O_2^-$  generation, besides complex III, stimulated NO degradation. Larger amounts of  $O_2^-$  were generated in NAD(P)H- compared to succinate- or malate-energized mitochondria. NAD(P)H-mediated NO degradation and  $O_2^-$  production were stimulated by free  $Ca^{2+}$  concentration. Together, these results indicate that  $Ca^{2+}$ -dependent external NAD(P)H dehydrogenases, in addition to complex III, contribute to  $O_2^-$  production that favors NO degradation in potato tuber mitochondria.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nitric oxide (NO) has emerged as an important signaling molecule in plants, with a crucial role in several metabolic and developmental processes, such as root growth, seed germination, leaf expansion, stomata movement and senescence [1,2]. Additionally, NO is involved in plant defense against pathogens, including the hypersensitive response, the activation of some defensive genes and the production of antimicrobial compounds [3–5].

The intracellular steady-state levels of NO are determined by a balance between the rate of synthesis and degradation of this radical. Although the pathways for NO synthesis have been extensively investigated [1,6], little is known about the mechanisms by which NO is degraded in plant cells. In aqueous aerobic solutions, NO decays to nitrite through auto-oxidation [7]. However, this reaction is not fast enough to explain the extremely short half-life of NO in biological systems, indicating the existence of additional pathways for its degradation [8]. Some enzymatic mechanisms for the conversion of NO to nitrite have been identified in animals, including reactions involving lipoxygenases, prostaglandin H synthase and peroxidases (see [8] and references therein). A heme-dependent conversion of NO to nitrate, similar to the NO dioxygenase activity described in *Escherichia coli*, has also been observed in mammalian cells and plants [9].

Mitochondria are an important target for NO, which binds reversibly to the oxygen binding site of cytochrome c oxidase (COX or complex IV), resulting in decreased oxygen consumption [10]. This reversible inhibition of COX has been considered a physiological mechanism by which NO regulates respiration [11]. Additionally, prolonged exposure to NO can persistently inhibit respiratory activity via the nitrosation of components of the respiratory chain such as complex I [12]. Plant COX is also very sensitive to NO [13,14] which can cause cell death by adversely affecting the normal functions of plant mitochondria [15]. In view of the potentially deleterious effects of NO in mitochondria, the existence of mechanisms for controlling NO levels in this organelle may be important in regulating the signaling and toxicity of this radical.

An important mechanism for NO consumption is its non-enzymatic reaction with superoxide anion ( $O_2^-$ ) to form peroxynitrite ( $ONOO^-$ ) [16]. When mitochondrial respiration is inhibited by NO, this mechanism contributes to NO degradation in the medium, thereby reactivating the previously inhibited COX and restoring respiration [17]. Electron leakage from complex I [18], and the ubiquinone cycle and cytochrome b of complex III [19,20] are the main sites of  $O_2^-$  generation in the mammalian respiratory chain. The molecular mechanisms that lead to  $O_2^-$  production at these sites in the respiratory complexes are still incompletely understood [18,20].

The core of respiratory components in plant mitochondria is very similar to that in other eukaryotic mitochondria and studies suggest that complexes I and III also contribute to  $O_2^-$  production in plants [21].

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 6149; fax: +55 19 3521 6129.

E-mail address: [ionesm@unicamp.br](mailto:ionesm@unicamp.br) (I. Salgado).

However, in addition to the standard respiratory complexes, the internal membrane of plant mitochondria contains alternative pathways for electron transport. These include the alternative oxidase (AOX) that bypasses complexes III and IV, and at least four alternative dehydrogenases that bypass complex I [22,23]. Two of these dehydrogenases face the external surface of the inner membrane and allow the direct oxidation of cytosolic NAD(P)H [23]. These alternative enzymes are non-proton pumping proteins and therefore do not contribute to energy conservation through oxidative phosphorylation. Variations in the level of expression of these dehydrogenases in different tissues, as well as during development and following exposure to different kinds of stress, suggest that these enzymes have important functions in plants [23].

Despite the singularity of mitochondria in plants and the importance of regulation of mitochondrial respiration by NO, the ability of these organelles to degrade NO has not been addressed. In this work, we show that external NAD(P)H dehydrogenases, in addition to complex III, contribute to NO degradation in potato tuber mitochondria. NAD(P)H oxidation by external dehydrogenases led to an increased generation of  $O_2^-$ , which reacted non-enzymatically with NO. This reaction competed with NO binding to COX, allowing the recovery of oxygen consumption. The role of plant mitochondrial respiratory chain in preventing the inhibitory effects of NO on respiration is discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

Sucrose and hydrogen peroxide solution were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Amplex Red was from Molecular Probes (Eugene, OR). Coomassie Plus protein assay reagent was from Pierce (Rockford, IL). The other chemicals were obtained from Sigma (St. Louis, MO).

### 2.2. Preparation of GSNO and NO

S-Nitrosoglutathione (GSNO) was synthesized according to Mathews and Kerr [24]. Briefly, equimolar amounts of reduced glutathione and  $NaNO_2$  were dissolved in an aqueous solution. The pH of the solution was adjusted to 2.0 with HCl and incubated for

15 min to allow development of the characteristic red color. Samples were then neutralized to pH 7.0 with NaOH and the concentration of GSNO was determined at 542 nm. A saturated solution of NO was prepared by bubbling NO gas through Arg-purged phosphate buffer in a rubber-sealed vial.

### 2.3. Preparation of mitochondria

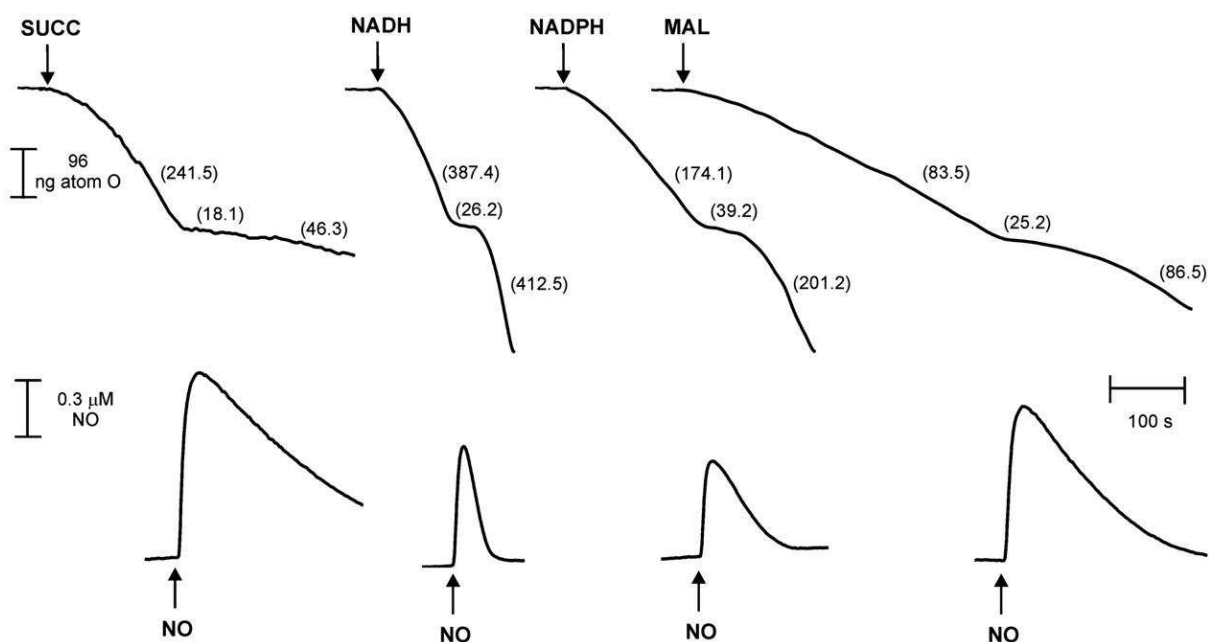
Mitochondria were isolated from potato tubers (*Solanum tuberosum* L. cv Monalisa) obtained from a local supermarket. The tubers were peeled, cut into small cubes and then homogenized with a domestic juice extractor in buffer containing 0.4 M sucrose, 10 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES, pH 7.6), 1 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 3 mM cysteine. The suspension was strained through four layers of gauze and the pH was adjusted to 7.1 prior to centrifugation at 1500  $\times g$  for 5 min to remove debris and starch. The resulting supernatant was centrifuged at 9000  $\times g$  for 15 min and the mitochondrial pellet was suspended in wash medium containing 0.25 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.2), 0.1 mM EGTA and 0.1% BSA and subjected to another cycle of differential centrifugation. Mitochondrial suspensions were then combined with a solution of 21% Percoll containing 0.25 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.2) and 0.3 mM EGTA and centrifuged at 39,000  $\times g$  for 30 min, in an SW 41 rotor (Beckman Instruments, Palo Alto, CA). The band of mitochondria was collected with a pipette, diluted 10-fold with wash medium and centrifuged at 19,000  $\times g$  for 15 min to eliminate the Percoll and collect the purified mitochondria. The use of a Percoll gradient to purify mitochondria greatly reduced the contamination by peroxisomes [25], as shown by the catalase activity in crude (1.15  $\mu\text{mol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) and purified (0.19  $\mu\text{mol } O_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) mitochondrial suspensions. All of the steps were done at 4 °C. The mitochondrial protein concentration was determined by the Coomassie blue binding method, using BSA as the standard [26].

### 2.4. Nitric oxide and oxygen measurements

NO and  $O_2$  concentrations were measured at 25 °C using the electrochemical sensors ISO-NOP and ISO-OXY-2, respectively, connected to a free radical analyzer Apollo 4000 (World Precision Instruments, Sarasota, FL). Mitochondria were incubated in a reaction medium containing 0.25 M sucrose, 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) and 0.1% BSA. The amount of mitochondrial protein, respiratory substrate and other additions are specified in the fig. legends. The NO electrode was calibrated with S-nitroso-N-acetyl-penicillamine in 0.1 M  $CuCl_2$  [27].

### 2.5. Measurement of the transmembrane electrical potential ( $m\Delta\psi$ )

The membrane potential was measured using safranine as an optical probe [28]. The changes in the absorbance at 511–533 nm were recorded using an UV-visible photodiode array spectrophotometer (MultiSpec-1500, Shimadzu Corporation, Tokyo,



**Fig. 1.** NO degradation and  $O_2$  consumption by potato tuber mitochondria energized with different respiratory substrates. Isolated mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in a reaction medium containing 0.25 M sucrose, 0.1% BSA and 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) supplemented with 2 mM  $Mg^{2+}$  and 1  $\mu\text{mol}$  ADP (State 3 respiration). Mitochondria were energized with 5 mM succinate (SUCC), 1 mM NADH (NADH), 1 mM NADPH and 0.5 mM  $Ca^{2+}$  (NADPH) or 10 mM malate plus 10 mM glutamate (MAL). An aliquot of NO saturated solution ( $\sim 1 \mu\text{M}$ ) was added after the mitochondrial suspension had consumed 50% of the  $O_2$  in the medium. Except when malate was used, 10  $\mu\text{M}$  rotenone was also added to the reaction medium. The numbers in parentheses refer to the respiratory rates expressed as  $\text{ng atom } O \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .



Japan). Mitochondrial suspensions were incubated at 25 °C in the reaction medium supplemented with 10  $\mu$ M safranin. Other additions are specified in the fig. legend.

## 2.6. Detection of superoxide anion production

Superoxide anion production by potato mitochondria was measured following the dismutation to  $H_2O_2$ , which was detected by the fluorogenic indicator Amplex Red in the presence of horseradish peroxidase [29]. Mitochondrial suspensions were incubated at 25 °C in reaction medium supplemented with 100 U of SOD/mL, 1 U of horseradish peroxidase/mL and 25  $\mu$ M Amplex Red. Other additions are specified in the fig. legends. Fluorescence was recorded in a Hitachi F-4500 spectrofluorometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) with excitation at 563 nm and emission at 587 nm. Background fluorescence, measured in the absence of mitochondria, was discounted from the sample fluorescence. Standard curves were obtained by the sequential addition of known concentrations of  $H_2O_2$  solution.

## 2.7. Statistical analysis

The results are representative of at least three mitochondrial preparations. Where appropriate, the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses were done using Student's *t*-test with *p* < 0.05 indicating significance.

## 3. Results

### 3.1. NO degradation by energized potato mitochondria: effect of different electron donors

NO degradation and its inhibitory effect on  $O_2$  consumption by potato tuber mitochondria in state-3 conditions (ADP present) were assessed simultaneously using electrochemical sensors for NO and  $O_2$ , respectively (Fig. 1). The addition of an aliquot of an NO saturated solution (equivalent to  $\sim 1 \mu$ M) to succinate-energized mitochondria generated a peak of 0.97  $\mu$ M NO that was subsequently consumed at a rate of 0.90  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and caused persistent inhibition on  $O_2$  consumption by mitochondria. In contrast, when potato mitochondria were energized with NADH or NADPH, the NO peaks were lower (0.62  $\mu$ M and 0.41  $\mu$ M, respectively) and the NO consumption rates were higher (3.74  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and 1.63  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ , respectively), resulting in complete consumption of NO during the experiment. In this case, NO transiently inhibited  $O_2$  consumption, probably because the rapid decrease in NO concentration in the reaction medium favored its release from COX [10]. Accordingly, the recovery of respiratory activity was accelerated in NADH-energized compared to NADPH-energized mitochondria. Malate-energized mitochondria had an NO consumption rate of 1.32  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  and a peak of 0.80  $\mu$ M NO following the addition of NO to the reaction medium, indicating that NO degradation in these conditions was faster than in succinate-energized mitochondria but slower than in NAD(P)H-energized mitochondria.

When GSNO was used as an NO donor, the results were similar to those obtained with pure NO (see Fig. S1 of Supplementary material). The inhibitory effect of GSNO was reverted by the addition of the NO scavenger 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), indicating that the effect of GSNO on  $O_2$  consumption by potato tuber mitochondria was not mediated by NO-independent protein nitrosation [30]. These results indicate that NO degradation by potato tuber mitochondria can be studied using either pure NO or GSNO as an NO donor.

The effect of NO and GSNO on the membrane electrical potential ( $m\Delta\psi$ ) of potato mitochondria was also examined (Fig. 2). Direct application of the NO saturated solution caused an intense and persistent decrease in the  $m\Delta\psi$  generated by succinate oxidation, whereas the fall in the potential generated by the oxidation of NADH or NADPH was less intense and quickly reversed (Fig. 2a). Addition of the uncoupler carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP) collapsed the  $m\Delta\psi$ . As shown in Fig. 2b, addition of GSNO caused similar perturbations in  $m\Delta\psi$  to those induced by NO solution. These results indicated that the higher rate of NO degradation in the presence of NAD(P)H (Fig. 1) was reflected in the maintenance of the  $m\Delta\psi$  in energized mitochondria.

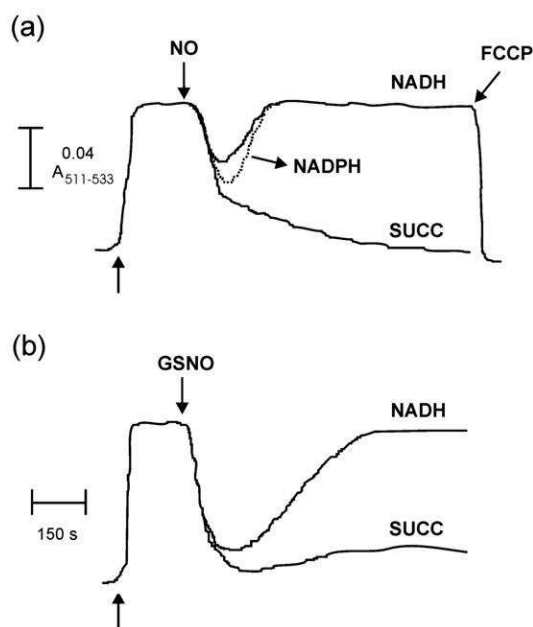
### 3.2. NAD(P)H and mitochondria are required for NO degradation

The NO degradation rate decreased from 1.30  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  to 0.60  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  as NADH concentration decreased from 100  $\mu$ M to 10  $\mu$ M. When NADH was replaced by NADPH, the NO degradation rate decreased from 1.03  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  to 0.38  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ . The kinetics of NO degradation by potato tuber mitochondria as a function of NAD(P)H concentration is shown in Fig. S2 of Supplementary material. These results show that NO degradation depends on NAD(P)H concentration in the incubation medium and that NADH is more effective than NADPH in accelerating NO degradation by potato tuber mitochondria.

The NAD(P)H-dependent NO degradation increased as a function of the mitochondrial protein concentration (not shown), and it was in the range of 1.2  $\text{nmol/min}$  in the presence of 0.25 mg of mitochondrial protein. In the absence of mitochondria and NADH, the rate of NO decay in the incubation medium was 0.20  $\text{nmol/min}$  and was unaltered by the addition of NADH. This much lower rate of NO decay probably reflected the spontaneous reaction of NO with oxygen to produce nitrite [7]. When GSNO was used as an NO donor, an even lower rate of NO decay (0.036  $\text{nmol/min}$ ) was detected in the absence of mitochondria and NADH. The lower spontaneous decay of NO seen with GSNO compared to NO was probably related to the continuous release of NO in the reaction medium. Together, these results indicate that NO degradation was not attributable to a non-enzymatic reaction of NAD(P)H with NO or to the auto-oxidation of NO.

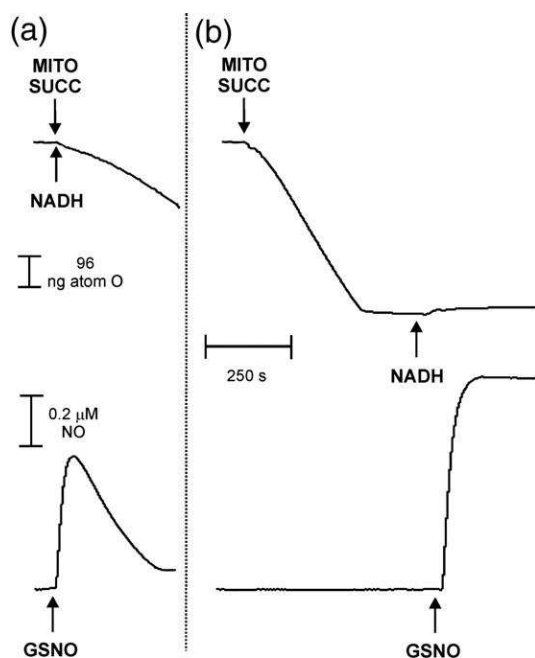
### 3.3. NAD(P)H-dependent NO degradation is an aerobic process that is prevented by SOD

The requirement for oxygen in the NAD(P)H-dependent degradation of NO by potato tuber mitochondria was assessed as shown in Fig. 3. Potato mitochondria were energized with succinate and GSNO and NADH were added to the reaction medium before  $O_2$  consumption by the mitochondrial suspension (Fig. 3a) or after all of the  $O_2$  in the incubation medium had been consumed (Fig. 3b). In the presence of



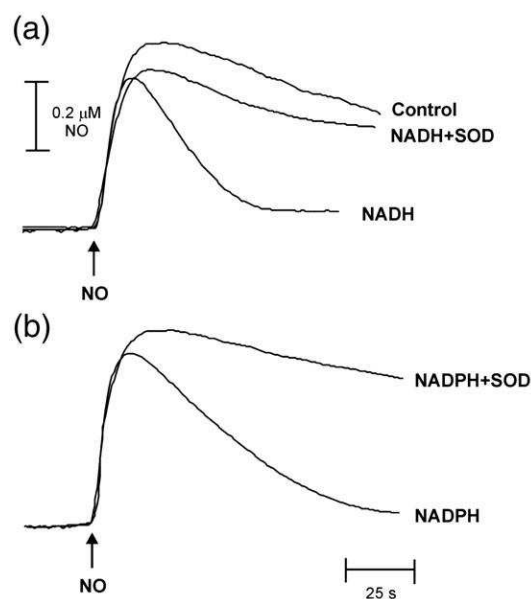
**Fig. 2.** Effect of NO from a pure solution (a) or from the donor GSNO (b) on the  $m\Delta\psi$  of energized potato tuber mitochondria. Mitochondria (0.5 mg/mL) were incubated in reaction medium (see Fig. 1) supplemented with 10  $\mu$ M rotenone and 10  $\mu$ M safranin and energized with 2 mM NADH (NADH), 2 mM NADPH plus 0.5 mM  $Ca^{2+}$  (NADPH) or 10 mM succinate (SUCC), as indicated. GSNO (0.8 mM), NO ( $\sim 8.5 \mu$ M) and FCCP (2  $\mu$ M), were added where indicated.





**Fig. 3.** The requirement for oxygen in NADH-dependent NO degradation by potato tuber mitochondria. Mitochondria (0.25 mg/mL; MITO) were incubated in reaction medium (see Fig. 1) supplemented with 2 mM  $Mg^{2+}$  and 1  $\mu$ mol ADP, and energized with 5 mM succinate (SUCC). NADH (100  $\mu$ M) and GSNO (100  $\mu$ M) were applied (a) before  $O_2$  consumption by the mitochondrial suspension or (b) under anaerobiosis.

$O_2$ , GSNO generated a peak of NO (0.50  $\mu$ M) that was rapidly consumed. When GSNO was added under anaerobiosis, the NO peak was much higher (0.85  $\mu$ M) and the NO concentration in the reaction medium remained almost constant, indicating that NO degradation was inhibited under these circumstances. A lower rate of NO decay was expected in anaerobiosis since there is no spontaneous reaction of NO with molecular oxygen. However, the almost complete inhibition of NO degradation indicated that the detected mechanism was



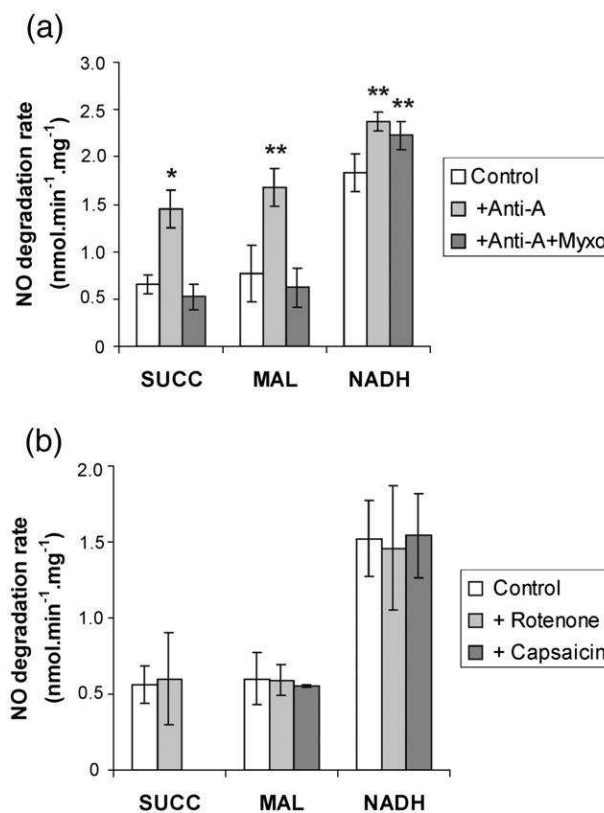
**Fig. 4.** Superoxide dismutase (SOD) prevents NAD(P)H-dependent NO degradation by potato mitochondria. Mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in the reaction medium (see Fig. 1) and an aliquot of a saturated NO solution ( $\sim 1$   $\mu$ M) was added. NO decay was followed in the presence of 100  $\mu$ M NADH (a) or NADPH (b) or mitochondria alone (control). Where indicated, 500 U of SOD/mL was used.

dependent on  $O_2$ . This result also showed that the NO degradation in these experimental conditions did not result from the action of COX [10] nor from the reduction of NO to nitroxyl anion by reduced ubiquinone [19], both of which can occur in the absence of  $O_2$ . Additionally, NO degradation by potato tuber mitochondria was not inhibited by potassium cyanide (not shown) indicating that this process was also not mediated by NO dioxygenase activity [9].

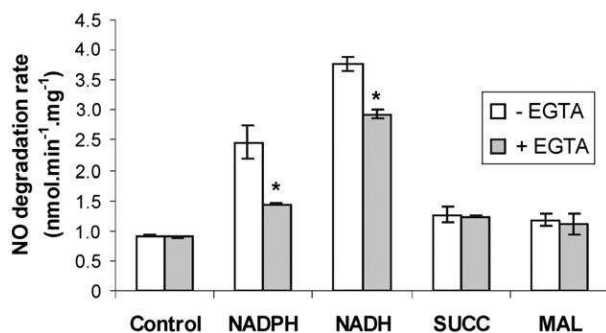
An important mechanism of NO degradation that occurs only in the presence of  $O_2$  is its non-enzymatic reaction with  $O_2^-$  to form  $ONOO^-$  [16]. As shown in Fig. 4a, when NO ( $\sim 1$   $\mu$ M) was added to the incubation medium it was degraded by NADH-energized mitochondria at a rate of  $3.77$   $nmol\ min^{-1}\ mg^{-1}$ . In the presence of superoxide dismutase (SOD), NO degradation decreased to a rate similar to that seen in the control situation (without NADH). The same inhibitory effect of SOD on NO degradation was seen when NADH was replaced by NADPH (Fig. 4b). This inhibitory effect of  $O_2^-$  dismutation by SOD on NAD(P)H-dependent NO degradation indicates that NO is mainly consumed by its reaction with  $O_2^-$ .

### 3.4. Effect of mitochondrial respiratory chain inhibitors on NO degradation

The foregoing results suggest that any situation that stimulates electron leakage from the respiratory chain would favor NO degradation by potato tuber mitochondria. In animals, antimycin-A (Anti-A) favors the formation of the unstable ubisemiquinone, the auto-oxidation of which generates  $O_2^-$  [31]. Anti-A was therefore used to analyze the effect of electron leakage from complex III on NO degradation by succinate-, malate- or NADH-energized potato tuber mitochondria (Fig. 5a). When



**Fig. 5.** Effect of inhibitors of mitochondrial respiration on NO degradation by potato tuber mitochondria. Mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in the reaction medium and energized with different substrates, as described in Fig. 1. The degradation of NO released from GSNO (100  $\mu$ M) was followed without any further addition (control) or (a) in the presence of 10  $\mu$ M Anti-A alone or with 10  $\mu$ M myxothiazol or (b) in the presence of 10  $\mu$ M rotenone or 60  $\mu$ M capsaicin. The columns represent the mean  $\pm$  standard deviation of three different mitochondrial preparations. \* $p < 0.01$  and \*\* $p < 0.05$  compared to the respective rates without inhibitor.



**Fig. 6.**  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent NO degradation by potato tuber mitochondria. Mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in the reaction medium and energized with 0.1 mM NADPH (NADPH), 0.1 mM NADH (NADH), 5 mM succinate (SUCC) or 10 mM malate plus 10 mM glutamate (MAL). An aliquot of saturated NO solution was applied and NO decay was followed in the absence or presence of 0.5 mM EGTA. The control column represents NO degradation by potato mitochondria without any substrate. The columns represent the mean  $\pm$  standard deviation of three experiments with a representative mitochondrial preparation. \* $p < 0.01$  compared to the respective rates without EGTA.

mitochondria were incubated only with succinate, a slow rate of NO consumption ( $0.66 \pm 0.10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) was observed. However, when incubation with Anti-A preceded the addition of GSNO, the rate of NO consumption increased to  $1.45 \pm 0.21 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . This enhanced rate of NO degradation was prevented by SOD (not shown). Myxothiazol inhibits the formation of the unstable ubisemiquinone, thereby preventing electron leakage from complex III [31]. The addition of myxothiazol to succinate-energized potato tuber mitochondria prevented the enhanced NO degradation seen with Anti-A and reduced the rate of NO degradation to the level seen in mitochondria incubated without substrate ( $0.39 \pm 0.14 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). The stimulatory and inhibitory effects of Anti-A and myxothiazol, respectively, were also seen when mitochondria were energized with malate. NO degradation was also stimulated by Anti-A when NADH was used as substrate. However, in contrast to the response seen with succinate and malate, the addition of myxothiazol did not significantly inhibit the Anti-A-stimulated NO degradation, suggesting an electron leakage upstream of complex III when NADH is used as substrate. Similar results were obtained for NADPH (not shown).

Complex I is an important site of  $\text{O}_2^-$  generation in mammalian mitochondria [18] and similar formation may also occur in plants [21]. In contrast to complex III, which can release  $\text{O}_2^-$  to both sides of the inner mitochondrial membrane,  $\text{O}_2^-$  formed by complex I is released exclusively into the matrix [32]. Under our experimental conditions, NADH could favor electron leakage from complex I of a subpopulation of ruptured potato mitochondria. To test this possibility, NADH-dependent NO degradation was analyzed in the presence of rotenone and capsaicin, drugs that respectively stimulate and inhibit electron leakage from complex I [18]. As shown in Fig. 5b, neither compound had any significant effect on the rate of NO degradation by NADH-energized potato tuber mitochondria. Furthermore, the high values of respiratory controls (phosphorylating/resting respiration) of these mitochondrial suspensions (5.5–6.0 with malate and 3.6–4.0 with NADH) were indicative of a high percentage of intact mitochondria that could prevent the access of NADH to complex I. Rotenone and capsaicin also did not modify NO degradation by malate-energized mitochondria (Fig. 5b). These results indicated that the NADH-dependent NO degradation by intact potato mitochondria did not result from electron leakage from complex I. Rotenone had no effect on NO degradation by succinate-energized potato mitochondria (Fig. 5b), indicating that NO consumption, observed in these experimental conditions, was also not attributable to reverse electron transport from succinate dehydrogenase to complex I [33].

As shown in Fig. 6,  $\text{Ca}^{2+}$  chelation by EGTA significantly inhibited NO degradation by NADPH-energized mitochondria (from  $2.46 \pm 0.28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  to  $1.44 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). EGTA also

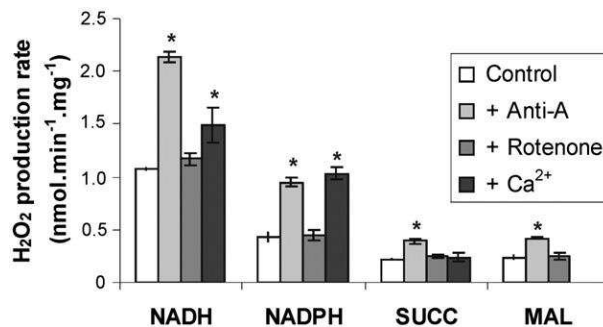
inhibited NO degradation by NADH-energized potato mitochondria, but to a lesser extent (from  $3.77 \pm 0.11 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  to  $2.93 \pm 0.07 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). This finding indicates that NO degradation stimulated by NADH is less dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  than the NADPH-stimulated degradation, a characteristic that also distinguishes the external NAD(P)H dehydrogenases [21]. Accordingly, EGTA strongly inhibited the respiratory activity of NADPH-energized mitochondria (from  $176.7 \pm 8.9 \text{ ng atom O min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  to  $10.9 \pm 2.2 \text{ ng atom O min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), while a lower inhibitory effect (from  $372.1 \pm 1.5 \text{ ng atom O min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  to  $258.9 \pm 11.2 \text{ ng atom O min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) was observed when NADH was used as substrate. Fig. 6 also shows that EGTA did not significantly alter the rates of NO degradation by potato tuber mitochondria energized with succinate or malate; these rates were much lower than those seen with NAD(P)H-energized mitochondria and were similar to that of control mitochondria ( $0.91 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ).

Overall, these findings suggest that, in addition to the  $\text{O}_2^-$  from complex III, the extra-mitochondrial release of  $\text{O}_2^-$  formed by external dehydrogenases contributes to NO degradation when potato tuber mitochondria are energized with NAD(P)H.

### 3.5. Superoxide anion release by potato mitochondria

Superoxide anion generation by potato tuber mitochondria energized with different substrates was assessed based on the hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentration. As shown in Fig. 7, mitochondria energized with NADH had the highest rate of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production ( $1.07 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). NADPH-energized mitochondria produced less  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $0.43 \pm 0.05 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ) than with NADH. When succinate and malate were used as substrates, still lower rates were observed ( $0.22 \pm 0.03 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  and  $0.24 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectively) and these rates were similar to that of non-energized mitochondria ( $0.15 \pm 0.02 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). For all tested substrates, the rates of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production were lower than the respective NO degradation rates because the monitoring of  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration was carried out in the absence of NO. It is well known that the inhibitory effect of NO on respiration favors electron leakage from the respiratory chain, stimulating its own degradation. NO causes inhibition of mitochondrial electron transfer at COX and at the ubiquinone-cytochrome *b* region of the respiratory chain, the latter leading directly to an increased superoxide production [17]. These multiple inhibitory actions of NO in the respiratory chain explain the differences observed in the rates of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production and NO degradation.

Fig. 7 also shows that, for all tested substrates, the incubation of potato mitochondria with Anti-A practically doubled the  $\text{H}_2\text{O}_2$  production, thereby confirming the importance of electron leakage from complex III in  $\text{O}_2^-$  generation. On the other hand, the lack of a



**Fig. 7.** Peroxide production by potato tuber mitochondria. Mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in the reaction medium described in Fig. 1 plus 100 U SOD/mL, 1 U horseradish peroxidase/mL and 25  $\mu\text{M}$  Amplex Red, and energized with different substrates, as described in Fig. 6. The rates of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in the presence of 10  $\mu\text{M}$  Anti-A, 10  $\mu\text{M}$  rotenone or 250  $\mu\text{M}$   $\text{Ca}^{2+}$  were compared to those without any inhibitor (Control). The columns represent the mean  $\pm$  standard deviation of three experiments with a representative mitochondrial preparation. \* $p < 0.05$  compared to the respective rates without inhibitor.

significant effect of rotenone on  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation in NAD(P)H-, malate- and succinate-energized mitochondria confirmed that electron leakage from complex I, including reverse transport from complex II, was not detected in our experimental conditions, probably because the antioxidant defense mechanisms of the mitochondrial matrix can dissipate internally generated  $\text{O}_2^-$  [34].  $\text{Ca}^{2+}$  addition to the reaction medium significantly increased the  $\text{H}_2\text{O}_2$  production by NADPH-energized potato mitochondria, from  $0.43 \pm 0.05 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  to  $1.03 \pm 0.06 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ . In the presence of NADH,  $\text{Ca}^{2+}$  stimulated  $\text{H}_2\text{O}_2$  production only by 40% corroborating with the lower inhibitory effect of  $\text{Ca}^{2+}$  chelation on NADH- compared to NADPH-dependent NO degradation (Fig. 6).  $\text{H}_2\text{O}_2$  production in succinate-energized potato mitochondria was not modified by  $\text{Ca}^{2+}$ .

Overall, monitoring of  $\text{H}_2\text{O}_2$  production gave further evidence that external NAD(P)H dehydrogenases, in addition to complex III, contribute to NO degradation by potato tuber mitochondria.

#### 4. Discussion

The present results describe a detailed study of NO degradation by plant mitochondria. We show that mitochondria isolated from potato tubers can degrade NO under aerobiosis (Fig. 3), and this degradation was prevented by the removal of  $\text{O}_2^-$  from the reaction medium (Fig. 4). These findings indicated that the non-enzymatic reaction of NO with  $\text{O}_2^-$  accounted for the NO degradation in isolated potato mitochondria, an activity previously observed in mitochondria and submitochondrial particles of animal tissues [17,19]. The sites of electron leakage from the respiratory chain involved in NO degradation by intact potato mitochondria were identified by using various electron donors and inhibitors of mitochondrial electron transport.

Experiments with Anti-A and myxothiazol showed that extra-mitochondrial electron leakage from the ubiquinone cycle at complex III was an important source of  $\text{O}_2^-$  release for NO degradation (Figs. 5a and 7). Previous studies with mitochondria and submitochondrial particles of various plant species have shown the important role of complex III in  $\text{O}_2^-$  generation [21]. In plant mitochondria with stimulated AOX activity, the generation of  $\text{O}_2^-$  by complex III is reduced [35] because AOX activity attenuates the level of ubiquinone reduction [22]. Mitochondrial preparations isolated from fresh potato tubers have no AOX activity (see [36]). Hence, the effect of AOX on the mechanism of mitochondrial NO degradation could not be checked here.

In addition to electron leakage from complex III, external NAD(P)H dehydrogenases were also identified as important sites of  $\text{O}_2^-$  generation in the respiratory chain of potato tuber mitochondria. In agreement with this, higher rates of  $\text{O}_2^-$  generation were detected in NAD(P)H-energized potato mitochondria (Fig. 7), the rates of NO consumption were accelerated in NAD(P)H- compared to succinate- or malate-energized mitochondria (Figs. 1, 5 and 6), and SOD prevented the accelerated NO degradation (Fig. 4). Furthermore, NAD(P)H-dependent NO degradation, although stimulated by Anti-A, was not significantly inhibited by myxothiazol (Fig. 4a), indicating that electron leakage at sites located upstream of complex III contributed to NO degradation. The participation of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent external NAD(P)H dehydrogenases in this mechanism of NO degradation was further demonstrated by the observation that the rates of  $\text{O}_2^-$  generation (Fig. 7) and NO consumption (Fig. 6) increased as a function of the free  $\text{Ca}^{2+}$  in the reaction medium. Moreover, these effects of  $\text{Ca}^{2+}$  were more pronounced when NADPH was used as respiratory substrate, compared to NADH. This finding agrees with the previous observation that external NADH dehydrogenase is less dependent on  $\text{Ca}^{2+}$  than the corresponding NADPH dehydrogenase [21].

The importance of the external NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria as a source of  $\text{O}_2^-$  was suggested by Fang and Beattie [31]. An elevated  $\text{O}_2^-$  production has also been observed in potato submitochondrial particles [37] and in isolated mitochondria

from green bell pepper fruit [38] in the presence of NADH as the respiratory substrate. However, in none of these studies with plants did the authors distinguish whether this enhanced production involved complex I or the activities of alternative dehydrogenases. Although complex I releases  $\text{O}_2^-$  exclusively into the matrix [32], its activity resulting from a subpopulation of ruptured potato mitochondria could contribute to NO degradation. However, the lack of effect of rotenone and capsaicin on the rate of NO degradation by NADH- or malate-energized potato mitochondria excluded this possibility (Fig. 5b). Additionally, the observation that NADH was unable to reach complex I because of the high integrity of the mitochondrial suspensions precluded any assessment of the contribution of internal NAD(P)H dehydrogenases to the NO degradation seen here. However, the participation of complex I and internal alternative dehydrogenases in NO degradation cannot be eliminated.

The accelerated degradation of NO in the presence of NAD(P)H may have an important role in regulating the signaling and toxicity of NO in plants. NO binds reversibly to COX at nanomolar concentrations and inhibits oxygen consumption and ATP synthesis in plant mitochondria [13,14]. As shown here, the degradation of NO by its reaction with  $\text{O}_2^-$  allowed the recovery of  $\text{O}_2$  consumption (Fig. 1) and the reestablishment of the membrane potential when potato tuber mitochondria were energized with NAD(P)H (Fig. 2). This interaction with  $\text{O}_2^-$  to relieve the inhibition of COX by NO may therefore represent an alternative pathway for the use of NO by plant mitochondria. The importance of the non-enzymatic reaction of NO with  $\text{O}_2^-$  in controlling respiratory activity has previously been demonstrated in studies with mitochondria, submitochondrial particles and purified enzymes of animal origin [17,19,20]. In these studies, complex III was found to be the main source of  $\text{O}_2^-$  for NO degradation.

As demonstrated here, in addition to complex III, potato mitochondria also show electron leakage from external NAD(P)H dehydrogenases, indicating the existence of an additional mechanism for preventing the deleterious effects of NO on the respiratory activity of plant mitochondria. Many studies have focused on the potential role of these alternative dehydrogenases, acting as nonphosphorylating enzymes, in reducing the rate of free radical production by plant mitochondria. Experimental proof for this activity has been elusive and the role of these enzymes, the expression of which is altered in response to various environmental conditions and stress, has been an unsolved question [23]. The results described here have revealed a previously unrecognized role of these enzymes in plant NO metabolism.

Although the foregoing mechanism of NO degradation can recuperate mitochondrial functionality, it generates  $\text{ONOO}^-$ . This anion can participate in the oxidation, nitrosation and nitration of biological molecules involved in cellular signaling and, depending on the conditions, can cause also oxidative damage [16]. However, given the rates of NO and  $\text{O}_2^-$  production under physiological conditions and the extremely short half-life of  $\text{ONOO}^-$ , the intramitochondrial levels of  $\text{ONOO}^-$  are probably very low [17,20] and unlikely to have any effect on the respiratory activity of potato mitochondria, as also reported for rat heart submitochondrial particles [17]. Recent work with animal cells suggests that rather than being a purely deleterious and cytotoxic process, the reaction of  $\text{O}_2^-$  with NO is an important regulatory mechanism that modulates signaling pathways by controlling the steady-state levels of NO and preventing the formation of peroxide and hydroxyl radical from  $\text{O}_2$  [39,40]. Studies with plants have also proposed that the interaction of NO with  $\text{O}_2^-$  may be important in minimizing oxidative stress [2].

The involvement of external NAD(P)H dehydrogenases in NO degradation confirms the importance of mitochondria for NO homeostasis in plants cells. Recent studies have identified mitochondria as one of the main sites of NO synthesis in plants because of their ability to reduce  $\text{NO}_2^-$  via the respiratory chain [41,42]. This NO production from  $\text{NO}_2^-$  increases in response to pathogen attack and helps to prevent the spread of pathogens [5,41]. However, the prolonged exposure of



mitochondria to this radical may lead to a persistent loss of mitochondrial functionality, as discussed above. In addition to mitochondria, NO is also produced by peroxisomes [43], chloroplasts [44], cytosol [45] and the plasma membrane [46]. The degradation of this NO by external NAD(P)H dehydrogenases may be important in preventing further inhibition of mitochondrial respiration. This mechanism of NO degradation in the vicinity of the mitochondrial membrane may contribute to NO homeostasis and maintain the overall metabolism of plant tissues that depend on mitochondria for energy, as is the case of potato tubers. However, it is important to point out that mitochondria isolated from fresh potato tubers are relatively unique among plants in lacking any AOX activity. Thus, future investigation addressing the effect of this protein on NO degradation would be relevant in order to check the extension of the present findings among other plants.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Ohara Augusto for providing the NO saturated solution, Dr. Fernanda R. Gadelha for assistance with the Amplex Red assays and Dr. Eneida de Paula for the use of the spectrofluorometer. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant no. 05/54246-4). H.C.O. is supported by a student fellowship from FAPESP and I.S. is supported by a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

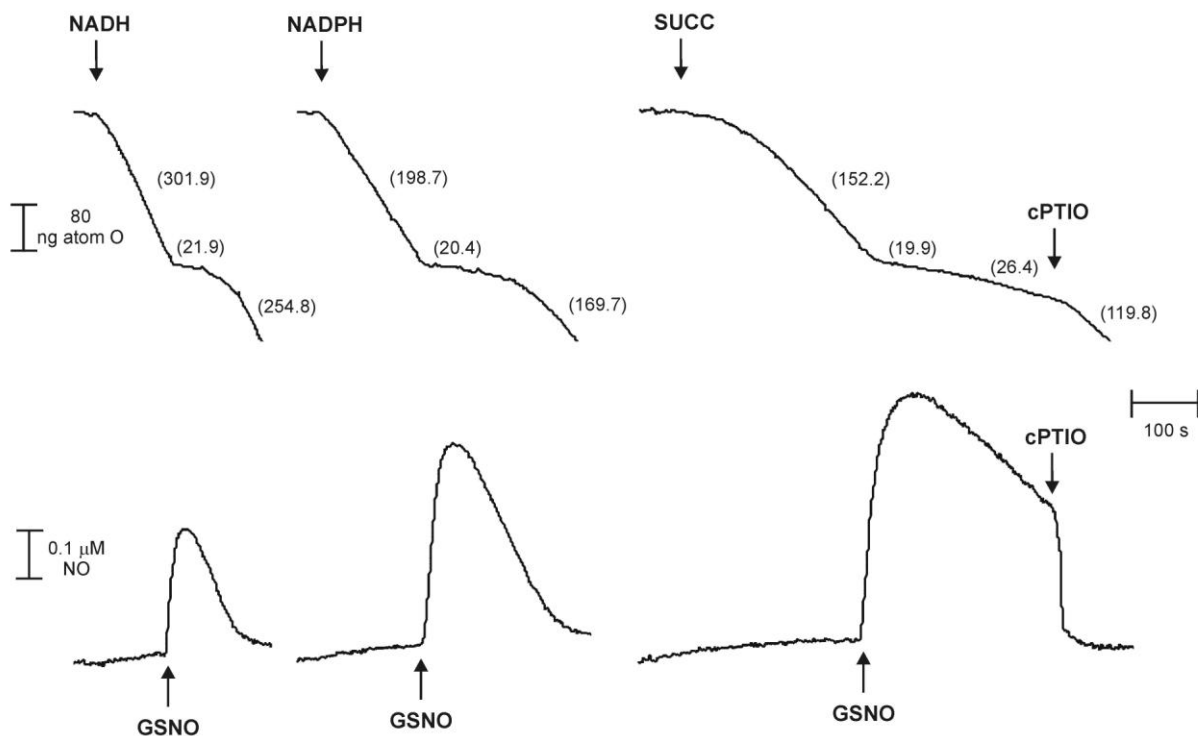
## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.bbabo.2008.02.006.

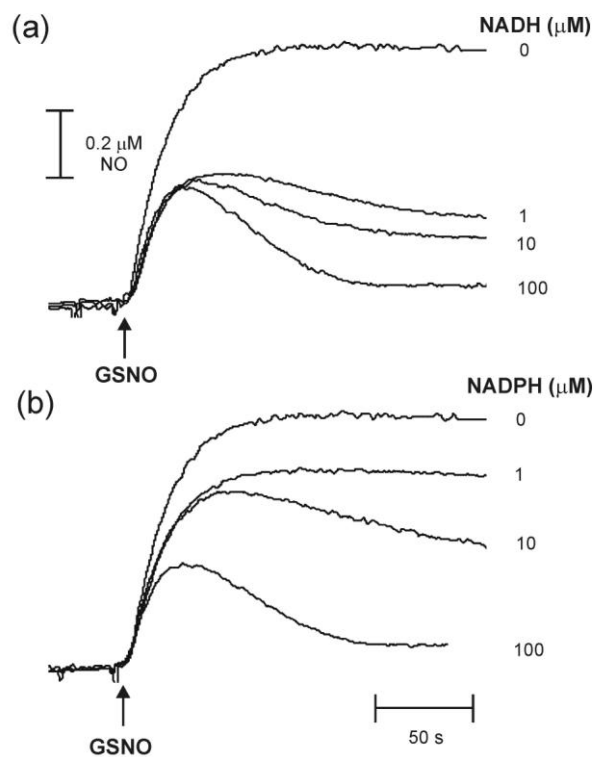
## References

- [1] L.A. del Rio, F.J. Corpas, J.B. Barroso, Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, *Phytochemistry* 65 (2004) 783–792.
- [2] L. Lamattina, C. Garcia-Mata, M. Graziano, G. Pagnussat, Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule, *Annu. Rev. Plant Biol.* 54 (2003) 109–136.
- [3] M. Delledonne, Y. Xia, R.A. Dixon, C. Lamb, Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature* 394 (1998) 585–588.
- [4] L.V. Modolo, F.Q. Cunha, M.R. Braga, I. Salgado, Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor, *Plant Physiol.* 130 (2002) 1288–1297.
- [5] L.V. Modolo, O. Augusto, I.M.G. Almeida, C.A.F. Pinto-Maglio, H.C. Oliveira, K. Seligman, I. Salgado, 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 (2006) 34–40.
- [6] I. Salgado, L.V. Modolo, O. Augusto, M.R. Braga, H.C. Oliveira, Mitochondrial nitric oxide synthesis during plant-pathogen interactions: role of nitrate reductase in providing substrates, in: L. Lamattina, J.C. Polacco (Eds.), *Plant Cell Monographs*, vol. 6, Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology, Springer-Verlag, Berlin, 2006, pp. 239–254.
- [7] V.G. Kharitonov, A.R. Sundquist, V.S. Sharma, Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solutions, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 5881–5883.
- [8] M.J. Coffey, R. Natarajan, P.H. Chumley, B. Coles, P.R. Thimmalapura, M. Nowell, H. Kuhn, M.J. Lewis, B.A. Freeman, V.B. O'Donnell, Catalytic consumption of nitric oxide by 12/15-lipoxygenase: inhibition of monocyte soluble guanylate cyclase activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 8006–8011.
- [9] P.R. Gardner, Nitric oxide dioxygenase function and mechanism of flavohemoglobin, hemoglobin, myoglobin and their associated reductases, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 247–266.
- [10] V. Borutaite, G.C. Brown, Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversibly inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide, *Biochem. J.* 315 (1996) 295–299.
- [11] M.W. Cleeter, J.M. Cooper, V.M. Darley-Usmar, S. Moncada, A.H. Schapira, Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases, *FEBS Lett.* 345 (1994) 50–54.
- [12] G.C. Brown, V. Borutaite, Nitric oxide inhibition of mitochondrial respiration and its role in cell death, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 1440–1450.
- [13] A.H. Millar, D.A. Day, Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria, *FEBS Lett.* 398 (1996) 155–158.
- [14] H. Yamasaki, H. Shimoi, Y. Ohshiro, Y. Sakihama, Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria, *Nitric Oxide Biol. Chem.* 5 (2001) 261–270.
- [15] E.E. Saviani, C.H. Orsi, J.F.P. Oliveira, C.A.F. Pinto-Maglio, I. Salgado, Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide-induced plant cell death, *FEBS Lett.* 510 (2002) 136–140.
- [16] R. Radi, A. Cassina, R. Hodara, C. Quijano, L. Castro, Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.* 33 (2002) 1451–1464.
- [17] J.J. Poderoso, M.C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobó, F. Schöpfer, A. Boveris, Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles, *Arch. Biochem. Biophys.* 328 (1996) 85–92.
- [18] G. Lenaz, R. Fato, M.L. Genova, C. Bergamini, C. Bianchi, A. Biondi, Mitochondrial complex I: structural and functional aspects, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1406–1420.
- [19] J.J. Poderoso, C. Lisdero, F. Schöpfer, N. Riobó, M.C. Carreras, E. Cadenas, A. Boveris, The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 37709–37716.
- [20] Y.R. Chen, C.L. Chen, A. Yeh, X. Liu, J.L. Zweier, Direct and indirect roles of cytochrome b in the mediation of superoxide generation and NO catabolism by mitochondrial succinate-cytochrome c reductase, *J. Biol. Chem.* 291 (2006) 13159–13168.
- [21] I.M. Moller, Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52 (2001) 561–591.
- [22] F.F. Millenaar, H. Lambers, The alternative oxidase: in vivo regulation and function, *Plant Biol.* 5 (2003) 2–15.
- [23] A.G. Rasmusson, K.L. Soole, T.E. Elthon, Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria, *Annu. Rev. Plant Biol.* 55 (2004) 23–39.
- [24] W.R. Mathews, S.W. Kerr, Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267 (1993) 1529–1537.
- [25] A.C. Lindén, I.M. Moller, Purification, characterization and storage of mitochondria from Jerusalem artichoke tubers, *Physiol. Plant.* 72 (1988) 265–270.
- [26] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [27] X. Zhang, Real time and in vivo monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors—from dream to reality, *Front. Biosci.* 9 (2004) 3434–3446.
- [28] K.E.O. Akerman, M.K.F. Wikström, Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential, *FEBS Lett.* 68 (1976) 191–197.
- [29] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R.P. Haugland, A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases, *Anal. Biochem.* 253 (1997) 162–168.
- [30] C.C. Dahm, K. Moore, M.P. Murphy, Persistent S-nitrosation of complex I and other mitochondrial membrane proteins by S-nitrosothiols but not nitric oxide or peroxynitrite, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 10056–10065.
- [31] J. Fang, D.S. Beattie, External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 478–488.
- [32] F.L. Muller, Y. Liu, H.V. Remmen, Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane, *J. Biol. Chem.* 27 (2004) 49064–49073.
- [33] V.G. Griivennikova, A.D. Vinogradov, Generation of superoxide by the mitochondrial complex I, *Biochim. Biophys. Acta* 1747 (2006) 553–561.
- [34] Q. Chen, E.J. Vazquez, S. Moghaddas, C.L. Hoppel, E.J. Lesnesky, Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 36027–36031.
- [35] V.N. Popov, R.A. Simonian, V.P. Skulachev, A.A. Starkov, Inhibition of the alternative oxidase stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in plant mitochondria, *FEBS Lett.* 415 (1997) 87–90.
- [36] A.E. Vercesi, I.S. Martins, M.A.P. Silva, H.M.F. Leite, I.M. Cuccovia, H. Chaimovich, PUMPING plants, *Nature* 375 (1995) 24.
- [37] P.R. Rich, W.D. Bonner, The sites of superoxide anion generation in higher plant mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 188 (1978) 206–213.
- [38] A.C. Purvis, R.L. Shewfelt, J.W. Gegogine, Superoxide production by mitochondria isolated from green bell pepper fruit, *Physiol. Plant.* 94 (1995) 743–749.
- [39] S.I. Liochev, I. Fridovich, The role of O<sub>2</sub>– in the production of HO•: in vitro and in vivo, *Free Radic. Biol. Med.* 16 (1994) 29–33.
- [40] D.D. Thomas, L.A. Ridnour, M.G. Espey, S. Donzelli, S. Ambis, S.P. Hussain, C.C. Harris, W. DeGraff, D.D. Roberts, J.B. Mitchell, D.A. Wink, Superoxide fluxes limit nitric oxide-induced signaling, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 25984–25993.
- [41] L.V. Modolo, O. Augusto, I.M. Almeida, J.R. Magalhaes, I. Salgado, Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3814–3820.
- [42] E. Planchet, K.J. Gupta, M. Sonoda, W.M. Kaiser, Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport, *Plant J.* 41 (2005) 732–743.
- [43] F.J. Corpas, J.B. Barroso, A. Carreras, M. Quiros, A.M. Leon, M.C. Romero-Puertas, F.J. Esteban, R. Valderrama, J.M. Palma, L.M. Sandalo, M. Gómez, L.A. del Rio, Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2722–2733.
- [44] S. Jaisid, M. Simontacchi, C.G. Bartoli, S. Puntarulo, Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species and chloroplastic lipids and proteins, *Plant Physiol.* 142 (2006) 1246–1255.
- [45] H. Yamasaki, Y. Sakihama, 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 (2000) 89–92.
- [46] C. Stöhr, F. Strube, G. Marx, W.R. Ullrich, P. Rockel, A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite, *Planta* 212 (2001) 835–841.

## Supplementary data



**Fig. S1.** Effect of NO released from GSNO on O<sub>2</sub> consumption by potato tuber mitochondria energized with different respiratory substrates. Isolated mitochondria were incubated under the same conditions as those described in Fig. 1, except that GSNO (100 μM) was used instead of NO. cPTIO (100 μM) was added where indicated. The numbers in parentheses refer to the respiratory rates expressed as ng atom O.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>.



**Fig. S2.** Kinetics of NO degradation by potato tuber mitochondria as a function of NAD(P)H concentration. Potato mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in reaction medium (see Fig. 1) supplemented with different concentrations of (a) NADH or (b) NADPH, as indicated. NO from GSNO (100 μM) was added at the arrow.

## **CAPÍTULO 2**



# NAD(P)H- and superoxide-dependent nitric oxide degradation by rat liver mitochondria

Halley Caixeta Oliveira, Elzira Elisabeth Saviani, Ione Salgado \*

Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6109, Campinas, SP 13083-970, Brazil

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 25 May 2009

Revised 5 June 2009

Accepted 8 June 2009

Available online 12 June 2009

Edited by Stuart Ferguson

### Keywords:

NAD(P)H oxidase

Nitric oxide

Rat liver mitochondria

Superoxide anion

## ABSTRACT

**Mitochondria consume nitric oxide (NO) mainly through reaction with superoxide anion ( $O_2^-$ ). Here, we analyzed the  $O_2^-$  sources for NO degradation by isolated rat liver mitochondria. Electron leakage from complex III and reverse electron transport to complex I accounted for  $O_2^-$ -dependent NO degradation by mitochondria in the presence of a protonmotive force. Mitochondria incubated with NAD(P)H also presented intense  $O_2^-$  generation and NO degradation rates that were insensitive to respiratory inhibitors and abolished after proteinase treatment. These results suggest that an outer membrane-localized NAD(P)H oxidase activity, in addition to the electron leakage from the respiratory chain, promotes  $O_2^-$ -dependent NO degradation in rat liver mitochondria.**

© 2009 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Nitric oxide (NO) is an important signaling molecule in a broad range of mammalian physiological and pathological processes, many of which are directly or indirectly related to mitochondrial function [1]. It has long been known that NO reversibly inhibits cytochrome *c* oxidase (COX), the terminal enzyme of the respiratory chain, by competition with oxygen [2]. This inhibitory effect is considered to be a physiological mechanism for regulating mitochondrial respiration since it allows for an increase in oxygen availability for cells distant from vessels [1]. However, prolonged exposure to NO leads to persistent inhibition of respiratory activity due to S-nitrosylation of complex I and reaction of NO with other mitochondrial enzymes [3]. Therefore, the existence of mechanisms that accelerate NO degradation should be of great importance in preventing the deleterious effects of this radical on mitochondrial function and cellular viability.

In aerobic conditions, NO decay occurs spontaneously due to auto-oxidation, and this reaction is accelerated in mitochondrial membranes because of increased partitioning of NO and oxygen

within the hydrophobic membrane interior [4]. Additionally, the enzymatic oxidation of NO to nitrite by COX has been proposed to be an important physiological mechanism for NO degradation [5]. However, the rapid non-enzymatic reaction of NO with the superoxide anion ( $O_2^-$ ) to form peroxynitrite is thought to represent the main pathway for NO consumption in mammalian and plant mitochondria [6–9]. When mitochondrial respiration is inhibited by NO, this mechanism contributes to NO degradation, thereby releasing the inhibition of COX and reactivating oxygen consumption [6,7,9]. Electron leakage from the ubiquinone cycle of complex III has been considered as the main source of  $O_2^-$  production for NO degradation in mammalian mitochondria [6–8], although other mitochondrial enzymes have been reported to generate  $O_2^-$ , such as complex I, succinate dehydrogenase and cytochrome *b5* reductase [10].

Another major source of  $O_2^-$  in the cell is the NAD(P)H oxidase (NOX) family of enzymes, which catalyze the NAD(P)H-dependent reduction of molecular oxygen to  $O_2^-$  [11]. The first of these enzymes was characterized in the plasma membrane of phagocytes, but expression of six more genes homologous to the first described NOX has recently been identified in many non-phagocytic cells, and the activities of these enzymes have been associated with diverse physiological functions and pathological processes [11]. Using immunofluorescence techniques, it was suggested that two NOX isoforms could be located in the mitochondria [12,13]. However, biochemical evidence for the mitochondrial localization of a NOX has not been demonstrated.

**Abbreviations:** Anti-A, antimycin-A; BSA, bovine serum albumin; COX, cytochrome *c* oxidase; cPTIO, 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide; GSNO, S-nitrosoglutathione; HEPES, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid);  $H_2O_2$ , hydrogen peroxide; NO, nitric oxide; NOX, NADPH oxidase;  $O_2^-$ , superoxide anion; SOD, superoxide dismutase

\* Corresponding author. Fax: +55 19 3521 6149.

E-mail address: [ionesm@unicamp.br](mailto:ionesm@unicamp.br) (I. Salgado).



In the present work, we analyzed the  $O_2^-$  sources for NO degradation in isolated rat liver mitochondria. We observed that a NOX activity unrelated to the respiratory chain, in addition to reverse electron transport from succinate dehydrogenase to complex I and electron leakage from complex III, is involved in  $O_2^-$ -dependent NO degradation. The importance of these activities for mitochondrial NO homeostasis is discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Preparation of mitochondria

Liver mitochondria from 2- to 3-month-old male Wistar rats were isolated by the conventional method of differential centrifugation [14]. Some mitochondrial suspensions were further purified by a discontinuous Percoll gradient (7%, 19%, 52% and 62%). After centrifugation at  $85\,000\times g$  for 12 min, the band of mitochondria was collected, diluted 10-fold in wash medium and centrifuged at  $11\,000\times g$  for 10 min to eliminate the Percoll and collect the purified mitochondria. Respiratory activity was assessed using a Clark oxygen electrode (Yellow Springs Instruments Co., Yellow Springs, OH) in a reaction medium containing 0.125 M sucrose, 10 mM N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid) (HEPES) (pH 7.2), 0.1% bovine serum albumin (BSA), 1 mM phosphate, 0.1 mM ADP, 10 mM malate and 10 mM glutamate. Catalase activity was measured following oxygen production stimulated by 1 mM hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). For treatment with proteinase K, mitochondria were incubated with the enzyme (20  $\mu$ g/100  $\mu$ g mitochondrial protein) for 30 min at 25 °C and then centrifuged at  $12\,000\times g$  for 20 min and the pellet was re-suspended in wash medium. The mitochondrial protein concentration was determined

by the Coomassie Blue binding method, using BSA as a standard [15].

### 2.2. Simultaneous measurement of nitric oxide and oxygen

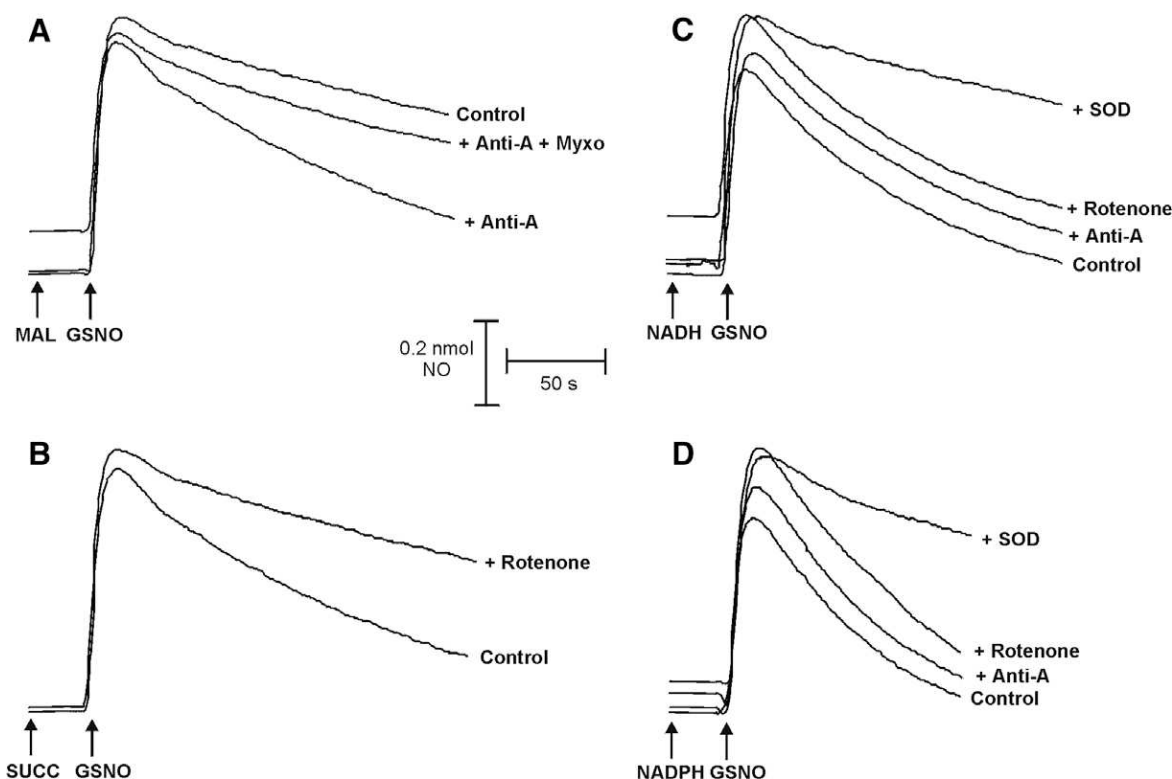
NO and oxygen concentrations were followed simultaneously in the dark at 25 °C, in a closed chamber NOCHM-4 (World Precision Instruments, Sarasota, FL) using the electrochemical sensors ISO-NOP and ISO-OXY-2, respectively, connected to an Apollo 4000 free radical analyzer (World Precision Instruments). The rate of NO degradation was quantified during the first 30 seconds of NO decay. The stock solution of S-nitrosoglutathione (GSNO) was synthesized as described elsewhere [16] and then exposed to light for 1 h in order to produce a solution of approximately 0.7–1.0 mM NO. Alternatively, a saturated NO solution ( $\sim 1.7$  mM) was prepared by bubbling NO gas through argon-purged phosphate buffer in a rubber-sealed vial.

### 2.3. Detection of superoxide anion production

Superoxide anion production was estimated in the presence of superoxide dismutase (SOD) following its dismutation to  $H_2O_2$ , which was detected by the Amplex Red assay using a Hitachi F-4500 spectrofluorometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) as described by de Oliveira et al. [9].

### 2.4. Data analysis

The results are representative of at least three mitochondrial preparations. Where appropriate, the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation of experiments ( $n = 3$ –5) from a



**Fig. 1.** NO degradation by isolated rat liver mitochondria. Mitochondrial suspensions (0.25 mg/mL) were incubated in reaction medium containing 0.125 M sucrose, 10 mM HEPES (pH 7.2) and 0.1% BSA in the presence of (A) 10 mM malate plus 10 mM glutamate (MAL), (B) 5 mM succinate (SUCC), (C) 200  $\mu$ M NADH or (D) NADPH. Where indicated, 500 U of SOD/mL, 10  $\mu$ M rotenone, 10  $\mu$ M Anti-A or 10  $\mu$ M myxothiazol were added. GSNO (200  $\mu$ M) was used as an NO donor.

representative mitochondrial preparation. Statistical analyses were done using Student's *t*-test with  $P < 0.05$  indicating significance.

### 3. Results

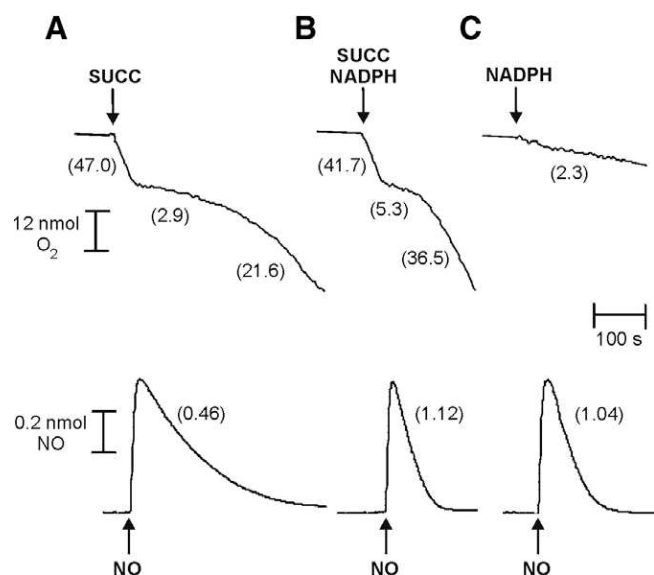
#### 3.1. NO degradation

As shown in Fig. 1A, GSNO addition to rat liver mitochondria with a malate-dependent protonmotive force generated a peak of NO that was subsequently degraded at a slow rate of  $0.31 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , which was practically the same as the basal rate presented by non-respiring mitochondria ( $0.28 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ). NO consumption was increased to  $0.45 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  when electron leakage from complex III was favored by antimycin-A (Anti-A) treatment. This stimulatory effect was abolished when mitochondria were previously incubated with myxothiazol, which prevents the formation of unstable ubisemiquinone [10].

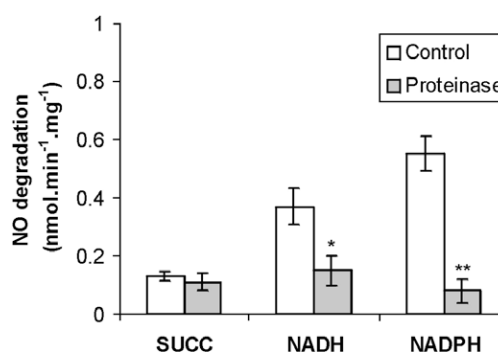
In absence of inhibitors, but presence of a succinate-dependent protonmotive force, mitochondria degraded NO at  $0.49 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  and this rate was reduced to the basal levels in the presence of rotenone (Fig. 1B). Since rotenone blocks the reverse electron transport from succinate dehydrogenase to complex I [10], the involvement of  $\text{O}_2^-$  generated by this pathway in succinate-mediated NO degradation can be suggested.

As shown in Fig. 1C and D, when incubated with NADH or NADPH, mitochondria presented higher rates of NO degradation ( $0.67$  and  $1.40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , respectively) in comparison to those observed in the presence of respiratory substrates. Addition of Anti-A or rotenone did not have any effect on NO degradation in mitochondria incubated with NAD(P)H, suggesting that this activity is not associated with the electron leakage from the respiratory chain. NAD(P)H-mediated NO consumption was inhibited when  $\text{O}_2^-$  was removed from the reaction medium by incubation with SOD, demonstrating the importance of  $\text{O}_2^-$  in this mechanism of NO degradation.

Simultaneous measurement of NO and oxygen concentrations in the reaction medium showed that the addition of an aliquot of



**Fig. 2.** NO degradation and oxygen consumption by rat liver mitochondria. Mitochondrial suspensions ( $0.5 \text{ mg/mL}$ ) were incubated in the reaction medium as described in Fig. 1 in the presence of (A)  $5 \text{ mM}$  succinate, (B)  $5 \text{ mM}$  succinate plus  $200 \text{ }\mu\text{M}$  NADPH or (C)  $200 \text{ }\mu\text{M}$  NADPH. An aliquot of NO saturated solution ( $\sim 1.0 \text{ }\mu\text{M}$ ) was added after mitochondria had consumed less than 5% of the oxygen in the medium. The numbers in parentheses refer to the NO degradation and oxygen consumption rates expressed as  $\text{nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ .



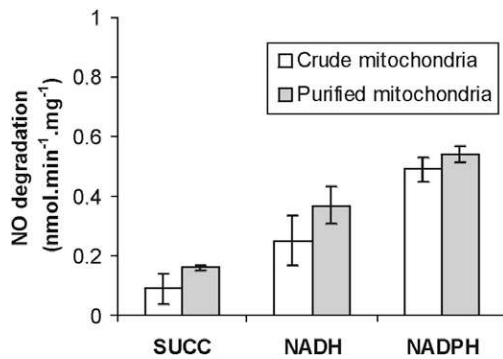
**Fig. 3.** Effect of treatment of rat liver mitochondria with proteinase K on NO degradation. Mitochondrial suspensions ( $0.25 \text{ mg/mL}$ ) untreated (control) or treated with proteinase K (proteinase) were incubated in the conditions described in Fig. 1. GSNO ( $200 \text{ }\mu\text{M}$ ) was used as an NO donor. Basal NO decay was discounted from the data. \* $P < 0.003$ , \*\* $P < 0.0001$ .

NO saturated solution inhibited oxygen consumption by mitochondria with a succinate-dependent protonmotive force, due to the reversible NO binding to COX [2], and then NO was degraded at a rate of  $0.46 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  (Fig. 2A). When mitochondria respiring with succinate were pre-incubated with NADPH, NO was degraded at a higher rate ( $1.12 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), resulting in a rapid recovery of respiratory activity (Fig. 2B). NADPH accelerated NO consumption even in absence of succinate ( $1.04 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ), a situation in which oxygen uptake by mitochondria is negligible, showing that this mechanism of NO degradation is independent of the respiratory chain (Fig. 2C). When GSNO was used as an NO donor, the results were similar to those obtained with pure NO, although NO decay rates were about 25% slower, probably due to some NO release by GSNO during the experiment (Supplementary Fig. S1). Moreover, the inhibitory effect of GSNO on oxygen consumption was reverted by 2-(4-carboxyphenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide (cPTIO), indicating that the effect of GSNO was mediated by NO (Supplementary Fig. S1).

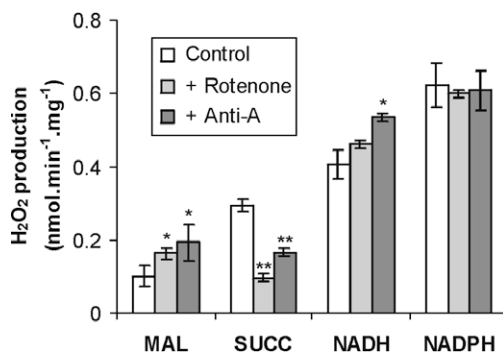
In order to further characterize the NAD(P)H-dependent mechanism of NO consumption, mitochondrial suspensions were incubated with proteinase K, an enzyme that digests proteins located in the outer membrane of intact mitochondria [17]. As shown in Fig. 3, NAD(P)H-mediated NO degradation decreased to basal rates after proteinase K treatment. This treatment did not have any significant effect ( $P = 0.66$ ) on NO degradation observed in the presence of succinate (Fig. 3) and on oxygen consumption by mitochondria respiring with malate (not shown). Additionally, in order to eliminate the possibility that this activity could result from a contaminant organelle, mitochondrial suspensions were purified using a Percoll gradient. This method increased the respiratory control ratio of mitochondria respiring with malate from  $3.37 \pm 0.37$  to  $5.94 \pm 0.90$  and decreased the catalase activity from  $8.63 \pm 1.35$  to  $3.96 \pm 0.86 \text{ mmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , demonstrating that it yielded mitochondrial suspensions with a higher degree of intactness and with less contaminants. Despite this, in comparison to crude mitochondria, purified mitochondrial suspensions did not have significantly different ( $P > 0.1$ ) NAD(P)H-mediated NO degradation (Fig. 4). These results suggested that the NO degradation activity coupled to NAD(P)H oxidation by intact rat liver mitochondria is located in the outer mitochondrial membrane and cannot be attributed to contaminant organelles in mitochondrial suspensions.

#### 3.2. Superoxide anion production

Superoxide generation by rat liver mitochondria was assessed based on  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentration (Fig. 5). Mitochondria with a malate-



**Fig. 4.** Effect of purification of isolated rat liver mitochondria with a Percoll gradient on NO degradation. Crude or purified mitochondria (0.25 mg/mL) were incubated in the conditions described in Fig. 1 and GSNO was used at 200  $\mu$ M. Basal NO decay was discounted from the data.



**Fig. 5.** Peroxide production by rat liver mitochondria. Percoll-purified mitochondrial suspensions (0.25 mg/mL) were incubated in the reaction medium described in Fig. 1 supplemented with 100 U of SOD/mL, 1 U of horseradish peroxidase/mL and 25  $\mu$ M Amplex Red, in the presence of 10 mM malate plus 10 mM glutamate (MAL), 5 mM succinate (SUCC), 200  $\mu$ M NADH or NADPH. The rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in the presence of 10  $\mu$ M Anti-A and 10  $\mu$ M rotenone were compared to those without inhibitors (control). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.0005$ .

or succinate-dependent protonmotive force produced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> at rates of  $0.10 \pm 0.03$  and  $0.29 \pm 0.02$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by mitochondria respiring with succinate was inhibited by rotenone, confirming that the reverse electron transport is the main source for O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation in the presence of this substrate. Additionally, rotenone led to a slight increase in malate-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, which is in accordance with the fact that this drug also favors electron leakage by forward electron transport in complex I [10]. A stimulatory effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was also observed by addition of Anti-A, corroborating the importance of complex III in O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation.

In the presence of NADH or NADPH, higher amounts of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $0.41 \pm 0.04$  and  $0.62 \pm 0.06$  nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>, respectively) were produced, when compared to those generated by mitochondria respiring with succinate or malate, which is in accordance with the accelerated NAD(P)H-mediated NO degradation (Figs. 1–4). In contrast to what was observed in the presence of the respiratory substrates, NADPH-mediated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was not significantly affected by rotenone or Anti-A ( $P > 0.6$ ), demonstrating that O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation is not associated with electron leakage from the respiratory chain in this case. In the presence of NADH, a slight stimulatory effect of these drugs on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was observed. However, the percentage increases in the presence of NADH caused by rotenone and Anti-A (13% and 31%, respectively) were much lower than those observed in mitochondria respiring with malate (62% and 93%) and may result from NADH oxidation

by complex I from a small subpopulation of ruptured mitochondria.

#### 4. Discussion

Studies carried out mainly with rat heart or liver submitochondrial particles [6,7] or with purified bovine heart succinate-cytochrome *c* reductase [8] suggested that the non-enzymatic reaction of NO with O<sub>2</sub><sup>-</sup> generated by electron leakage from the ubiquinone cycle of complex III is the major pathway for NO utilization by mitochondria. Here, we show one previously unrevealed source for O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation and NO degradation in isolated rat liver mitochondria that is independent of the respiratory chain. In the presence of NAD(P)H, accelerated rates of O<sub>2</sub><sup>-</sup> production and NO degradation were detected and were completely insensitive to drugs that have known effects on stimulating or preventing electron leakage from respiratory complexes (Figs. 1 and 5). The independence of this NAD(P)H-mediated activity in relation to the respiratory complexes was further evidenced by the treatment of mitochondria with proteinase K, which abolished the NAD(P)H-mediated NO degradation but did not have any effect in the NO degradation by mitochondria respiring with succinate (Fig. 3). The sensitivity of O<sub>2</sub><sup>-</sup>-dependent NO degradation to proteinase K in the presence of NAD(P)H also suggested that a protein is responsible for this activity and probably located in the outer mitochondrial membrane.

Using different respiratory substrates and inhibitors, we could also show the contribution of electron leakage from the respiratory chain in NO degradation. In addition to the previously described involvement of Anti-A-stimulated and myxothiazol-sensitive O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by complex III in NO degradation [6,8], we observed rotenone-sensitive H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and NO consumption by mitochondria with a succinate-dependent protonmotive force (Figs. 1 and 5), indicating that reverse electron transport to complex I can also account for O<sub>2</sub><sup>-</sup>-dependent NO degradation by intact rat liver mitochondria. These results are in accordance to the increasing evidence that complex I is the main source of O<sub>2</sub><sup>-</sup> formation in intact mammalian mitochondria [18].

An NAD(P)H-cytochrome *b5* reductase has been described in the outer mitochondrial membrane of rat liver and other mammalian tissues [19]. Purified cytochrome *b5* reductase of sheep liver was shown to produce O<sub>2</sub><sup>-</sup> using NAD(P)H as a substrate [20]. A neuronal plasma membrane-bound cytochrome *b5* reductase was also demonstrated to present O<sub>2</sub><sup>-</sup> generating activity [21]. However, in both studies, the enzyme was shown to preferentially oxidize NADH over NADPH to generate O<sub>2</sub><sup>-</sup>. In the present study, higher amounts of O<sub>2</sub><sup>-</sup> were produced by NADPH, suggesting that this activity cannot be completely attributed to a cytochrome *b5* reductase, despite some involvement of this enzyme, especially in NADH-mediated O<sub>2</sub><sup>-</sup> generation, cannot be excluded.

In mammals, O<sub>2</sub><sup>-</sup> can be generated using NADPH as the preferred substrate by the NOX family members, although these enzymes can also oxidize NADH to a lesser extent [22]. NOX are usually associated with the plasma membrane, but the occurrence of two mitochondrial NOX isoforms in osteosarcoma and vascular smooth muscle cells was recently suggested by studies using immunofluorescence techniques [12,13]. In accordance with these works, the present study may provide biochemical evidence for the existence of a NOX activity in the outer mitochondrial membrane of rat liver cells.

Recently, reactive oxygen species have been recognized as important intracellular messengers in diverse physiological functions, instead of having a merely cytotoxic and pathological role [11,23]. In this way, O<sub>2</sub><sup>-</sup> production by a NOX activity in mitochondria could have a signaling role in many processes, such as oxygen sensing, permeability transition pore formation and apoptosis [23].

Our results suggest that this activity may also have a role in the control of mitochondrial NO homeostasis, by modulating the steady state levels of NO, and consequently regulatory or toxic effects on mitochondrial and cellular functions.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Ohara Augusto for providing the NO saturated solution. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Grant No. 05/54246-4). H.C.O. is supported by a student fellowship from FAPESP and I.S. is supported by a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

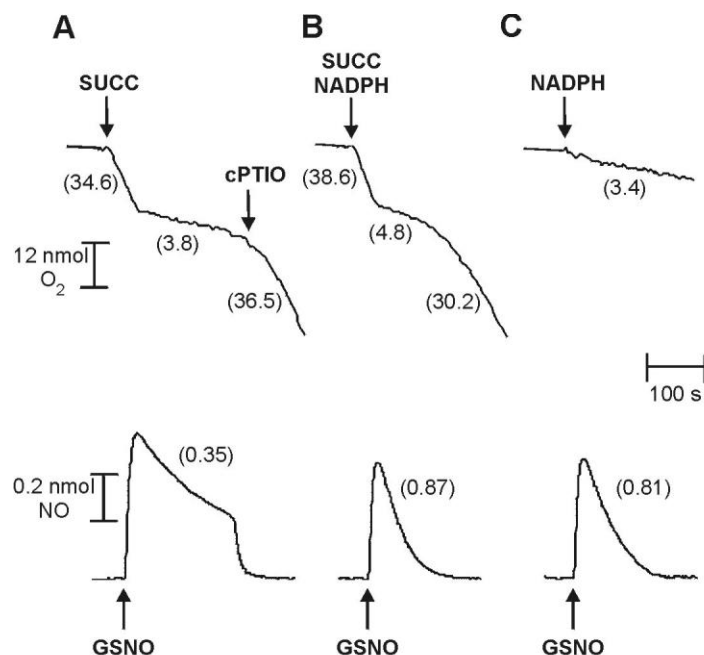
## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.febslet.2009.06.012.

## References

- [1] Poderoso, J.J. (2009) The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 484, 214–220.
- [2] Brown, G.C. and Cooper, C.E. (1994) Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibits synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356, 295–298.
- [3] Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M. and Moncada, S. (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7631–7636.
- [4] Shiva, S., Brookes, P.S., Patel, R.P., Anderson, P.G. and Darley-Usmar, V.M. (2001) Nitric oxide partitioning into mitochondrial membranes and the control of respiration at cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7212–7217.
- [5] Cooper, C.E. (2002) Nitric oxide and cytochrome oxidase: substrate, inhibitor or effector? *Trends Biochem. Sci.* 27, 33–39.
- [6] Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobó, N., Schöpfer, F. and Boveris, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 85–92.
- [7] Poderoso, J.J., Lisdero, C., Schöpfer, F., Riobó, N., Carreras, M.C., Cadenas, E. and Boveris, A. (1999) The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* 274, 37709–37716.
- [8] Chen, Y.R., Chen, C.L., Yeh, A., Liu, X. and Zweier, J.L. (2006) Direct and indirect roles of cytochrome *b* in the mediation of superoxide generation and NO catabolism by mitochondrial succinate-cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* 281, 13159–13168.
- [9] de Oliveira, H.C., Wulff, A., Saviani, E.E. and Salgado, I. (2008) Nitric oxide degradation by potato tuber mitochondria: evidence for the involvement of external NAD(P)H dehydrogenases. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 470–476.
- [10] Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E. and Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* 70, 200–214.
- [11] Lambeth, J.D. (2002) Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Curr. Opin. Hematol.* 9, 11–17.
- [12] Desouki, M.M., Kulawiec, M., Bansal, S., Das, G.M. and Singh, K.K. (2005) Cross talk between mitochondria and superoxide generating NADPH oxidase in breast and ovarian tumors. *Cancer Biol. Ther.* 4, 1367–1373.
- [13] Wosniak, J.J., Santos, C.X., Kowaltowski, A.J. and Laurindo, F. (2009) Cross-talk between mitochondria and NADPH oxidase: effects of mild mitochondrial dysfunction on angiotensin II-mediated increase in Nox isoform expression and activity in vascular smooth muscle cells. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 1265–1278.
- [14] de Oliveira, H.C., Saviani, E.E., de Oliveira, J.F.P. and Salgado, I. (2007) Cyclosporin A inhibits calcium uptake by *Citrus sinensis* mitochondria. *Plant Sci.* 172, 665–670.
- [15] Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- [16] Mathews, W.R. and Kerr, S.W. (1993) Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267, 1529–1537.
- [17] Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E. and Pfanner, N. (2001) Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J. Cell Biol.* 152, 289–300.
- [18] Brand, M.D., Affourtit, C., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Pakay, J.L. and Parker, N. (2004) Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 755–767.
- [19] Nishino, H. and Ito, A. (1986) Subcellular distribution of OM cytochrome b-mediated NADH-semidehydroascorbate reductase activity in rat liver. *J. Biochem.* 100, 1523–1531.
- [20] Whatley, S.A., Curti, D., Das Gupta, F., Ferrier, I.N., Jones, S., Taylor, C. and Marchbanks, R.M. (1998) Superoxide, neuroleptics and the ubiquinone and cytochrome *b5* reductases in brain and lymphocytes from normals and schizophrenic patients. *Mol. Psychiatr.* 3, 227–237.
- [21] Samhan-Arias, A.K., Garcia-Bereguain, M.A., Martin-Romero, F.J. and Gutierrez-Merino, C. (2009) Clustering of plasma membrane-bound cytochrome *b5* reductase within 'lipid raft' microdomains of the neuronal plasma membrane. *Mol. Cell. Neurosci.* 40, 14–26.
- [22] Bedard, K. and Krause, K.H. (2007) The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 87, 245–313.
- [23] Zorov, D.B., Bannikova, S.Y., Belousov, V.V., Vyssokikh, M.Y., Zorova, L.D., Isaev, N.K., Krasnikov, B.F. and Plotnikov, E.Y. (2005) Reactive oxygen and nitrogen species: friends or foes? *Biochemistry* 70, 215–221.

## Supplementary data



**Fig. S1.** NO degradation and oxygen consumption by rat liver mitochondria using GSNO as NO donor. Mitochondrial suspensions (0.5 mg/mL) were incubated in the conditions described in Fig. 2. GSNO (200  $\mu$ M) was added after mitochondria had consumed less than 5% of the oxygen in the medium. The numbers in parentheses refer to the NO degradation and oxygen consumption rates expressed as  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

## **CAPÍTULO 3**





## Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants

Halley Caixeta Oliveira<sup>a</sup>, Gilberto Costa Justino<sup>b</sup>, Ladaslav Sodek<sup>b</sup>, Ione Salgado<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Fisiologia Vegetal, Instituto de Biologia, CP 6109, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP, 13083-970, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 26 June 2008

Received in revised form 5 September 2008

Accepted 28 September 2008

Available online 17 October 2008

#### Keywords:

Amino acid content

*Arabidopsis thaliana*

*nia1 nia2* mutant

Nitrate reductase

Nitric oxide

*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*

### ABSTRACT

Nitrate reductase (NR) double-deficient *Arabidopsis thaliana* (*nia1 nia2*) was previously shown to be susceptible to *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm). This abnormal phenotype was proposed to be caused by low endogenous levels of nitric oxide (NO). Amino acid contents are also reduced in the leaves of *nia1 nia2* plants, suggesting an alternative cause for their pathogen susceptibility. In order to determine whether deficient nitrogen assimilation could account for impaired response to Psm, NR-deficient plants were cultivated with glutamine or arginine to increase the leaf amino acid contents to levels similar to or higher than wild-type plants. Despite this, the amino acid-recovered *nia1 nia2* plants did not develop the hypersensitive response when infiltrated with an avirulent Psm, and severe evolution of disease symptoms and intense bacterial growth occurred in the leaves. The reduced NO emission by *nia1 nia2* leaves, determined by the free form of the 4,5-diaminofluorescein probe, did not change significantly in amino acid-recovered mutants, nor did NO levels increase substantially upon Psm inoculation as in wild-type plants. These results suggest that the susceptibility to Psm of *nia1 nia2* does not result from deficient amino acid content and may instead be a consequence of the reduced ability to synthesize NO.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The nitrate reductase (NR) enzyme catalyzes the reduction of nitrate to nitrite by an NAD(P)H-dependent mechanism [1]. Nitrite is further reduced by nitrite reductase into ammonium, which can be incorporated into amino acids and other nitrogen compounds [2]. Thus, NR is an essential enzyme for nitrogen assimilation in plants, promoting their normal growth and development. Under some circumstances, NR can also catalyze the monoelectronic reduction of nitrite, resulting in the production of nitric oxide [3,4]. The biological relevance of this activity is supported by the finding that NO emission is reduced in NR-deficient plants [5,6]. However, although *Arabidopsis thaliana* deficient in the two structural genes for NR (*nia1 nia2*) have reduced levels of nitrite and nitric oxide (NO) compared to wild-type plants, they are still able to produce this radical when nitrite is exogenously provided [7]. Therefore, it was proposed that

the reduced NO production observed in NR-deficient plants could be due to low endogenous levels of nitrite [7].

The mechanisms by which NO is generated from nitrite reduction in plants are not completely elucidated, but this activity has been described in mitochondria [7,8] and chloroplasts [9] and as a result of a nitrite:NO-reductase located in the plasma membrane of roots [10]. NO can also be synthesized by spontaneous nitrite reduction in the acidic environment of the apoplast [11].

In mammals, a major substrate for NO synthesis is L-arginine (Arg), in a reaction catalyzed by a family of NO synthase enzymes [12]. Although a homologous gene to NO synthase has not yet been identified in plants, the production of NO from Arg oxidation by an enzyme functionally similar to mammalian NO synthase has been proposed [13]. The *nia1 nia2* mutant presents a very low content of amino acids in their leaves [14], which could be a result of its limited capacity for nitrogen assimilation. Arg is one of the amino acids that is most reduced in *nia1 nia2* mutant, about 10-fold compared to wild-type [14]. These observations suggested that the reduced capacity for NO production of NR-deficient plants could result not only from the reduced content of nitrite but also from the low levels of Arg in this mutant [15].

\* Corresponding author. Tel.: +55 19 3521 6149; fax: +55 19 3521 6129.

E-mail address: [ionesm@unicamp.br](mailto:ionesm@unicamp.br) (I. Salgado).

Abbreviations: Arg, arginine; cfu, colony forming units; DAF-2, 4,5-diaminofluorescein; Gln, glutamine; HR, hypersensitive response; NO, nitric oxide; NR, nitrate reductase; Psm, *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

NO acts as a signaling molecule in a broad range of plant growth and development processes, including photosynthesis, stomatal movement, seed dormancy, germination, flowering and growth of the polinic tube (see [16] and references therein). NO is also a mediator in plant defense responses to biotic or abiotic stresses [17,18]. NO production is increased in several plant–pathogen interactions, stimulating the expression of defense-related genes and the synthesis of compounds with antimicrobial activity [19,20]. Moreover, NO, together with reactive oxygen species, is involved in the hypersensitive response (HR), a localized cell death that occurs in the host tissue during incompatible interactions [21].

Recent studies have shown that the *nia1 nia2* mutant of *A. thaliana* presents an impaired response to an avirulent strain of the bacteria *Pseudomonas syringae* [14]. It was proposed that this susceptibility could result from the lower endogenous content of NO in the NR double-deficient plants [7,14]. However, the *nia1 nia2* mutant also has reduced amino acid content [14], raising the possibility that metabolic changes resulting from deficient nitrogen assimilation could account for the susceptibility to bacterial infection. In order to test this possibility, a protocol was developed to rescue amino acid levels in the *nia1 nia2* mutant of *A. thaliana*. Amino acid-recovered plants were analyzed for NO production and defense responses against avirulent and virulent strains of *P. syringae*. The results show that *nia1 nia2* plants have a decreased production of endogenous NO and remain susceptible to infection even when amino acid levels are recovered by glutamine or arginine treatment.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Plant growth conditions

Wild-type and NR-deficient plants of *A. thaliana* L. ecotype Columbia-0 were used for the experiments. Five-week-old plants were used for all experiments. The genotype of the NR double-deficient plants (*nia1 nia2*) was the G' 4-3 mutant obtained by Wilkinson and Crawford [22] that retains only 0.5% of leaf NR activity. The seeds were germinated aseptically in vermiculite:perlite (1:1) in a growth chamber at 24 °C and a 12 h photoperiod. *nia1 nia2* plants were irrigated with a medium containing 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.5 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 2.5 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 mM  $\text{MgSO}_4$  and 0.5 mM  $\text{CaCl}_2$  and micronutrients as described by Wilkinson and Crawford [23]. Wild-type plants were cultivated with the same medium plus 10 mM  $\text{KNO}_3$ . For the recovery of amino acid levels of the *nia1 nia2* mutant, 10 mM glutamine or 10 mM arginine was added to the medium.

### 2.2. Analysis of amino acid content

Free amino acids were extracted by homogenizing 200 mg of frozen leaf tissue in a mortar with 2 mL of a solution of methanol/chloroform/water (12:5:3, v/v). The resulting homogenate was incubated at room temperature for 24 h and then centrifuged for 30 min at  $1500 \times g$ . The supernatant was collected and mixed with chloroform and water (4:1:1.5, v/v/v). After 24 h, the aqueous phase was separated and maintained at 37 °C for 15 h. The amino acid content was then analyzed by reverse-phase HPLC after derivatization with *o*-phthalaldehyde, as described elsewhere [24].

### 2.3. Bacterial culture and inoculation

Two strains of *P. syringae* pv. *maculicola* ES4326 were used: avirulent, which carries the gene *avrRpm1*, and virulent, which lacks the gene *avrRpm1*. Bacteria were grown at 28 °C in King's B

medium containing 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  rifampicin, 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  streptomycin and 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  kanamycin (avirulent) or just 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  rifampicin (virulent). After 48 h, bacteria were collected and diluted in water to the desired concentrations. Bacterial suspensions were infiltrated into the abaxial surface of *A. thaliana* leaves using a syringe without a needle. Macroscopic symptoms developed throughout the infection were documented with a Canon Power Shot A95 camera coupled to a Labomed stereomicroscope.

### 2.4. Cell death visualization

*A. thaliana* leaves were immersed for 1 min in a boiling solution of lactophenol containing 0.25 mg  $\text{mL}^{-1}$  trypan blue [25]. The tissues were incubated for 4 min in ethanol/lactophenol (2:1) and stored in 50% ethanol. Treated leaves were mounted on microscope slides and examined using a Nikon Alphaphot-2 YS2-H microscope equipped with a Canon Power Shot A95 camera.

### 2.5. Bacterial growth in leaves

Bacterial growth in *A. thaliana* leaves was estimated by homogenizing leaf discs from infiltrated areas in water and plating the homogenate on King's B medium containing the appropriate antibiotics. Colonies were counted 2–3 days after plating.

### 2.6. NO emission by *A. thaliana* leaves

NO emission by *A. thaliana* leaves was analyzed using the fluorescent indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2), following the method of Ye and collaborators [26], with some modifications. Intact leaves (40 mg) were incubated under dark conditions in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) containing 50  $\mu\text{M}$  DAF-2. After 1 h, the leaves were discarded, and the resultant solution was diluted 5-fold in phosphate buffer, resulting in a DAF-2 concentration of 10  $\mu\text{M}$ . Fluorescence emission at 515 nm, upon excitation at 495 nm, was recorded in a Hitachi F-4500 spectrofluorometer (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan). Basal DAF-2 fluorescence in the absence of leaf tissue was subtracted from each sample. Standard curves were obtained by measurement of known concentrations of a NO saturated solution.

### 2.7. Statistical analysis

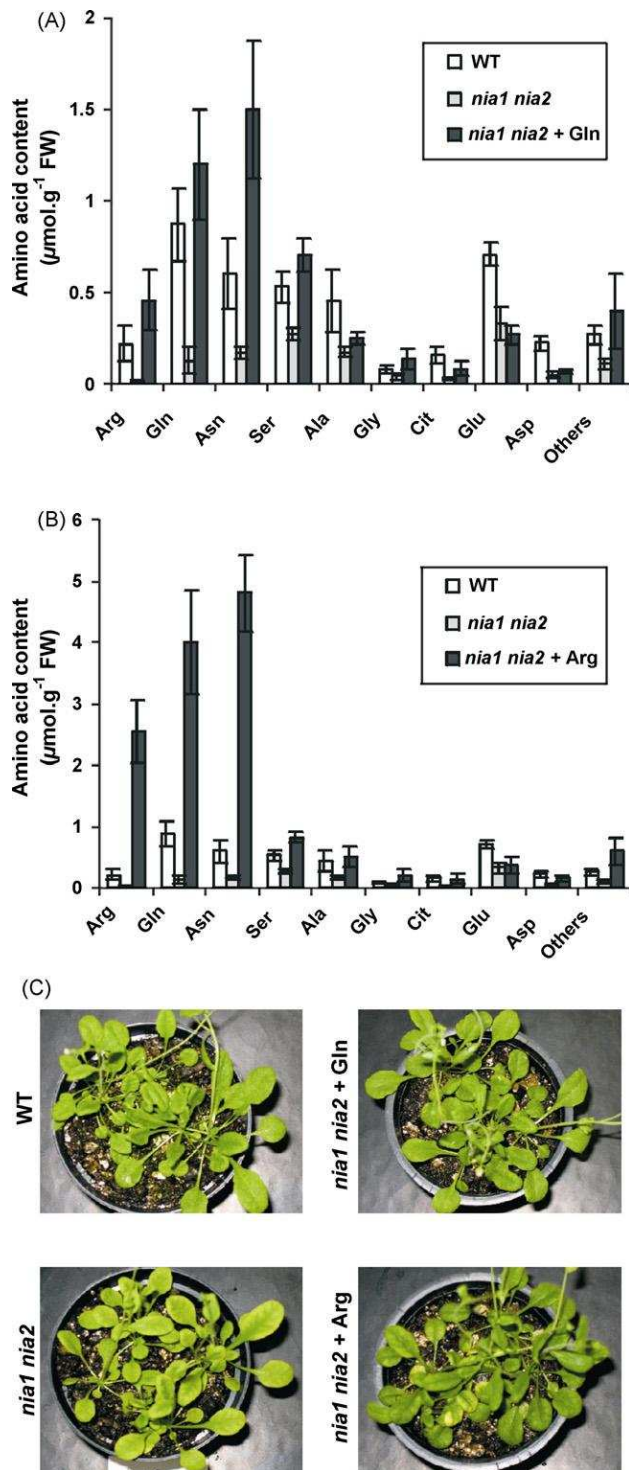
The images presented in the figures are representative of at least three independent experiments, each done in triplicate. Where appropriate, results are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analyses were done using Student's *t*-test, with  $P < 0.05$  indicating significance.

## 3. Results

### 3.1. Recovery of amino acid levels in *nia1 nia2* leaves

The free amino acid contents of *nia1 nia2* leaves were compared to those of wild-type plants (Fig. 1A and B). As previously demonstrated [14], the *nia1 nia2* mutant presented lower levels of all individual amino acids than wild-type leaves. The total amino acid content significantly decreased from  $4.11 \pm 0.61 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$  in wild-type to  $1.32 \pm 0.20 \text{ pmol g}^{-1} \text{ FW}$  in *nia1 nia2* plants ( $P < 0.001$ ). Arginine (Arg), glutamine (Gln) and asparagine (Asn), amino acids important for nitrogen storage and transport [2], were most drastically reduced. The mutant leaves were distinguished by a yellowish appearance (Fig. 1C), probably due to the alterations in carbon metabolism, such as the lower expression of ribulose-1,5-bisphosphate





**Fig. 1.** Effects of glutamine (Gln) or arginine (Arg) treatment on free amino acid content and phenotypic aspect of NR double-deficient *A. thaliana* plants. Amino acid contents (nmol g<sup>-1</sup> fresh weight) in leaves of (A) *nia1 nia2* treated with 10 mM Gln (*nia1 nia2* + Gln) or (B) *nia1 nia2* treated with 10 mM Arg (*nia1 nia2* + Arg), compared to those of wild-type (WT) and untreated *nia1 nia2* mutant (*nia1 nia2*) plants. Data are means  $\pm$  SD of five independent analyses. (C) Aspect of wild-type *A. thaliana* plants in comparison to control and amino acid-treated *nia1 nia2*.

carboxylase/oxygenase, resulting from deficient nitrogen assimilation [6].

As shown in Fig. 1A, when *nia1 nia2* plants were cultivated with 10 mM Gln, there was an increase in individual levels of most

amino acids, especially Arg, Asn, Gln, serine (Ser) and glycine (Gly). Citrulline (Cit) content, although displaying an increase in relation to untreated *nia1 nia2*, was 2-fold lower than that of wild-type leaves. The levels of aspartate (Asp) and glutamate (Glu), which are precursors for the formation of Asn and Gln, respectively [2], did not increase. The total amino acid content in Gln-treated plants was  $5.06 \pm 1.84$  pmol g<sup>-1</sup> FW, which was not significantly different from that of wild-type leaves ( $P = 0.32$ ). Consistent with the increased amino acid levels, plants treated with Gln had larger and greener leaves, which resembled the leaves of wild-type plants (Fig. 1C).

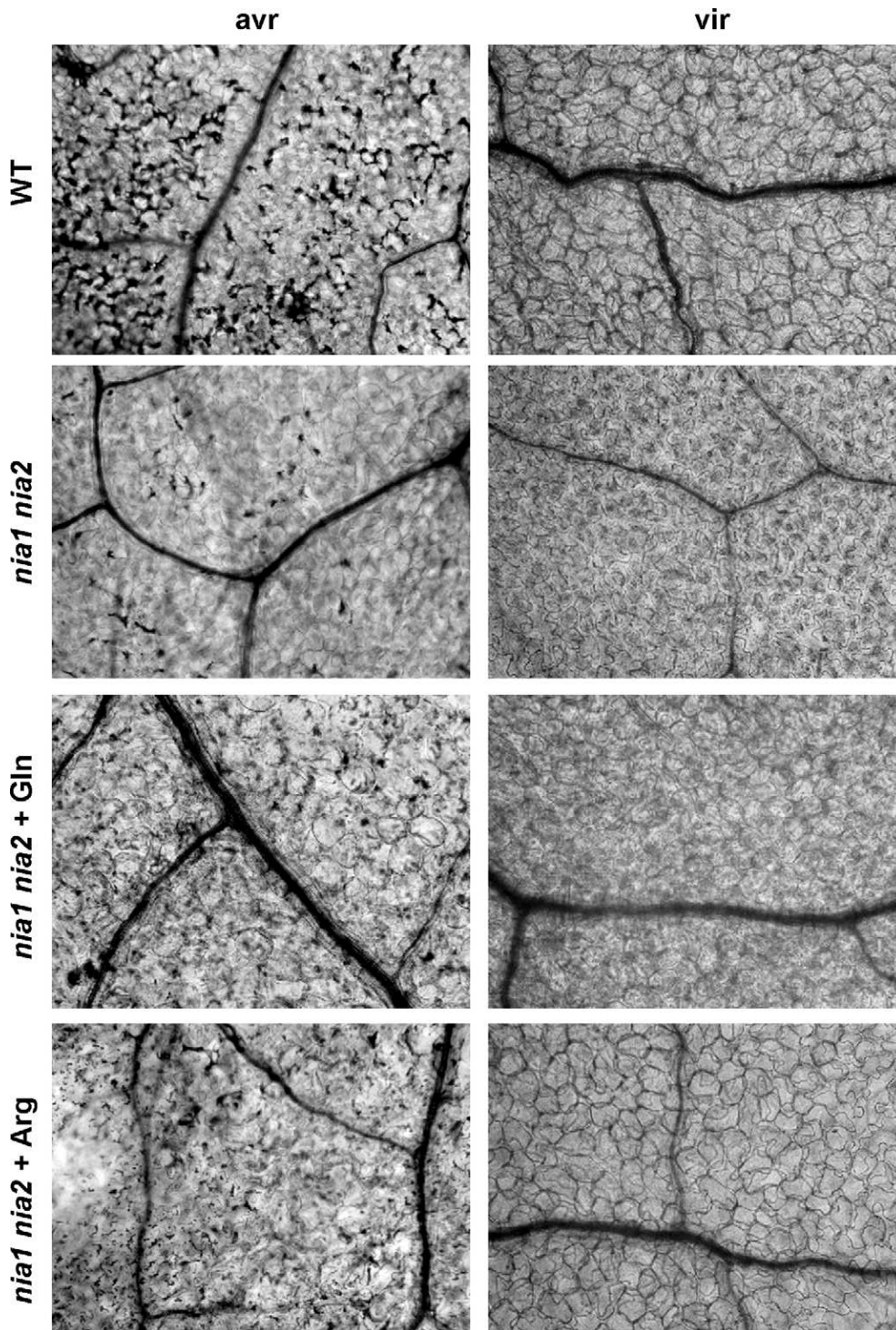
In *nia1 nia2* plants treated with 10 mM Arg (Fig. 1B), there was an increase in not only Arg levels but also in the levels of other amino acids. Arg, Asn, and Gln concentrations were extremely high, with levels around 10-, 8-, and 5-fold higher, respectively, than wild-type. Consequently, the total amino acid content ( $14.16 \pm 4.46$  pmol g<sup>-1</sup> FW) was much higher than that of wild-type leaves ( $P < 0.01$ ). In spite of the very high levels of Arg, Cit content was in the range to that of wild-type leaves. Plants treated with Arg had larger and greener leaves, compared to controls, but they also showed some chlorotic regions (Fig. 1C), suggesting toxicity from the Arg treatment.

### 3.2. Defense responses in amino acid-recovered *nia1 nia2* plants

Defense responses to *P. syringae* pv. *maculicola* (Psm) were analyzed in control and amino acid-recovered *nia1 nia2* plants, and compared to those developed in wild-type leaves (Fig. 2). As expected in an incompatible interaction, infiltration of  $5 \times 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> of an avirulent strain of Psm (avr) led to clear hypersensitive response (HR) induction in wild-type leaves, visualized by the high number of dead cells stained with trypan blue. In contrast, *nia1 nia2* plants presented a much lower density of dead cells when inoculated with the avirulent strain, indicating that the HR was not induced. Similar results were observed in *nia1 nia2* leaves cultivated with Gln or Arg. Additionally, inoculation of a virulent strain of Psm (vir) did not induce HR in any of the analyzed plants. These results suggested that the treatment with amino acids did not rescue HR induction in the *nia1 nia2* mutants.

Forty-eight hours after inoculation with avirulent Psm, *nia1 nia2* plants treated with Gln or Arg developed chlorotic lesions in leaves similar to those observed in the untreated mutant plants, indicating a severe progression of the disease (Fig. 3A). On the other hand wild-type leaves presented lesions with a lighter aspect. Differently, infiltration of virulent strain of Psm led to severe chlorosis in wild-type, as well as in control and amino acid-recovered *nia1 nia2* leaves, symptoms that were clearly seen 72 hours after inoculation (Fig. 3B).

Many studies associate the development of chlorotic lesions with disease progression and bacterial growth in leaves [27,28]. In the present work, when the analysis was carried out six hours after inoculation with the avirulent or virulent strain of Psm, there was not a significant difference in bacterial growth among the plants ( $P > 0.60$ ), indicating that the inoculums initially contained the same concentration of bacteria (Fig. 4). However, 48 h after inoculation, the growth of avirulent Psm was around 10-fold higher in *nia1 nia2* leaves compared to wild-type plants (Fig. 4A). Thus, while  $212 \pm 113$  colonies were obtained from wild-type leaf discs,  $2119 \pm 977$  colonies grew from homogenized *nia1 nia2* leaves. In the case of *nia1 nia2* plants treated with Gln or Arg,  $1872 \pm 713$  and  $2012 \pm 176$  colonies of avirulent Psm were obtained, respectively, values that were not significantly different of that obtained from leaf disks of untreated *nia1 nia2* plants ( $P > 0.57$ ). As expected for a compatible interaction, 48 h after inoculation, the virulent strain displayed an intense growth in leaves of both genotypes, independent of amino acid treatment (Fig. 4B). These results indicate that amino acid treatment did not prevent bacterial growth in *nia1 nia2* leaves, in



**Fig. 2.** Effect of amino acid treatments on hypersensitive response induced by the bacteria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) in *nia1 nia2 A. thaliana* leaves. Cell death was analyzed by treating leaves with lactophenol and trypan blue 24 h after the infiltration with  $5 \times 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> of the avirulent (avr) or virulent (vir) strains of Psm. Leaves from wild-type (WT), untreated *nia1 nia2* mutant (*nia1 nia2*) and *nia1 nia2* mutant plants treated with 10 mM Gln (*nia1 nia2* + Gln) or 10 mM Arg (*nia1 nia2* + Arg) were used. Slides were observed at 10 $\times$  magnification.

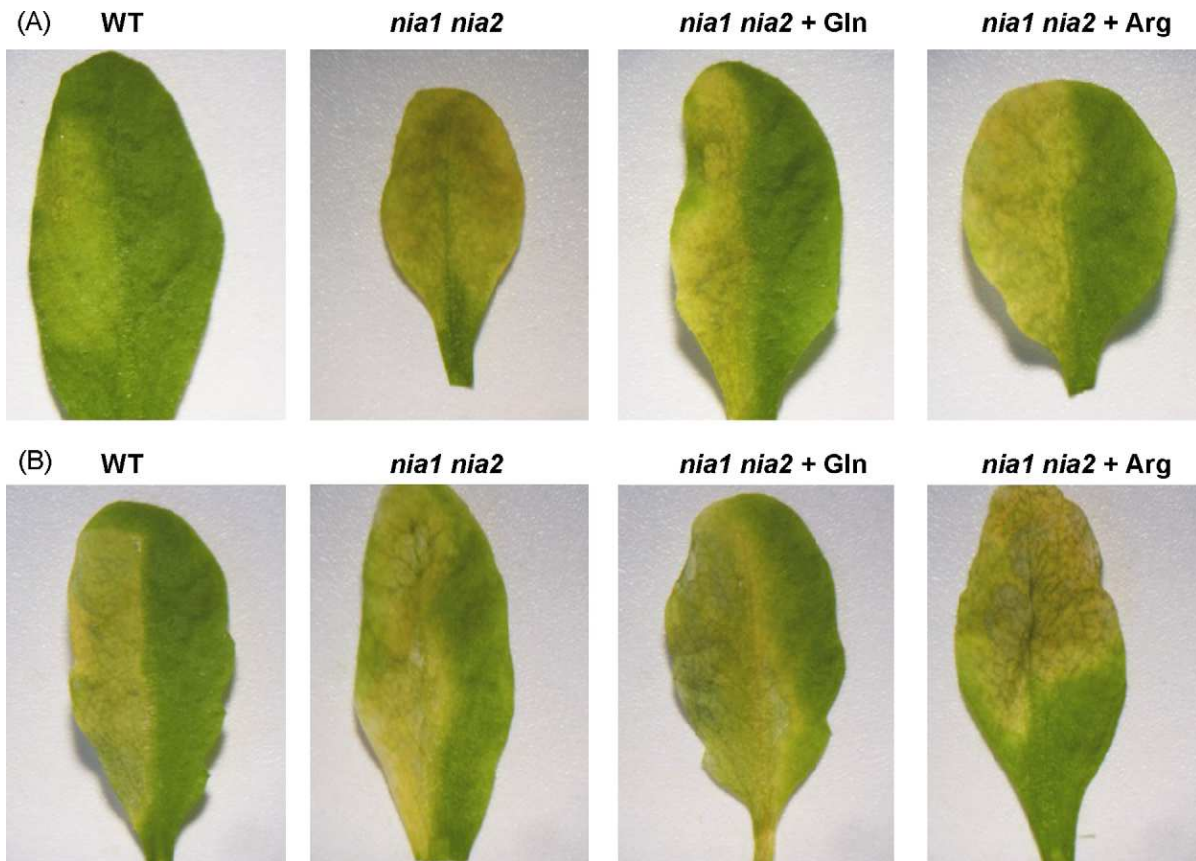
accordance with the absence of HR induction and the severe disease symptoms observed in these plants.

### 3.3. Effect of amino acid recovery on NO emission in the *nia1 nia2* mutant

NO emission by amino acid-recovered *nia1 nia2* plants was evaluated (Fig. 5). Intact leaves were incubated with the

fluorescent probe DAF-2, which does not enter into cells. The use of this method prevents substances inside plant cells, such as ascorbic acid, from interfering with fluorescence measurements [26]. Non-inoculated wild-type leaves (control) emitted significantly higher levels of NO ( $25.4 \pm 7.0$  pmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) compared to *nia1 nia2* plants ( $9.9 \pm 4.5$  pmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>) ( $P < 0.01$ ). NO emission in Gln-treated plants did not differ significantly from untreated *nia1 nia2* mutants ( $P = 0.5$ ), while treatment with Arg led





**Fig. 3.** Effect of amino acid treatments on disease evolution in *nia1 nia2 A. thaliana* leaves infiltrated with Psm. Symptoms were recorded in leaves from wild-type (WT), untreated *nia1 nia2* mutant (*nia1 nia2*) and *nia1 nia2* mutant plants treated with 10 mM Gln (*nia1 nia2* + Gln) or 10 mM Arg (*nia1 nia2* + Arg). (A) 48 h after inoculation with  $5 \times 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> of avirulent Psm; (B) 72 h after inoculation with  $5 \times 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> of virulent Psm.

to a slight increase in basal NO emission by *nia1 nia2* leaves ( $P = 0.1$ ).

When plants were inoculated with avirulent Psm, NO emission in wild-type leaves increased to  $83.3 \pm 14.0$  pmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>, while that of the *nia1 nia2* mutants was only  $20.4 \pm 8.1$  pmol min<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. On the other hand, there were no significant increases in NO emission by leaves of either genotype in response to inoculation with virulent Psm, indicating that this strain was not recognized by the plant. In *nia1 nia2* leaves treated with Gln or Arg, and inoculated with avirulent or virulent Psm, NO emissions were not significantly different from the untreated, inoculated mutant ( $P > 0.18$ ). These results show that the reduced NO emission in *nia1 nia2* plants were not significantly changed by amino acid recovery, even after Psm inoculation.

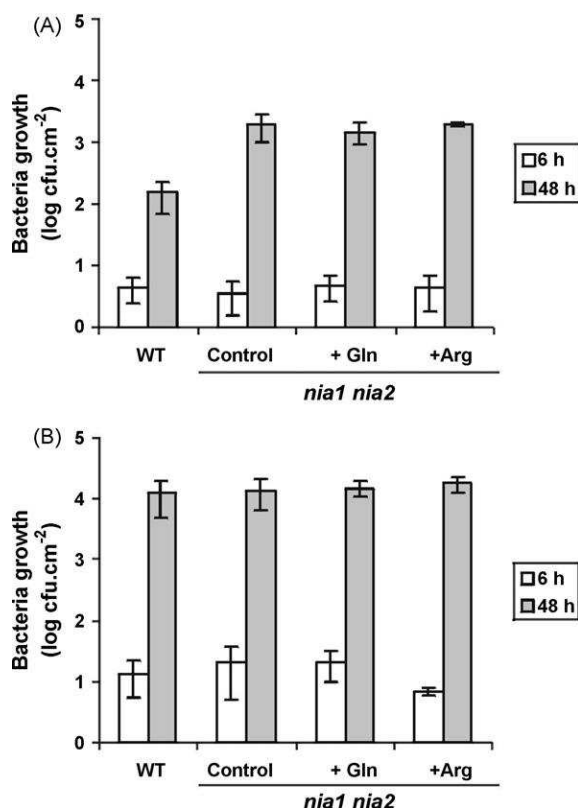
#### 4. Discussion

Since the recognition of NR as an important enzyme in NO homeostasis [29], many investigators have used NR-deficient plants as experimental models to examine NO synthesis and signaling in different species [5–8,30,31]. In particular, studies with *A. thaliana* have associated the impaired pathogen defense response of the *nia1 nia2* mutant with reduced NO synthesis [14]. However, NR deficiency may lead to a wide range of metabolic alterations resulting from the decreased incorporation of nitrogen into amino acids, proteins and other nitrogen-containing compounds. Indeed, *nia1 nia2* plants have yellowish leaves and lower amino acid levels than wild-type plants (Fig. 1 and [14]). This compromised nitrogen assimilation could affect physiological processes and plant responses to biotic stresses, independent of NO

production. Here, a protocol for amino acid recovery in *nia1 nia2* was developed, resulting in plants with a general appearance and amino acid levels similar to wild-type (Fig. 1). However, amino acid-recovered *nia1 nia2* plants did not develop the HR in response to the inoculation of an avirulent strain of Psm (Fig. 2) and showed both the severe symptom evolution (Fig. 3A) and extreme bacterial growth in leaves (Fig. 4A), typical of *nia1 nia2* mutant and of those induced by a virulent strain of Psm (Figs. 2–4B).

Two different treatments were used in order to raise the endogenous amino acid contents of *nia1 nia2* leaves. In a first approach, mutant plants were cultivated with Gln, the primary product of ammonium assimilation by the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle. Gln has a central role in plant metabolism, as it donates the nitrogen for the biosynthesis of other amino acids, nucleic acids and diverse nitrogen-containing compounds [2]. As expected, treatment with Gln efficiently increased *nia1 nia2* amino acid contents to levels comparable to wild-type plants (Fig. 1A). Cultivation of *nia1 nia2* plants with Arg was also sufficient to increase the levels of most amino acids (Fig. 1B), as *A. thaliana* expresses enzymes that allow it to use Arg for the synthesis of other amino acids [32]. However, *nia1 nia2* plants treated with Arg showed extremely high levels of some amino acids, especially those related to nitrogen storage and transport, leading to signs of toxicity (Fig. 1C).

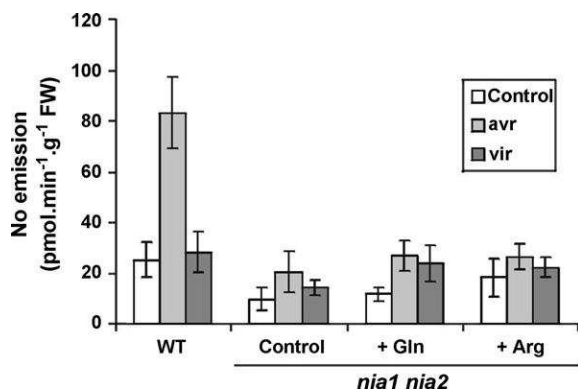
Previous studies with the *nia1 nia2* mutant of *A. thaliana* have demonstrated its low NO content compared to the wild-type, detected by gas spectrometry [33], electron paramagnetic resonance [7] and *in situ* visualization using the diacetate form of the diamino fluorescein probe [14]. Here, as elsewhere [34], the



**Fig. 4.** Effect of amino acid treatments on bacterial growth in *nia1 nia2* *A. thaliana*. Leaves from wild-type (WT), untreated *nia1 nia2* mutant (Control), and *nia1 nia2* mutant plants treated with 10 mM Gln (*nia1 nia2* + Gln) or 10 mM Arg (*nia1 nia2* + Arg) were used. Leaf discs were homogenized 6 or 48 h after inoculation with  $10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> of (A) avirulent or (B) virulent Psm. Data represent mean  $\pm$  SD of three independent analyses ( $n = 8$ ).

lower NO production of *nia1 nia2* mutant in relation to the wild-type plant was further demonstrated by measuring NO emitted from leaves with the free form of the diamino fluorescein probe. By using this method, it was also possible to show that amino acid-recovered *nia1 nia2* leaves continued to have a reduced NO emission (Fig. 5).

Amino acid-recovered *nia1 nia2* leaves also failed to substantially increase NO emission upon avirulent Psm inoculation, a



**Fig. 5.** Effect of amino acid treatments and Psm inoculation on NO emission by *A. thaliana*. NO emission by leaves from wild-type (WT), untreated *nia1 nia2* mutant (Control) and *nia1 nia2* mutant plants treated with 10 mM Gln (*nia1 nia2* + Gln) or 10 mM Arg (*nia1 nia2* + Arg) was analyzed using DAF-2. Basal NO production of non-inoculated leaves was compared to NO emission 6 h after inoculation with  $5 \times 10^6$  cfu mL<sup>-1</sup> of avirulent (avr) or virulent (vir) Psm. Data represent mean  $\pm$  SD of one representative analyses ( $n = 4$ ).

response clearly seen in wild-type plants (Fig. 5). This finding supports the hypothesis that the *nia1 nia2* impaired defense response to avirulent Psm might be associated with their reduced ability to produce NO, as previously proposed [14]. The positive correlation between NO levels and plant defense response against pathogen attack was established in a pioneer study in which the inhibition of NO synthesis compromised HR induction by avirulent Psm in *A. thaliana* leaves, promoting bacterial growth and disease [27]. Recently, by using mutants deficient in NO production and by the expression in the host and/or in the pathogen of proteins with an NO metabolizing activity, the reduction of NO levels *in planta* was shown to negatively affect HR induction and the expression of defense-related genes [28,35,36]. Moreover, transgenic *A. thaliana* plants with higher levels of NO-derived S-nitrosothiols showed enhanced basal resistance to the oomycete *Peronospora parasitica* Noco2 and constitutive expression of pathogenesis-related genes [37].

Diverse works have demonstrated that NR deficiency leads to reduced NO synthesis [5–8,30,31]. In some of these studies, this observation has been considered to indicate that NO production results from the nitrite reducing activity of NR [5,6,30,31]. However, NR deficiency also leads to low endogenous levels of nitrite and Arg, important substrates for NO synthesis, which could explain the reduced NO emission presented by the *nia1 nia2* mutant (Fig. 5, [7,34]). Here, the treatment with Gln, which recovered Arg levels of *nia1 nia2* plants, did not rescue NO production by the *nia1 nia2* mutant. Even *nia1 nia2* plants treated with Arg, which contain very high levels of this amino acid, showed no significant increase in NO emission upon Psm inoculation. Additionally, after amino acid treatments, increases in citrulline contents, that would be the product of a NO synthase activity, were much lower than those of Arg levels. These results suggest that Arg is not the main source for NO production during *A. thaliana*-Psm interaction. This supports the possibility that NO produced in the defensive response is derived mainly from nitrite, as proposed by Modolo et al. [7]. In this previous work, exogenous addition of nitrite led to an increased NO production by *nia1 nia2* leaf homogenates, detected by electron paramagnetic resonance. This NO production was prevented by inhibitors of the mitochondrial respiratory chain, suggesting that a mitochondrial nitrite-reducing activity is responsible for NO synthesis during plant–pathogen interactions [7].

Overall, the present results indicate that the impaired defense response of NR double-deficient *A. thaliana* is not directly caused by general metabolic alterations resulting from deficient nitrogen assimilation but, instead, is due to the reduced levels of nitrite and, consequently of NO. It remains to be elucidated whether nitrite itself may act as a mediator of defensive responses, independent of NO.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Massimo Delledonne for providing the avirulent strain of Psm and Dr. Eneida de Paula for the use of the spectrofluorometer. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grant no. 05/54246-4). H.C.O. was supported by a student fellowship from FAPESP, and I.S. and L.S. are supported by a research fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## References

- [1] N.M. Crawford, M.L. Kahn, T. Leustek, S.R. Long, Nitrogen and sulfur, in: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 2000, pp. 358–410.

- [2] G. Coruzzi, R. Last, Amino acids, in: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, 2000, pp. 358–410.
- [3] H. Yamasaki, Y. Sakihama, S. Takahashi, An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme, *Trends Plant Sci.* 4 (1999) 128–129.
- [4] P.F. Rockel, F. Strube, A. Rockel, J. Wildt, W.M. Kaiser, Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro, *J. Exp. Bot.* 53 (2002) 1–8.
- [5] R. Desikan, R. Griffiths, J. Hancock, S. Neill, 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 (2002) 16314–16318.
- [6] A. Yamamoto-Katou, S. Katou, H. Yoshioka, N. Doke, K. Kawakita, Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Cell Physiol.* 47 (2006) 726–735.
- [7] L.V. Modolo, O. Augusto, I.M. Almeida, J.R. Magalhaes, I. Salgado, Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*, *FEBS Lett.* 579 (2005) 3814–3820.
- [8] E. Planchet, K.J. Gupta, M. Sonoda, W.M. Kaiser, Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport, *Plant J.* 41 (2005) 732–743.
- [9] S. Jasid, M. Simontacchi, C.G. Bartoli, S. Puntarulo, Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species and chloroplastic lipids and proteins, *Plant Physiol.* 142 (2006) 1246–1255.
- [10] C. Stohr, S. Stremlau, Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots, *J. Exp. Bot.* 57 (2006) 463–470.
- [11] P.C. Bethke, M.R. Badger, R.L. Jones, Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues, *Plant Cell* 16 (2004) 332–341.
- [12] D.J. Stuehr, Structure–function aspects in the nitric oxide synthases, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37 (1997) 339–359.
- [13] L.A. del Rio, F.J. Corpas, J.B. Barroso, Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants, *Phytochemistry* 65 (2004) 783–792.
- [14] L.V. Modolo, O. Augusto, I.M.G. Almeida, C.A.F. Pinto-Maglio, H.C. Oliveira, K. Seligman, I. Salgado, 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 (2006) 34–40.
- [15] I. Salgado, L.V. Modolo, O. Augusto, M.R. Braga, H.C. Oliveira, Mitochondrial nitric oxide synthesis during plant–pathogen interactions: role of nitrate reductase in providing substrates, in: L. Lamattina, J.C. Polacco (Eds.), *Nitric Oxide in Plant Growth, Development and Stress Physiology*, Springer-Verlag, 2007, pp. 239–254.
- [16] I.D. Wilson, S.J. Neill, J.T. Hancock, Nitric oxide synthesis and signalling in plants, *Plant Cell Environ.* 31 (2008) 622–631.
- [17] M. Arasimowicz, J. Floryszak-Wieczorek, Nitric oxide as a bioactive signaling molecule in plant stress responses, *Plant Sci.* 172 (2007) 876–887.
- [18] S. Neill, R. Barros, J. Bright, R. Desikan, J. Hancock, J. Harrison, P. Morris, D. Ribeiro, I. Wilson, Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 165–176.
- [19] I. Salgado, E.E. Saviani, L.V. Modolo, M.R. Braga, Nitric oxide signaling in plant defence responses to pathogen attack, in: A. Hemantaranjan (Ed.), *Advances in Plant Physiology*, vol. 7, Scientific, 2004, pp. 117–137.
- [20] J.K. Hong, B.W. Yun, J.G. Kang, M.U. Raja, E. Kwon, K. Sorhagen, C. Chu, Y. Wang, G.J. Loake, Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance, *J. Exp. Bot.* 59 (2008) 147–154.
- [21] M. Delledonne, J. Zeier, A. Marocco, C. Lamb, Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (2001) 13454–13459.
- [22] J.Q. Wilkinson, N.M. Crawford, Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *nia1* and *nia2*, *Mol. Gen. Genet.* 239 (1993) 289–297.
- [23] J.Q. Wilkinson, N.M. Crawford, Identification of the *Arabidopsis* *CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*, *Plant Cell* 3 (1991) 461–471.
- [24] M. Puiatti, L. Sodek, Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean, *Plant Physiol. Biochem.* 37 (1999) 767–773.
- [25] D.N. Rate, J.V. Cuenca, G.R. Bowman, D.S. Guttman, J.T. Greenberg, The gain-of-function *Arabidopsis* *acd6* mutant reveals novel regulation and function of the salicylic acid signaling pathway in controlling cell death, defenses, and cell growth, *Plant Cell* 11 (1999) 1695–1708.
- [26] X. Ye, W.S. Kim, S.S. Rubakhin, J.V. Sweedler, Measurement of nitric oxide by 4,5-diaminofluorescein without interferences, *Analyst* 129 (2004) 1200–1205.
- [27] M. Delledonne, Y. Xia, R.A. Dixon, C. Lamb, Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance, *Nature* 394 (1998) 585–588.
- [28] J. Zeier, M. Delledonne, T. Mishina, E. Severi, M. Sonoda, C. Lamb, Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant–pathogen interactions, *Plant Physiol.* 136 (2004) 2875–2886.
- [29] C. Meyer, U.S. Lea, F. Provan, W.M. Kaiser, C. Lillo, Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth. Res.* 83 (2005) 181–189.
- [30] Z. Kolbert, B. Bartha, L. Erdei, Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia, *J. Plant Physiol.* 165 (2008) 967–975.
- [31] F.M. Shi, Y.Z. Li, *Verticillium dahliae* toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase, *BMB Rep.* 41 (2008) 79–85.
- [32] R. Ludwig, *Arabidopsis* chloroplasts dissimilate L-arginine and L-citrulline for use as N source, *Plant Physiol.* 101 (1993) 429–434.
- [33] J.R. Magalhaes, D.C. Monte, D. Durzan, Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Mol. Biol. Plants* 6 (2000) 117–127.
- [34] K. Seligman, E.E. Saviani, H.C. Oliveira, C.A.F. Pinto-Maglio, I. Salgado, Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase deficient plants, *Plant Cell Physiol.* 49 (2008) 1112–1121.
- [35] D. Zeidler, U. Zahring, I. Gerber, I. Dubery, T. Hartung, W. Bors, P. Hutzler, J. Durner, Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defence genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 15811–15816.
- [36] M. Boccardo, C.E. Mills, J. Zeier, C. Anzi, C. Lamb, R.K. Poole, M. Delledonne, Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host, *Plant J.* 43 (2005) 226–237.
- [37] C. Rustérucci, M.C. Espunya, M. Díaz, M. Chabannes, M.C. Martínez, S-nitrosoglutathione reductase affords protection against pathogens in *Arabidopsis*, both locally and systemically, *Plant Physiol.* 143 (2007) 1282–1292.

## **CAPÍTULO 4**

# **Alterações transcriptômicas induzidas por óxido nítrico durante a resposta de defesa de plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes para a nitrato redutase**

Halley Caixeta de Oliveira<sup>1</sup>, Jan Vitecek<sup>2</sup>, Alberto Ferrarini<sup>2</sup>, Diana Bellin<sup>2</sup>, Massimo Delledonne<sup>2</sup>, Ione Salgado<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil e <sup>2</sup> Dipartimento di Biotecnologie, Università degli Studi di Verona, Verona, Itália

## **Resumo**

A dupla deficiência para a nitrato redutase (NR) torna plantas de *Arabidopsis thaliana* susceptíveis à infecção com linhagens avirulentas de *Pseudomonas syringae*. A perda de resistência não é decorrente dos baixos níveis de aminoácidos, mas deve resultar da produção deficiente de óxido nítrico (NO), uma importante molécula sinalizadora na resposta de defesa ao ataque de patógenos. Com o objetivo de substantiar esta proposta, no presente trabalho, verificou-se o efeito da fumigação com baixas concentrações do gás NO na resposta do mutante *nia1 nia2* a uma linhagem avirulenta da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. O tratamento com NO em plantas *nia1 nia2* com níveis de aminoácidos recuperados restabeleceu a resistência desse genótipo à infecção, reduzindo o crescimento bacteriano e o desenvolvimento da clorose nas folhas. Além disso, uma análise em larga escala da expressão gênica utilizando microarranjos de DNA revelou que a fumigação com NO levou a uma ampla modificação no perfil transcriptômico de folhas *nia1 nia2* infectadas, estimulando a expressão de 419 genes e reprimindo a de outros 415. O NO induziu a expressão de diversos transcritos pertencentes a processos da defesa, como aqueles relacionados às vias de sinalização do ácido salicílico e do cálcio, às proteínas relacionadas à patogênese, à reorganização da parede celular e à síntese de compostos com

atividade antimicrobiana. Adicionalmente, novos genes despontaram como potenciais alvos da ação do NO, ampliando as informações a respeito do papel dessa molécula sinalizadora na interação fitopatogênica. Em especial, destacou-se o possível papel do NO na alteração de transcritos relacionados à sinalização e à homeostase hormonal de forma a permitir um controle atenuador de mecanismos da resposta de defesa.

## **Abstract**

Nitrate reductase (NR) double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants are susceptible to infection with avirulent strains of *Pseudomonas syringae*. The loss of resistance is not due to their low amino acid levels, but could result from the deficient production of nitric oxide (NO), an important signaling molecule in plant defense response against pathogen attack. In order to substantiate this proposal, in the present work we verified the effect of the fumigation with low concentrations of NO gas in the defense response of the *nia1 nia2* mutant to an avirulent strain of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. NO treatment of amino acid-recovered *nia1 nia2* plants reestablished the resistance of this genotype to infection, decreasing the bacterial growth and the development of leaf chlorosis. Moreover, a large scale analysis using DNA microarrays revealed that NO fumigation caused broad modifications in the transcriptomic profile of infected *nia1 nia2* leaves, stimulating or repressing the expression of 419 and 415 genes, respectively. NO induced the expression of many genes belonging to defense processes, such those associated to salicylic acid and calcium signaling pathways, to pathogenesis-related proteins, to cell wall reorganization and to the synthesis of antimicrobial compounds. Additionally, new genes emerged as potential targets of NO action, increasing the knowledge about the role of this signaling molecule in phytopathogenic interactions. In special, we can highlight the possible involvement of NO in the modulation of transcripts related to hormonal signaling and homeostasis in order to allow an attenuating control of certain mechanisms of the defense response.



## 1 – Introdução:

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que tem sido considerado como uma importante molécula sinalizadora em vários processos em plantas, incluindo o crescimento e o desenvolvimento vegetal e a resposta a estresses bióticos e abióticos (Lamattina et al., 2003; Neill et al., 2008). Dada a natureza diversa das funções exercidas pelo NO, análises em larga escala da expressão gênica são essenciais para propiciar um entendimento adequado das vias de sinalização afetadas por esse radical (Grun et al., 2006). Trabalhos utilizando microarranjos de DNA e a análise de polimorfismos de tamanho dos fragmentos amplificados descreveram as mudanças no perfil de transcritos de *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* e *Medicago truncatula* após o tratamento com doadores de NO ou o com o próprio gás NO (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009). Esses estudos confirmaram que o NO modula a expressão de uma ampla gama de genes envolvidos em funções celulares, como transdução de sinal, transporte, defesa, metabolismo primário e resposta ao estresse oxidativo, o que está de acordo com o papel pleiotrópico dessa molécula na fisiologia vegetal (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009).

Uma das ações mais conhecidas do NO em vegetais é seu papel na resposta de defesa contra o ataque de patógenos (Delledonne et al., 1998). Juntamente com espécies reativas de oxigênio, o NO está envolvido no desenvolvimento da resposta hipersensitiva, que consiste na morte celular localizada, desenvolvida no tecido vegetal para prevenir a proliferação do patógeno a partir do sítio de infecção (Delledonne et al., 2001). Além de atuar no aumento local da expressão de genes de defesa e na ativação das vias de produção de compostos antimicrobianos, o NO participa do estabelecimento da resposta sistêmica adquirida (Mur et al., 2006), um mecanismo de defesa induzida que confere proteção prolongada contra diversos tipos de patógenos (Durrant e Dong, 2004). Várias evidências tem sugerido uma interação entre NO e ácido salicílico na modulação do perfil de transcritos durante as respostas de defesa local e sistêmica, bem como entre NO e ácido jasmônico na sinalização do estresse de ferimento (Grun et al., 2006). Ainda, uma forte sobreposição entre os genes modulados por NO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi demonstrada na indução da

morte celular em tabaco (Zago et al., 2006). Esses resultados indicam que a expressão gênica dependente do NO pode ser regulada por sua interação com outras moléculas sinalizadoras (Grun et al., 2006). Dessa forma, as mudanças transcriptômicas induzidas pelo tratamento com NO exógeno em tecidos vegetais não infectados (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009) podem ser diferentes dos efeitos exercidos por esse radical na expressão gênica durante o contexto específico da resposta de defesa, situação na qual há a atuação de outros sinais produzidos pela planta em resposta à infecção.

Ainda, conforme recentemente discutido por Besson-Bard e colaboradores (2009), muitos genes podem estar sob o controle do NO constitutivamente produzido por fontes endógenas, não respondendo a tratamentos exógenos com essa molécula. Dessa forma, a aplicação de inibidores de vias de síntese do NO (Besson-Bard et al., 2009) ou a utilização de mutantes deficientes para a produção desse radical (Zeidler et al., 2004) podem constituir estratégias interessantes em análises transcriptômicas.

De fato, plantas mutantes com níveis alterados de NO tem se mostrado importantes modelos para o estudo dos processos de síntese e sinalização desse radical na interação fitopatogênica (Leitner et al., 2009). Um bom exemplo é o mutante *nial1 nia2* de *Arabidopsis thaliana*, que é deficiente para os dois genes da enzima nitrato redutase (NR). Esse mutante possui uma capacidade reduzida de produção de NO, resultante de seus baixos níveis endógenos de nitrito e arginina, os dois substratos primários para a síntese de NO em plantas (Modolo et al., 2005, 2006). Plantas *nial1 nia2* são susceptíveis à linhagem avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*, apresentando severa evolução da doença (Modolo et al., 2006). No capítulo 3 desta tese, foi demonstrado que a susceptibilidade do mutante *nial1 nia2* não é devida a alterações metabólicas resultantes de sua prejudicada assimilação de nitrogênio, uma vez que o tratamento com glutamina, que recuperou os níveis de aminoácidos nas folhas, não teve efeito positivo sobre a deficiente resposta de defesa desse mutante. Dessa forma, foi sugerido que a susceptibilidade de *nial1 nia2* à infecção bacteriana seria uma consequência de sua produção reduzida de NO.

Visando substanciar essa proposta, no presente trabalho, verificou-se o efeito do NO na resposta de defesa de plantas *nia1 nia2*, com níveis de aminoácidos recuperados, a uma linhagem avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. As plantas infectadas foram submetidas a uma fumigação prolongada com baixas concentrações do gás NO, o que se diferencia de estudos anteriores, nos quais foram utilizados doadores de NO (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Ahlfors et al., 2009) ou concentrações muito elevadas do gás por um curto intervalo de tempo (Palmieri et al., 2008). Uma análise em larga escala da expressão gênica utilizando microarranjos de DNA foi realizada a fim de se determinar a atuação do NO exógeno sobre as diversas vias metabólicas e de sinalização durante o estabelecimento da resposta de defesa das folhas infectadas. Os resultados nesta análise demonstraram que o tratamento com NO, além de reduzir o crescimento bacteriano e o desenvolvimento de sintomas nas folhas, levou a uma modulação da expressão de diversos genes pertencentes a processos de defesa, recuperando a resistência das plantas NR-deficientes à infecção. Além disso, novos genes despontaram como potenciais alvos de ação do NO, ampliando as informações a respeito do papel dessa molécula sinalizadora na interação fitopatogênica.

## 2 – Material e métodos:

**2.1 – Cultivo das plantas:** Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecótipo Columbia-0 dos genótipos selvagem e mutante duplo-deficiente para os genes *NIA1* e *NIA2* da enzima NR (mutante *nial nia2*), obtido por Wilkinson e Crawford (1993). As sementes foram germinadas em vermiculita:perlita (1:1) e mantidas em uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 10 h de luz e 14 h de escuro e temperatura controlada de 24°C/21°C (dia/noite). As plantas foram irrigadas duas vezes por semana com meio contendo os macronutrientes  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5 mM),  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (2,5 mM),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (2,5 mM),  $\text{MgSO}_4$  (1 mM) e  $\text{CaCl}_2$  (0.5 mM), e os micronutrientes descritos por Wilkinson e Crawford (1991). Para a recuperação dos níveis de aminoácidos, plantas *nial nia2* foram cultivadas, a partir da terceira semana de crescimento, com o mesmo meio contendo glutamina (5 mM). Plantas com 5 a 6 semanas de idade foram utilizadas para os experimentos.

**2.2 – Cultivo da bactéria e análise da evolução da infecção:** A linhagem da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000 que carrega o gene de avirulência *AvrB* foi cultivada em meio B de King líquido contendo rifampicina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e kanamicina ( $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), a uma temperatura de 28°C e agitação de 180 rpm. Após 16 h, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 1000 xg, lavada 2 vezes em  $\text{MgCl}_2$  (10 mM) e o precipitado obtido foi finalmente ressuspensionado em  $\text{MgCl}_2$ , de forma a se obter uma absorbância a 600 nm de 0,1, o que corresponde a  $1 \times 10^8 \text{ cfu.mL}^{-1}$ . Diluições seriadas em  $\text{MgCl}_2$  foram então realizadas a fim de se obter suspensões bacterianas a  $5 \times 10^5 \text{ cfu.mL}^{-1}$  (para ensaios de crescimento bacteriano) ou  $5 \times 10^6 \text{ cfu.mL}^{-1}$  (para análise de sintomas macroscópicos e expressão gênica). A suspensão bacteriana foi infiltrada na superfície abaxial das folhas, utilizando uma seringa sem agulha. Para o acompanhamento dos sintomas macroscópicos, registrados com uma câmera Sony Vaio W210, apenas a metade de cada folha foi infiltrada. A análise do crescimento bacteriano em folhas totalmente infiltradas foi realizada conforme descrito no capítulo 3 desta tese.

**2.3 – Fumigação das plantas com o gás NO:** Vasos contendo plantas infectadas foram mantidos numa câmara de polietileno devidamente lacrada com uma tampa transparente contendo um tubo para entrada e outro para saída de gases. As plantas foram então submetidas a um fluxo contínuo de  $10 \text{ mL.min}^{-1}$  de gás NO (estoque de 600 ppm diluído

em N<sub>2</sub>) e 290 mL.min<sup>-1</sup> de ar comercial, de forma a obter uma atmosfera de 15 ± 5 ppm de NO no interior da câmara. Plantas controle foram submetidas a um fluxo de 300 mL.min<sup>-1</sup> de ar comercial. Todo o procedimento foi realizado no interior de uma capela.

2.4 – Fumigação das suspensões bacterianas com o gás NO: Suspensões bacterianas (A<sub>600</sub> = 0,05) em meio de cultura líquido contendo os antibióticos apropriados foram mantidas num “erlenmeyer” a 25°C sob agitação constante de 150 rpm. A exposição a uma atmosfera de 15 ± 5 ppm de NO deu-se pelo borbulhamento de um fluxo contínuo de 10 mL.min<sup>-1</sup> de gás NO (estoque de 600 ppm diluído em N<sub>2</sub>) e 290 mL.min<sup>-1</sup> de ar comercial esterilizado diretamente na suspensão bacteriana. Em experimentos controle, ar comercial puro foi borbulhado. O crescimento bacteriano foi acompanhado a cada 2 horas pela medida da absorbância a 600 nm até o alcance da fase estacionária.

#### 2.5 – Análise da expressão gênica:

2.5.1 – Design experimental e extração do RNA total: Plantas *nia1 nia2* previamente cultivadas com glutamina e inoculadas com 5x10<sup>6</sup> cfu.mL<sup>-1</sup> de Pst foram mantidas na câmara de fumigação, a uma atmosfera de 15 ± 5 ppm de NO. A expressão gênica das plantas tratadas com NO foi comparada à de plantas *nia1 nia2* cultivadas com glutamina, também inoculadas com 5x10<sup>6</sup> cfu.mL<sup>-1</sup> de Pst, mas mantidas em câmara com fluxo contínuo de ar comercial puro. Após 12 h, 100 mg de folhas foram coletadas e imediatamente congeladas em N<sub>2</sub> líquido. A coleta foi realizada de forma a se obter 2 amostras por tratamento, cada uma consistindo no “pool” de 3 replicatas biológicas. As amostras foram rapidamente maceradas e então 1 mL de reagente Trizol (Invitrogen) foi adicionado a cada uma delas. Após 5 min, 0,2 mL de clorofórmio foi adicionado e, após incubação por 3 min, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 15 min a 4°C. A fase aquosa superior foi retirada e 0,5 mL de álcool isopropílico foi adicionado a ela. Após 10 min de incubação em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas a 12000 xg por 10 min a 4°C e o precipitado obtido foi lavado 2 vezes em etanol (75%). Após secagem por 10 min em temperatura ambiente, o RNA extraído foi ressuscitado em 30 µL de água livre de RNAsases. O RNA foi quantificado usando um espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology) e sua pureza avaliada pelas razões A<sub>260/280</sub> e A<sub>260/230</sub>. A

integridade do RNA extraído foi verificada com o Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technology) através da análise da razão dos RNA ribossômicos 28S e 18S.

2.5.2 – Amplificação e marcação do RNA com a sonda fluorescente: A amplificação e marcação do RNA extraído foram realizadas com a utilização do kit “RNA ampULSe: Amplification and Labeling Kit for CombiMatrix arrays GEA-022” (Kreatech Biotechnology), seguindo as instruções do fabricante (<http://www.kreatech.com>). Para cada amostra, 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese da primeira fita do cDNA usando “primers” oligo(dT) T7. Após a síntese da segunda fita, o cDNA foi purificado e utilizado como molde para a transcrição do RNA “antisense” (aRNA), o qual foi marcado com a sonda fluorescente Cy5. A eficiência da incorporação da sonda ao aRNA foi avaliada utilizando o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology).

2.5.3 – Hibridização, lavagem e aquisição da imagem: A análise da expressão gênica foi realizada com o uso do chip ArabidopsisArray1.1 de 90K (CombiMatrix), que abrange 28500 genes de *Arabidopsis thaliana* representados em triplicata, além de controles negativos e positivos. Todos os procedimentos foram realizados seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (CombiMatrix; [http://www.combimatrix.com/support\\_docs.htm](http://www.combimatrix.com/support_docs.htm)). O aRNA marcado com Cy5 (4 µg) foi quebrado a fragmentos de 50 a 200 bases e então hibridizado com o chip por 16 h a 45°C num forno de hibridização convencional Finepcr sv12dx equipado com uma “rotisserie” modelo 610004 (CombiMatrix). Após o procedimento de lavagem, o chip foi imediatamente escaneado com um Axon GenePix 4400A Scanner (MDS Analytical Technologies), obtendo uma imagem em formato tif.

2.5.4 – Análise dos dados: A análise densitométrica dos “spots” foi realizada com o uso do programa Microarray Imager 5.8 (CombiMatrix) e os dados de quantificação foram exportados no formato “tab delimited text”. A correção do “background” e a normalização dos dados de expressão foram realizadas utilizando o pacote LIMMA R (Smyth et al., 2005). O mesmo software foi utilizado para a implementação de uma análise de modelos lineares, a fim de se determinar as diferenças significativas dos sinais entre os tratamentos. Genes com valores de  $P \leq 0,05$  e regulados positiva ou negativamente a uma intensidade de ao menos 2 vezes foram considerados como sendo diferencialmente expressos. A anotação

funcional dos genes foi realizada utilizando o programa Blast2GO (Conesa et al., 2005), o banco de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>) e informações da literatura.

### 3 – Resultados e discussão:

A fim de se verificar se a susceptibilidade do mutante *nia1 nia2* está relacionada a sua habilidade reduzida em sintetizar o NO, plantas *nia1 nia2* infiltradas com a linhagem avirulenta de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) foram submetidas à fumigação com baixas concentrações desse gás. Plantas *nia1 nia2* previamente cultivadas com glutamina foram utilizadas nesse ensaio, uma vez que esse tratamento minimiza as alterações metabólicas pleiotrópicas resultantes da deficiência da NR (ver capítulo 3 desta tese) e não tem efeito positivo sobre a baixa emissão de NO e sobre a resposta de defesa prejudicada desse mutante à Pst (resultados não mostrados), da mesma forma que observado nos ensaios com *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* descritos no capítulo 3 desta tese. Conforme apresentado na Figura 1, dois dias após a inoculação com Pst, uma clorose acentuada e um intenso crescimento bacteriano foram observados em folhas *nia1 nia2* em relação às selvagens, quando ambos genótipos encontravam-se em câmaras sob um fluxo de ar puro. Por outro lado, a fumigação contínua com baixas concentrações de NO minimizou os sintomas macroscópicos e reduziu a proliferação de Pst em folhas *nia1 nia2*, de  $4048 \pm 1898$  para  $604 \pm 349$  cfu.cm<sup>-2</sup>. Dessa forma, o crescimento bacteriano em folhas de *nia1 nia2* tratadas com NO foi similar ao observado em folhas do genótipo selvagem (Figura 1), que são capazes de produzir NO em resposta à Pst (resultados não mostrados).

Um possível efeito microbicida ou bacteriostático direto do NO sobre a Pst pode ser excluído, já que o crescimento de culturas líquidas da bactéria foi minimamente afetado pelo tratamento com o gás NO. Após o alcance da fase estacionária, detectou-se um decréscimo de somente 15 % no crescimento de suspensões de Pst tratadas com NO em relação às mantidas sob um fluxo de ar comercial esterilizado (Figura 2). Esse efeito inibitório foi muito menor que a redução no crescimento bacteriano apresentada em folhas *nia1 nia2* fumigadas com NO (Figura 1B). Esses resultados sugerem que, na presença de NO exógeno, o mutante *nia1 nia2* é capaz de desenvolver mecanismos de defesa que restringem o crescimento de Pst em suas folhas, da mesma forma que plantas do genótipo selvagem.

Com o intuito de se confirmar essa hipótese, uma análise em larga escala do perfil transcriptômico utilizando microarranjos de DNA foi realizada, verificando-se os genes de



folhas *nia1 nia2* inoculadas com Pst cuja expressão foi modulada pela fumigação com NO. Dessa forma, seria possível detectar genes responsivos ao NO exógeno que levariam ao estabelecimento da resposta de defesa do mutante *nia1 nia2*. Após 12 h de fumigação, o NO induziu em pelo menos 2 vezes a expressão de 419 genes e reprimiu a de outros 415, dentre o total de 28500 genes de *Arabidopsis thaliana* analisados. Conforme apresentado na Figura 3, os genes responsivos ao NO pertencem a várias categorias funcionais, com destaque para metabolismo, transdução de sinal, resposta a estresses, regulação da transcrição, transporte, reorganização da parede celular, catabolismo de proteínas e homeostase redox. O efeito do NO em modular a expressão de genes e processos específicos será apresentado com detalhes nos itens subseqüentes deste trabalho.

### ***NO estimula a expressão de genes de vias de sinalização da resposta de resistência e de proteínas relacionadas à defesa***

Um dos aspectos marcantes desta análise foi o efeito do NO em induzir genes diretamente relacionados a diferentes processos da defesa vegetal contra o ataque de patógenos (Tabela I), indicando que o NO foi capaz de ativar a resposta de resistência de plantas *nia1 nia2* à Pst, conforme proposto na Figura 4. Dentre os transcritos induzidos, encontram-se genes de receptores com repetições ricas em leucina (LRR) e de canais protéicos modulados por nucleotídeos cíclicos (CNGC). Receptores LRR tem um importante papel no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos e na iniciação da resposta de defesa (Ma et al., 2009). Algumas dessas proteínas possuem uma atividade guanilato ciclase, de forma que a percepção do patógeno induz a produção de GMP cíclico, o qual ativa canais presentes na membrana plasmática, levando a um influxo de cálcio nas células (Ma et al., 2009). Por sua vez, o aumento do cálcio citoplasmático está relacionado à ativação de diversas vias de sinalização que levam ao desenvolvimento da resposta de defesa (Cortouis et al., 2008). Flutuações nos níveis de cálcio são percebidas por proteínas sensores desse cátion, como calmodulinas (Cortouis et al., 2008), a expressão de cujos genes também foi modulada por NO. Particularmente, já foi demonstrado que a proteína semelhante a calmodulina 43 (CLM43) é um importante mediador da resposta hipersensitiva em *A. thaliana* induzida por Pst (Chiasson et al., 2005).

Outros genes de defesa induzidos pela fumigação de NO em folhas *nia1 nia2* infectadas incluem *ACD6*, *EDS1* e *TGA3* (Tabela I e Figura 4). *ACD6* codifica uma proteína de membrana com repetições anquirina, que, assim como LRR, está envolvida na percepção do patógeno (Dong, 2004). *ACD6* atua “upstream” à proteína *EDS1*, a qual leva à indução da resposta hipersensitiva (Dong, 2004). Coerentemente, mutantes *acd6* com ganho de função desse gene apresentam elevada expressão de *EDS1* e lesões espontâneas de morte celular (Dong, 2004). Além de seu papel na resposta hipersensitiva, *EDS1* estimula a síntese de ácido salicílico, o qual favorece a monomerização da proteína NPR1 via modificações redox e sua conseqüente entrada no núcleo (Wiemer et al., 2005). Por sua vez, os monômeros de NPR1 induzem, pela sua interação com fatores de transcrição TGA, a expressão local e sistêmica de diversos genes de defesa, como os das proteínas relacionadas à patogênese (PRs) (Pieterse e Van Loon, 2004). Além de *TGA3*, o tratamento com NO estimulou a expressão de diversos fatores WRKY, os quais também possuem um efeito positivo na transcrição de genes de defesa (Chen e Chen, 2002; Mao et al., 2007).

Ainda, coerente com a indução observada desses fatores de transcrição, vários genes de proteínas diretamente relacionadas à defesa foram induzidos pela fumigação com o gás NO (Tabela I e Figura 4), incluindo os da PR-1, PR-2, LURP1, quitinases, germina 1 e inibidor de tripsina, bem como genes de proteínas associadas à síntese de compostos secundários de defesa, tais quais strictosidina sintase e a enzima “berberine-bridge” (síntese de alcalóides), *S*-linalool sintase (síntese de terpenóides) e antranilato N-hidroxycinamoil/benzoiltransferase (síntese de fitoalexinas). Esse efeito do NO em modular a expressão de genes de defesa listados na Tabela I ratifica os resultados obtidos por trabalhos anteriores (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zeidler et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009; Besson-Bard et al., 2009), demonstrando que a fumigação com baixas concentrações de gás NO aqui realizada foi um método eficiente de tratamento para induzir uma resposta transcriptômica característica a esse radical.

Um aspecto relativamente novo foi a indução pelo NO de genes de 2 ciclofilinas (Tabela I), o que já havia sido reportado apenas a nível de expressão protéica (Morot-Gaudry-Talarmain et al., 2002). Em animais, essas proteínas participam da formação do

poro de transição de permeabilidade mitocondrial, associado à liberação de fatores pró-apoptóticos no citoplasma (Halestrape et al., 2002). A existência de um poro semelhante no processo de morte celular em plantas, cuja formação seria induzida por NO, já foi demonstrada (Saviani et al., 2002). Dessa forma, a indução dos genes de ciclofilinas poderia constituir um mecanismo adicional de o NO favorecer a morte celular durante a resposta hipersensitiva vegetal (Figura 4). Além disso, já é conhecido que a ciclofilina-1 possui um papel fundamental na resposta de defesa por ativar a proteína de avirulência AvrRpt2 produzida por alguns patógenos, propiciando o seu reconhecimento por plantas resistentes (Coaker et al., 2005).

### ***NO modula a expressão de genes relacionados à reorganização da parede celular: formação de uma barreira ao patógeno?***

Durante a resposta de defesa, já foi demonstrado que ocorre uma intensa reorganização da parede celular, de forma a produzir uma barreira rígida ao patógeno (Vorwerk et al., 2004). Coerentemente, o tratamento com NO levou à modulação da expressão de uma série de genes relacionados a esse processo (Tabela II e Figura 5), ratificando os dados das análises transcriptômicas em raízes de *A. thaliana* realizadas por Parani e colaboradores (2004) e Ahlfors e colaboradores (2009). Genes de enzimas associadas ao metabolismo de celulose e pectina, principais polissacarídeos constituintes de paredes primárias (Caffall e Mohnen, 2009), tiveram sua expressão modulada pelo NO, bem como genes de hidrolases, expansinas e forminas. Particularmente, vários trabalhos tem sugerido a importância de enzimas que modificam a pectina, como as pectina acetil e metiltransferases, na defesa vegetal (Vogel et al., 2004; Pelloux et al., 2007). Acredita-se também que compostos provenientes da quebra de carboidratos da parede, como por ação das pectato liases, possam agir como moléculas eliciadoras, ativando mecanismos de resistência (Dellagi et al., 2000).

Adicionalmente, os genes das enzimas cinamoil-CoA redutase, cinamil-álcool desidrogenase e ácido caféico 3-O-metiltransferase, que catalisam os últimos passos para a síntese de lignina, foram induzidos pela fumigação com NO (Figura 5). Interessantemente,

o NO estimulou a expressão de fatores de transcrição MYB, alguns dos quais são conhecidos por regular a lignificação em *Pinus taeda* (Patzlaff et al., 2003) e o fluxo de metabólitos da via dos fenilpropanóides em *A. thaliana* (Jin et al., 2000). Apesar de a indução gênica dessas enzimas e fatores de transcrição em resposta ao NO já ser conhecida (Parani et al., 2004; Ahlfors et al., 2009), o envolvimento desse radical no processo de lignificação e no conseqüente reforço da parede celular durante a resposta de defesa ao ataque de patógenos ainda não foi analisado fenotipicamente.

### ***Efeito do NO na expressão de genes do metabolismo de lipídios: formação de sinalizadores lipídicos para a resposta sistêmica?***

A fumigação com NO modulou a expressão de diversos genes relacionados ao metabolismo de lipídios, incluindo genes de enzimas de elongação e modificação de ácidos graxos e da síntese de esteróides (Tabela III). Um destaque foi o efeito do NO em estimular a expressão de vários genes de proteínas transferidoras de lipídios (LTPs) e de diversas lipases, em especial daquelas localizadas no espaço extracelular (Figura 5).

LTPs são pequenos peptídeos capazes de transferir lipídios entre membranas (Yeats e Rose, 2008). Diversos trabalhos demonstraram uma atividade antimicrobiana das LTPs, bem como a indução dessas proteínas em interações fitopatogênicas, o que as levaram a serem classificadas como PR-14 (García-Olmedo et al., 1995; Sels et al., 2008). Além disso, LTPs participam da formação da cutina, contribuindo para o reforço da parede celular durante a defesa (Chassot et al., 2007). Recentemente, o papel das LTPs na resposta sistêmica foi sugerido, já que plantas de *A. thaliana* mutantes para o gene de uma LTP foram incapazes de expressar genes *PR* em folhas sistêmicas, apesar de apresentarem uma resposta local normal (Maldonado et al., 2002), e folhas de tabaco com superexpressão do gene *CALTP* apresentaram resistência aumentada a diversos patógenos (Sarowar et al., 2009). A subexpressão ou superexpressão dos genes de lipases extracelulares também teve um efeito negativo ou positivo, respectivamente, no estabelecimento da resposta sistêmica (Oh et al., 2005; Kwon et al., 2009). Dessa forma, tem sido sugerido o papel das lipases extracelulares e das LTPs na geração ou na translocação de um sinal sistêmico em células

infectadas, que seria transportado a tecidos sadios (Kwon et al., 2009; Sarowar et al., 2009). De acordo com essa hipótese, um estudo recente identificou o ácido azelaico como um sinal lipídico móvel capaz de induzir a resposta sistêmica adquirida em plantas de *A. thaliana* inoculadas com *P. syringae* (Jung et al., 2009).

Apesar de a análise realizada por Parani e colaboradores (2004) ter revelado o gene *LTP2* como responsivo ao NO e outros autores terem reportado a indução de poucas lipases extracelulares pelo mesmo tratamento (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Ahlfors et al., 2009), nenhum outro trabalho mostrou um efeito do NO em estimular a expressão de tantos genes dessas proteínas como o apresentado no presente estudo. Assim, novos experimentos são essenciais no sentido de se verificar a relação entre o NO e os sinais lipídicos no processo de defesa sistêmica. Além disso, seria interessante analisar se o NO teria um efeito sobre a atividade das LTPs via *S*-nitrosilação, já que essas proteínas são ricas em cisteínas (Yeats e Rose, 2008).

#### ***NO altera a expressão de genes relacionados a vias de síntese e sinalização de hormônios vegetais: uma modulação da resposta de defesa por “feedback” negativo?***

O tratamento de plantas *nia1 nia2* com NO levou a uma expressão diferencial de genes relacionados à síntese e à sinalização de vários hormônios vegetais durante a infecção com Pst (Tabela IV).

Por exemplo, o NO modulou transcritos envolvidos na síntese de oxilipinas (Figura 6). Observou-se a indução do gene codificante para a fosfolipase A2, o que propiciaria uma maior formação de ácidos graxos livres, em particular o ácido  $\alpha$ -linolênico, principal substrato para a via de produção desses compostos lipídicos (Wasternack, 2007). O NO também induziu o gene *LOX2*, que codifica para uma 13-lipoxigenase envolvida na produção de ácido jasmônico, uma oxilipina importante em diversos processos fisiológicos e na resposta a estresses bióticos e abióticos (Wasternack, 2007). Por outro lado, a expressão de *LOX1*, associado a uma classe distinta de lipoxigenases, foi reprimida pelo mesmo tratamento. O efeito positivo do NO sobre a transcrição de genes para 13-

lipoxigenases (*LOX2*, *LOX3* e *LOX4*) já havia sido demonstrado por diversos trabalhos (Huang et al., 2004; Parani et al., 2004; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009), de forma que tem sido sugerido um papel do NO nas respostas associadas ao ácido jasmônico (Huang et al., 2004). Adicionalmente, o NO estimulou a expressão do gene da hidróperóxido liase, ratificando os dados de Parani e colaboradores (2004). Essa enzima participa da síntese de outros tipos de oxilipinas, que também podem funcionar como sinais lipídicos durante a defesa (Kachroo e Kachroo, 2009).

Conforme apresentado na Tabela IV e na Figura 7, o tratamento com NO modulou também a expressão de genes relacionados às vias de síntese e sinalização das auxinas e das citocininas. No caso das auxinas, os genes *GH3* e *INDOLE-3-ACETATE BETA-GLUCOSYLTRANSFERASE 1 (AIA GT)*, associados à formação de conjugados inativos do ácido indol 3-acético (Woodward e Bartel, 2005), tiveram sua expressão diminuída pelo NO, ao passo que *ILR1*, associado à hidrólise dos conjugados com aminoácidos e ao aumento dos níveis de auxinas livres (Woodward e Bartel, 2005), foi induzido. Além disso, o tratamento com NO estimulou a expressão do gene para o receptor de auxina TIR1, o que levaria a uma maior sensibilidade a esse hormônio (Dharmasiri et al., 2005). Coerente com esse cenário, os genes *IAA33* e *IAA7*, associados a uma repressão da resposta às auxinas (Woodward e Bartel, 2005), foram modulados negativamente pelo NO. Por outro lado, os transcritos das enzimas antranilato sintase (AntS) e nitrilase 2 (NIT2) tiveram sua expressão diminuída, indicando que o NO reprimiu uma das possíveis vias biossintéticas do ácido indol 3-acético (Woodward e Bartel, 2005). De uma forma geral, esses resultados indicam que o NO aumenta a disponibilização do ácido indol 3-acético a partir de seus conjugados inativos e potencializa a resposta a esse hormônio, ao mesmo tempo que inibe sua síntese *de novo*. É interessante citar que apesar de a análise transcriptômica realizada por Palmieri e colaboradores (2008) ter indicado um efeito do NO sobre genes *GH3*, *ILR* e *IAA*, todos eles são homólogos diferentes dos modulados no presente estudo.

A sinalização mediada por citocininas, que, assim como as auxinas, são importantes para o crescimento e desenvolvimento vegetal (Werner e Schmulling, 2009), também foi afetada a nível transcriptômico pelo NO, evidenciando alvos desse radical não previamente documentados. Conforme apresentado na Tabela IV, o tratamento com NO reprimiu os

genes de reguladores de resposta do tipo A (*ARR15* e *ARR16*), que atuam como moduladores negativos da via de transdução de sinal das citocininas (To et al., 2004). Ao mesmo tempo, o NO inibiu a expressão de genes relacionados à glicosilação e conseqüente inativação desses hormônios (Hou et al., 2004). Desse modo, pode-se sugerir um efeito do NO em ativar a via de sinalização das citocininas e aumentar a disponibilidade desses hormônios em folhas *nia1 nia2* infectadas (Figura 7), semelhante ao observado para as auxinas. Interessantemente, relatos anteriores mostram que genes *ARR* do tipo B, que ativam a resposta às citocininas, são induzidos por NO (Ahlfors et al., 2009; Besson-Bard et al., 2009).

Um quadro diferente foi observado no caso do hormônio etileno (Tabela IV e Figura 8). Genes para as enzimas ACC sintase e ACC oxidase, que catalisam as 2 últimas reações de síntese de etileno a partir de *S*-adenosilmetionina, tiveram sua expressão reprimida pela fumigação com NO, bem como o gene para a proteína carreadora de *S*-adenosilmetionina e para a nitrilase 4 (NIT 4), associada à detoxificação do cianeto formado durante a produção de etileno (Piotrowski, 2008). Por outro lado, transcritos das enzimas *S*-adenosilmetionina decarboxilase (SAM DC2) e aci-reductona dioxigenase (ARD1), que participam da via de salvamento da metionina a partir da *S*-adenosilmetionina, foram induzidos pelo NO. Dessa forma, o NO parece ter um efeito negativo sobre a síntese de etileno por folhas *nia1 nia2* infectadas, ao mesmo tempo que estimula o reaproveitamento de seu substrato *S*-adenosilmetionina à metionina. Esses resultados estão de acordo com os dados de Lindermayr e colaboradores (2006), que demonstraram que o tratamento com doadores de NO reduz a produção de etileno por células em cultura de *A. thaliana* ao inibir, via *S*-nitrosilação, a atividade da enzima que catalisa a formação de *S*-adenosilmetionina.

Outro hormônio vegetal que sofre uma importante interação com o NO durante a resposta de defesa é o ácido salicílico (Mur et al., 2006). De fato, observou-se um efeito do NO em estimular a expressão de diversos genes associados à transdução de sinal do ácido salicílico, conforme já apresentado na Tabela I e na Figura 4. Esses resultados ratificam os dados apresentados por diversos trabalhos na literatura (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zeidler et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009). Entretanto, um dado novo obtido no presente

estudo foi o efeito positivo do NO na expressão de *NIMIN-1* e *NIMIN-2* (Tabela IV e Figura 9). As proteínas NIMIN-1 e, possivelmente, NIMIN-2, por interagirem com NPR1, atuam como reguladores negativos da expressão gênica dependente de ácido salicílico, evitando que uma quantidade exacerbada de recursos seja direcionada para a defesa em detrimento a outros processos fisiológicos importantes (Weigel et al., 2001, 2005). Por conseguinte, a indução de genes *NIMIN* pelo NO sugere um mecanismo de controle atenuador da defesa por esse radical.

Interessantemente, o ácido jasmônico, cuja síntese foi ativada transcriptomicamente pelo NO (Tabela IV e Figura 6), é um conhecido antagonista da resposta dependente de ácido salicílico (Thaler et al., 2002; Leon-Reyes et al., 2009). Da mesma forma, as auxinas, cuja via de sinalização seria estimulada pelo NO (Tabela IV e Figura 7), são consideradas como sinais atenuadores da resposta de defesa, permitindo a realocação de recursos para processos do crescimento e desenvolvimento vegetal (Kazan e Manners, 2009), os quais seriam também favorecidos pelas citocininas (Werner e Schmulling, 2009). Inversamente, o etileno, que teve os genes relacionados a sua síntese reprimidos pelo NO (Tabela IV e Figura 8), tem sido considerado um mediador positivo da resposta do ácido salicílico, estimulando a morte celular e a expressão de genes relacionados à patogênese (van Loon et al., 2006; Leon-Reyes et al., 2009).

No mesmo sentido, o NO modulou transcriptomicamente enzimas relacionadas ao metabolismo do mio-inositol e seus derivados (Tabela IV e Figura 10), que atuam como importantes mensageiros secundários em vias de sinalização hormonal (Xue et al., 2007). Interessantemente, o tratamento com NO estimulou a expressão de *MIPS1* (associado à síntese de mio-inositol 3-fosfato), que foi recentemente demonstrado como um regulador negativo da morte celular programada dependente de ácido salicílico (Meng et al., 2009). Ao mesmo tempo, nossos resultados mostram pela primeira vez que o NO inibiu a expressão de outros genes da via, sugerindo uma menor formação de mio-inositol hexafosfato ou ácido fítico, composto associado à resposta de resistência a diversos tipos de patógenos (Murphy et al., 2008).

A atuação do NO sobre transcritos relacionados ao metabolismo do mio-inositol, juntamente com seu efeito sobre genes das vias de sinalização e da homeostase de diversos



hormônios vegetais, indica um intrigante aspecto da participação do NO na interação fitopatogênica. Assim, ao mesmo tempo em que o NO estimula em vários pontos a resposta de defesa, essa molécula parece também induzir mecanismos que levariam a um controle por “feedback” negativo desse mecanismo energeticamente custoso, evitando a depleção de recursos e maiores prejuízos para processos essenciais do crescimento e desenvolvimento vegetal e da adaptação das plantas ao meio onde vivem. Essa hipótese foi recentemente sugerida por dois importantes trabalhos da literatura (Tada et al., 2008; Wang et al., 2009). Em seu estudo, Tada e colaboradores (2008) demonstraram que a S-nitrosilação de NPR1 favorece a oligomerização dessa proteína, atenuando a transcrição de genes de defesa. Já Wang e colaboradores (2009) verificaram que a S-nitrosilação de SABP3, uma proteína ligante de ácido salicílico, também contribui para a atenuação da resposta de defesa em *A. thaliana*. Assim, os efeitos do NO na expressão gênica obtidos no presente trabalho sugerem outros mecanismos ainda não revelados pelos quais o NO levaria a um controle negativo da resposta de defesa. Esses mecanismos merecem ser analisados com maior profundidade em estudos futuros.

É importante salientar que, apesar desse possível papel na resposta de defesa, o efeito do NO sobre transcritos relacionados à homeostase e à sinalização hormonal pode estar envolvido em situações fisiológicas, independente do ataque de patógenos. Por exemplo, o antagonismo entre NO e etileno já foi reportado durante a senescência e a maturação de frutos (Leshem et al., 1998), o que foi relacionado à repressão de genes para as enzimas ACC sintase e ACC oxidase (Cheng et al., 2009). Assim, faz-se mister verificar se o tratamento com NO afetaria os transcritos apresentados na Tabela IV também em plantas *nia1 nia2* não infectadas, alterando a produção e a resposta fisiológica aos diversos hormônios vegetais.

***Efeito do NO sobre a expressão de genes relacionados à homeostase redox e à produção de energia: um estímulo à fotossíntese e a mecanismos de proteção contra espécies reativas de oxigênio***

Diversos genes associados à homeostase redox das células e à proteção contra espécies reativas de oxigênio tiveram sua expressão modulada por NO, incluindo genes codificantes para glutathione *S*-transferases, catalase, peroxidases, tiorredoxinas e glutarredoxinas (Tabela V), que já foram detectados como responsivos ao NO em diversas análises transcriptômicas (Huang et al., 2002; Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2008; Besson-Bard et al., 2009). Essa observação está coerente com o “burst” oxidativo inerente às interações incompatíveis (Delledonne et al., 2001) e com o efeito do próprio NO em causar o estresse oxidativo em determinadas situações (Huang et al., 2002). Além disso, modificações redox são consideradas mecanismos de sinalização durante a resposta de defesa (Tada et al., 2008). Em especial, a indução de genes de enzimas que catalisam a redução de pontes dissulfeto, como tiorredoxinas e glutarredoxinas, pode ser relevante para a regulação da atividade de proteínas (Meyer et al., 2008). Particularmente, já foi demonstrado que diversas enzimas fotossintéticas são ativadas por ação específica das tiorredoxinas do tipo F encontradas nos cloroplastos (Schurmann e Jacquot, 2000). A formação de grupos –SH em resíduos de cisteínas pode também ser importante para tornar possível a *S*-nitrosilação de certas proteínas, propiciando a regulação de sua atividade pelo NO (Lindermayr et al., 2005).

Observou-se também um marcante efeito do NO em estimular a expressão de diversos transcritos relacionados à fotossíntese (Tabela VI), incluindo genes para proteínas da fase de claro envolvidas no metabolismo da clorofila, na síntese de ATP e na composição dos fotossistemas, bem como genes para enzimas do ciclo de Calvin e da fotorrespiração. Uma indução pelo NO de genes da Rubisco (Huang et al., 2002) e de proteínas relacionadas à percepção da luz e à transferência de energia durante a fotossíntese (Polverari et al., 2003) já havia sido verificada. Todavia, grande parte dos transcritos relacionados à fotossíntese que foram detectados como responsivos ao NO no presente estudo se diferenciam dos obtidos anteriormente. Além disso, algumas das proteínas

fotossintéticas cujos genes foram induzidos pela fumigação de plantas *nia1 nia2* tem sido identificadas como alvos de *S*-nitrosilação e nitratação (Lindermayr et al., 2005; Cecconi et al., 2009), de modo que os resultados da presente análise transcriptômica sugerem um outro aspecto da importância do NO como uma molécula sinalizadora nesse processo de produção de energia e de biomassa durante a resposta de defesa. Adicionalmente, o NO modulou outros transcritos relacionados ao metabolismo e à produção de energia a partir de carboidratos, como alguns envolvidos na via glicolítica, na quebra de outros açúcares, e no metabolismo da sacarose (Tabela VI).

Em comparação ao efeito sobre os cloroplastos, poucos genes de proteínas envolvidas na bionergética mitocondrial foram afetados pelo tratamento com NO (Tabela VI). Interessantemente, as duas proteínas mitocondriais cujos genes foram estimulados (proteína desacopladora e uma subunidade do complexo I) foram demonstradas como importantes para uma performance fotossintética ótima, em especial durante condições fotorrespiratórias (Duttillleul et al., 2003; Sweetlove et al., 2006). Genes como os codificantes para a oxidase alternativa, previamente demonstrados como responsivos ao NO (Huang et al., 2002), não tiveram sua expressão alterada pela fumigação. Como eles são também induzidos por espécies reativas de oxigênio (Polidoros et al., 2005), é possível que o estresse oxidativo inerente à infecção de *Pst* tenha induzido a expressão desses genes independente do NO, explicando sua ausência na presente análise. O mesmo pode se aplicar a genes como *PAL* e *CHS* (Delledonne et al., 1998).

O efeito do NO sobre a expressão de *AtPUMP2* é um dado relativamente novo, uma vez que apenas o gene de uma outra isoforma da proteína desacopladora (*AtPUMP5*) havia sido documentado como responsivo a esse radical (Parani et al., 2004; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2008; Besson-Bard et al., 2009). Além de sua possível relação com a fotossíntese, a atividade das proteínas desacopladoras está associada a uma menor formação de espécies reativas de oxigênio por reduzir o vazamento de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial (Vercesi et al., 2006). Assim, a indução pelo NO de genes para essas proteínas, em adição ao efeito desse radical sobre transcritos relacionados ao sistema antioxidante (Tabela V), pode representar um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo durante a resposta de defesa.

Além disso, o desacoplamento da atividade respiratória, bem como outros processos relacionados à homeostase redox das células, poderiam influenciar o mecanismo mitocondrial de degradação de NO dependente de superóxido e de NAD(P)H, descrito no primeiro capítulo desta tese. Particularmente, pode-se supor que a proteína desacopladora levaria a um aumento da meia-vida do NO, de uma forma semelhante à ação realizada pela oxidase alternativa (Wulff et al., 2009). Em mitocôndrias isoladas de células de *A. thaliana*, a atividade da oxidase alternativa, por diminuir a formação de superóxido pela cadeia respiratória, atenuou a degradação de NO, agindo de uma maneira contrária às NAD(P)H desidrogenases externas. Apesar disso, as mitocôndrias continuaram respirando na presença de NO, já que a oxidase alternativa, ao contrário da citocromo *c* oxidase, não é inibida por NO. Dessa forma, propôs-se a importância da ação coordenada da oxidase alternativa e das NAD(P)H desidrogenases externas na manutenção da homeostase do NO e no controle da respiração celular (Wulff et al., 2009). Nesse contexto, seria interessante verificar o papel das proteínas desacopladoras e da modulação de seus genes por NO nesse processo.

### ***Efeitos pleiotrópicos do NO sobre a expressão gênica***

Vários outros genes codificantes para componentes de cascatas de transdução de sinais tiveram sua expressão modulada positiva ou negativamente pela fumigação com NO, incluindo diversas proteínas quinases, fosfatases, GTPases e receptores (Tabela VII). Além dos já apresentados acima, genes de inúmeros fatores de transcrição foram diferencialmente expressos em resposta ao NO, com destaque para proteínas “zinc finger”, elementos responsivos ao etileno, fatores bHLH e NAM (Tabela VIII). A identificação de um grande número de genes relacionados a cascatas de sinalização e fatores de transcrição modulados por NO, também descrita por trabalhos anteriores (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009; Besson-Bard et al., 2009), é interessante em vista das amplas funções que tem sido atribuídas a esse radical em vegetais.

Uma outra classe de transcritos modulados pelo tratamento com NO abrange aqueles associados a processos de degradação de proteínas (Parani et al., 2004; Ferrarini et

al., 2008; Palmieri et al., 2008), os quais tem sido associados ao reconhecimento do patógeno e na ativação da resposta de defesa (Estelle, 2001; Suty et al., 2003; Luo et al., 2009). Genes de inúmeros tipos de proteases e peptidases e de componentes da via de catabolismo de proteínas dependente da ubiquitina foram diferencialmente expressos (Tabela IX). Um destaque foi o gene da subunidade alfa-B2 do proteassomo 20S, cuja expressão aumentou em quase 20 vezes e está relacionada à degradação de proteínas oxidadas durante o processo de defesa (Suty et al., 2003). Além disso, a Tabela IX mostra que o NO induziu a expressão de genes de proteínas “heat shock”, chaperonas conhecidas por manterem ou restaurarem a homeostase protéica durante diversas situações de estresse (Baniwal et al., 2004).

Genes de proteínas do metabolismo de diversos aminoácidos também tiveram sua expressão modulada pela fumigação com NO (Tabela X), bem como genes de proteínas envolvidas no metabolismo de ácidos nucleicos, na síntese protéica e no ciclo celular (Tabela XI). Além disso, genes de enzimas da via de modificação de antocianinas e flavonóides, produtos do metabolismo secundário vegetal, foram regulados por NO (Tabela XII). Particularmente, foi observada a repressão de transcritos de enzimas que glicosilam flavonóides como a quercetina (Tabela XII), sugerindo uma ação do NO em manter esses compostos na forma aglicona, um efeito semelhante ao observado sobre as auxinas e as citocininas (Tabela IV). Essa hipótese está de acordo com resultados prévios de nosso grupo, observados em cotilédones e embriões de soja, em que o tratamento com doadores de NO induziu a formação de isoflavonas nas formas agliconas, que são farmacologicamente ativas (Modolo et al., 2002; Ferreira e Salgado, 2008). Além das proteínas relacionadas ao metabolismo de flavonóides e de fitormônios, genes para diversas outras glicosil-transferases foram reprimidos pela fumigação com NO (Tabela XII), apesar de não se saber a que classe de compostos grande parte dessas enzimas são capazes de transferir o grupamento glicosil. Esses resultados contrastam com trabalhos anteriores, que haviam reportado uma indução de transcritos de glicosil-transferases pelo NO (Parani et al., 2004; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009).

Além de afetar genes relacionados a diversos aspectos do metabolismo, o NO modulou a expressão de transcritos associados ao transporte de substâncias, como íons

metálicos, açúcares e compostos nitrogenados (Tabela XIII). Um destaque foi a repressão por NO de 9 genes de transportadores de drogas da família ABC. Da mesma forma, a fumigação reprimiu a expressão de 16 genes para enzimas da família das citocromos P450 (Tabela XIV), sendo este um resultado oposto à indução dos genes dessas duas classes de proteínas em resposta ao NO observada em outros trabalhos (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009). De fato, transportadores ABC e citocromos P450 são considerados importantes na resposta a estresses e em processos de detoxificação, sendo comumente induzidos durante o ataque de patógenos (Schuler e Werch-Reichhart, 2003; Rea, 2007). No presente trabalho, é possível que a própria infecção com Pst tenha induzido a expressão desses genes, independente do NO. Assim, a fumigação com NO teria apenas atenuado a expressão já elevada desses genes em folhas *nia1 nia2* infectadas com o patógeno, da mesma forma que Ahlfors e colaboradores (2009) observaram um efeito do NO em reduzir a expressão de genes de defesa induzida por ozônio. Assim, a ação do NO sobre transcritos de transportadores ABC e citocromos P450 poderia representar mais um mecanismo de atenuação e controle da resposta de defesa, no mesmo sentido que a atuação do NO sobre genes relacionados à homeostase e à sinalização hormonal. É importante citar que diferentes transportadores ABC e citocromos P450, além do papel em processos de detoxificação, podem possuir funções específicas no metabolismo vegetal, como modificações de lipídios e a homeostase hormonal (Schuler e Werch-Reichhart, 2003; Rea, 2007). Dessa forma, seria interessante verificar os papéis específicos exercidos pelos transportadores ABC e citocromos P450 que foram reprimidos pelo NO.

A Tabela XIV também mostra diversos outros genes modulados pelo tratamento com NO, relacionados a funções diversas, abrangendo por exemplo a homeostase do íon ferro, a síntese de coenzimas e grupos prostéticos e a resposta a estresses abióticos. Finalmente, a Tabela XV apresenta genes codificantes para proteínas desconhecidas ou de função não determinada.

#### 4 – Conclusões:

O presente estudo indicou um amplo efeito do NO sobre a expressão de genes relacionados a diversos aspectos do metabolismo, transporte, vias de transdução de sinal, controle da transcrição, homeostase redox e catabolismo de proteínas, dentre outros processos, o que está de acordo com as múltiplas funções que tem sido atribuídas ao NO nos vegetais. Em especial, a análise transcriptômica demonstrou que o tratamento com o gás NO induziu a expressão de inúmeros genes de defesa em plantas *nia1 nia2* inoculadas com Pst. Essa ativação gênica da resposta de resistência está de acordo com o efeito do NO em reduzir o crescimento bacteriano e o desenvolvimento dos sintomas da doença nas plantas *nia1 nia2*, demonstrando que a susceptibilidade desse mutante à Pst é resultante de sua deficiente produção de NO.

A análise transcriptômica aqui realizada corroborou resultados de trabalhos anteriores, mostrando o papel do NO em estimular a expressão de genes pertencentes às vias de sinalização do ácido salicílico e do cálcio, à reorganização da parede celular, à síntese de compostos antimicrobianos e às proteínas relacionadas à patogênese (Polverari et al., 2003; Parani et al., 2004; Zago et al., 2006; Badri et al., 2008; Ferrarini et al., 2008; Palmieri et al., 2008; Ahlfors et al., 2009). Ainda, novos genes despontaram a partir deste estudo como alvos potenciais do NO durante a interação fitopatogênica. Os aspectos não previamente documentados das ações do NO sobre a expressão gênica podem ter se despontado devido ao fato de a presente análise ter sido realizada com plantas *nia1 nia2*, que apresentam uma produção de NO muito reduzida em relação ao genótipo selvagem, mesmo após a inoculação com o patógeno (como apresentado no capítulo 3 desta tese). Essa diferença permitiria detectar no mutante *nia1 nia2* o efeito do NO exógeno sobre a expressão de certos genes alvo, que poderiam estar com a expressão previamente induzida ou reprimida em plantas selvagens, devido a seu conteúdo endógeno de NO já relativamente elevado. Além disso, no presente estudo, o tratamento com o gás NO foi realizado com plantas *nia1 nia2* inoculadas com Pst. Dessa forma, no modelo aqui utilizado, o NO exógeno poderia interagir com sinais específicos produzidos pela planta ou mesmo pela bactéria durante a interação fitopatogênica.

A importância do contexto em que se realiza o tratamento com NO foi verificada recentemente por Ahlfors e colaboradores (2009) num estudo sobre a participação desse radical na resposta das plantas à exposição ao ozônio. Nesse trabalho, enquanto o nitroprussiato de sódio induziu genes relacionados à resposta a estresses em plantas controle, esse mesmo doador de NO levou a uma atenuação da expressão dos mesmos genes em plantas tratadas com ozônio (Ahlfors et al., 2009). De uma maneira semelhante, na presente análise, a fumigação com NO alterou transcritos relacionados à sinalização e à homeostase hormonal de forma a permitir um possível controle atenuador de mecanismos da resposta de defesa, conforme vem sendo sugerido pelos efeitos da *S*-nitrosilação em proteínas de vias de defesa (Tada et al., 2008; Wang et al., 2009). Interessantemente, uma repressão de genes de diversos transportadores ABC e citocromos P450 foi observada. Adicionalmente, destacaram-se o potencial envolvimento do NO na formação de sinais lipídicos para a resposta sistêmica, no estímulo a várias etapas da fotossíntese e na repressão de enzimas que glicosilam flavonóides e outros compostos. As intrigantes alterações transcriptômicas observadas no presente modelo não apenas abrem novas perspectivas de estudos sobre a sinalização do NO na interação fitopatogênica, mas também trazem subsídios para investigações acerca das ações desse radical em diversos processos relacionados ao crescimento e ao desenvolvimento vegetal.



## Referências

- Ahlfors, R., Brosché, M., Kollist, H., Kangasjärvi, J. (2009) Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **58**: 1-12.
- Badri, D.V., Loyola-Vargas, V.M., Du, J., Stermitz, F.R., Broeckling, C.D., Iglesias-Andreu, L., Vivanco, J.M. (2008) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytol.* **179**: 209-223.
- Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., von Koskull-Döring, P. (2004) Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**: 471-487.
- Besson-Bard, A., Astier, J., Rasul, S., Wawer, I., Dubreuil-Maurizi, C., Jeandroz, S., Wendehenne, D. (2009) Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Sci.* **177**: 302-309.
- Caffall, K.H., Mohnen, D. (2009) The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydr. Res.* **344**: 1879–1900.
- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, L., Rinalducci, S., Zolla, L., Delledonne, M. (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**: 2460–2468.
- Chassot, C., Nawrath, C., Métraux, J.P. (2007) Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant J.* **49**: 972-980.
- Chen, C., Chen, Z. (2002) Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol.* **129**: 706–716.
- Cheng, G., Yang, E., Lu, W., Jia, Y., Jiang, Y., Duan, X. (2009) Effect of nitric oxide on ethylene synthesis and softening of banana fruit slice during ripening. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 5799–5804.

- Chiasson, D., Ekengren, S.K., Martin, G.B., Dobney, S.L., Snedden, W.A. (2005) Calmodulin-like proteins from *Arabidopsis* and tomato are involved in host defense against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Plant Mol. Biol.* **58**: 887–897.
- Coaker, G., Falick, A., Staskawicz, B. (2005) Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. *Science* **308**: 548-550.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talon, M., Robles, M. (2005) Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**: 3674-3676.
- Courtois, C., Besson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide signalling in plants: interplays with  $\text{Ca}^{2+}$  and protein kinases. *J. Exp. Bot.* **59**: 155–163.
- Dellagi, A., Helibronn, J., Avrova, A.O., Montesano, M., Palva, E.T., Stewart, H.E., Toth, I.K., Cooke, D.E., Lyon, G.D., Birch, P.R. (2000) A potato gene encoding a WRKY-like transcription factor is induced in interactions with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *Phytophthora infestans* and is coregulated with class I endochitinase expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1091-1101.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 13454-13459.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M. (2005) The F-box protein TIR1 is a auxin receptor. *Nature* **435**: 441-445.
- Dong, X. (2004) The role of membrane-bound ankyrin-repeat protein ACD6 in programmed cell death and plant defense. *Science STKE* pe6.
- Dutilleul, C., Driscoll, S., Cornic, G., De Paepe, R., Foyer, C.H., Noctor, G. (2003) Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol.* **131**: 264-275.
- Durrant, W.E., Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185-209.

- Estelle, M. (2001) Proteases and cellular regulation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 254-260.
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., Delledonne, M. (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 781-790.
- Ferreira, P.G., Salgado, I. (2008) Nitrite-reducing activity to nitric oxide by soybean extracts enriched in aglicone flavonoids. *Comp. Biochem. Physiol. Part A* **150**: S184-S185.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. (1995) The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends Microbiol.* **3**: 72-74.
- Grun, S., Lindermayr, C., Sell, S., Durner, J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 507-516.
- Halestrap, A.P., McStay, G.P., Clarke, S.J. (2002) The permeability transition pore complex: another view. *Biochimie* **84**: 153-166.
- Hou, B., Lim, E.K., Higgins, G.S., Bowles, D.J. (2004) N-glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**: 47822-47832.
- Huang, X., von Rad, U., Durner, J. (2002) Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* **215**: 914-923.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M.J., Durner, J. (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946.
- Jin, H., Cominelli, E., Bailey, P., Parr, A., Mehrtens, F., Jones, J., Tonelli, C., Weisshaar, B., Martin, C. (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **19**: 6150-6161.
- Jung, H.W., Tschaplinski, T.J., Wang, L., Glazebrook, J., Greenberg, J.T. (2009) Priming in systemic plant immunity. *Science* **324**: 89-91.
- Kachroo, A., Kachroo, P. (2009) Fatty Acid-derived signals in plant defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **47**: 153-176.

- Kazan, K., Manners, J.M. (2009) Linking development to defense: auxin in plant–pathogen interaction. *Trends Plant Sci.* **14**: 373–382.
- Kwon, S.J., Jin, H.C., Lee, S., Nam, M.H., Chung, J.H., Kwon, S.I., Ryu, C.M., Park, O.K. (2009) GDSL lipase-like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* **58**: 235–245.
- 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.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., Delledonne, M. (2009) NO signals in the haze: Nitric oxide signaling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 451–458.
- Leon-Reyes, A., Spoel, S.H., De Lange, E.S., Abe, H., Kobayashi, M., Tsuda, S., Millenaar, F.F., Welschen, R.A., Ritsema, T., Pieterse, C.M. (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol.* **149**: 1797–1809.
- Leshem, Y. Y., Wills, R. B. H., Ku, V. V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas — nitric oxide (NO<sup>•</sup>) — as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **36**: 825–826.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**: 921–930.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Bahnweg, G., Durner, J. (2006) Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *J. Biol. Chem.* **281**: 4285–4291.
- Luo, Y., Caldwell, K.S., Wroblewski, T., Wright, M.E., Michelmore, R.W. (2009) Proteolysis of a negative regulator of innate immunity is dependent on resistance genes in tomato and *Nicotiana benthamiana* and induced by multiple bacterial effectors. *Plant Cell* **21**: 2458–2472.
- Ma, W., Smigel, A., Verma, R., Berkowitz, G.A. (2009) Cyclic nucleotide gated channels and related signaling components in plant innate immunity. *Plant Signal. Behavior* **4**: 277–282.

- Maldonado, A.M., Doerner, P., Dixon, R.A., Lamb, C.J., Cameron, R.K. (2002) A putative lipid transfer protein involved in systemic resistance signaling in *Arabidopsis*. *Nature* **419**: 399-402.
- Mao, P., Duan, M., Wei, C., Li, Y. (2007) WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate-responsive gene expression. *Plant Cell Physiol.* **48**: 833–842.
- Meng, P.H., Raynaud, C., Tcherkez, G., Blanchet, S., Massoud, K., Domenichini, S., Henry, Y., Soubigou-Taconnat, L., Lelarge-Trouverie, C., Saindrenan, P., Renou, J.P., Bergounioux, C. (2009) Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **4**: e7364.
- Meyer, Y., Siala, W., Bashandy, T., Riondet, C., Vignols, F., Reichheld, J.P. (2008) Glutaredoxins and thioredoxins in plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**: 589-600.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., Salgado, I. (2002) Nitric oxide synthasemediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis* elicitor. *Plant Physiol.* **130**: 1288–1297.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., 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.
- Morot-Gaudry-Talarmain, Y., Rockel, P., Moureaux, T., Quillere, I., Leydecker, M.T., Kaiser, W.M., Morot-Gaudry, J.F. (2002) Nitrite accumulation and nitric oxide emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* **215**: 708–715.
- Mur, L.A., Carver, T.L., Prats, E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**: 489-505.

- Murphy, A.M., Otto, B., Brearley, C.A., Carr, J.P., Hanke, D.E. (2008) A role for inositol hexakisphosphate in the maintenance of basal resistance to plant pathogens. *Plant J.* **56**: 638–652.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson, I. (2008) Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.* **59**: 25-35.
- Oh, I.S., Park, A.R., Bae, M.S., Kwon, S.J., Kim, Y.S., Lee, J.E., Kang, N.Y., Lee, S., Cheong, H., Park O.K. (2005) Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *Plant Cell* **17**: 2832–2847.
- Palmieri, M.C., Sell, S., Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J., Lindermayr, C. (2008) Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J. Exp. Bot.* **59**: 177-186.
- Parani, M.R., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W., Goldman, S.L. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* **2**: 359–366.
- Patzlaff, A., McInnis, S., Courtenay, A., Surman, C., Newman, L.J., Smith, C., Bevan, M.W., Mansfield, S., Whetten, R.W., Sederoff, R.R., Campbell, M.M. (2003) Characterization of a pine MYB that regulates lignification. *Plant J.* **36**: 743-754.
- Pelloux, J., Rusterucci, C., Mellerowicz, E.J. (2007) New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci.* **12**: 267-277.
- Pieterse, C.M.J., Van Loon, L.C. (2004) NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 456–464.
- Piotrowski, M. (2008) Primary or secondary? Versatile nitrilases in plant metabolism. *Phytochemistry* **69**: 2655–2667.
- Polidoros, A.N., Mylona, P.V., Pasentsis, K., Scandalios, J.G., Tsaftaris, A.S. (2005) The maize alternative oxidase 1a (Aox1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox Rep.* **10**: 71-78.
- Polverari, A., Molesini, B., Pezzotti, M., Buonauro, R., Marte, M., Delledonne, M. (2003) Nitric oxide-mediated transcriptional changes in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 1094–1105.

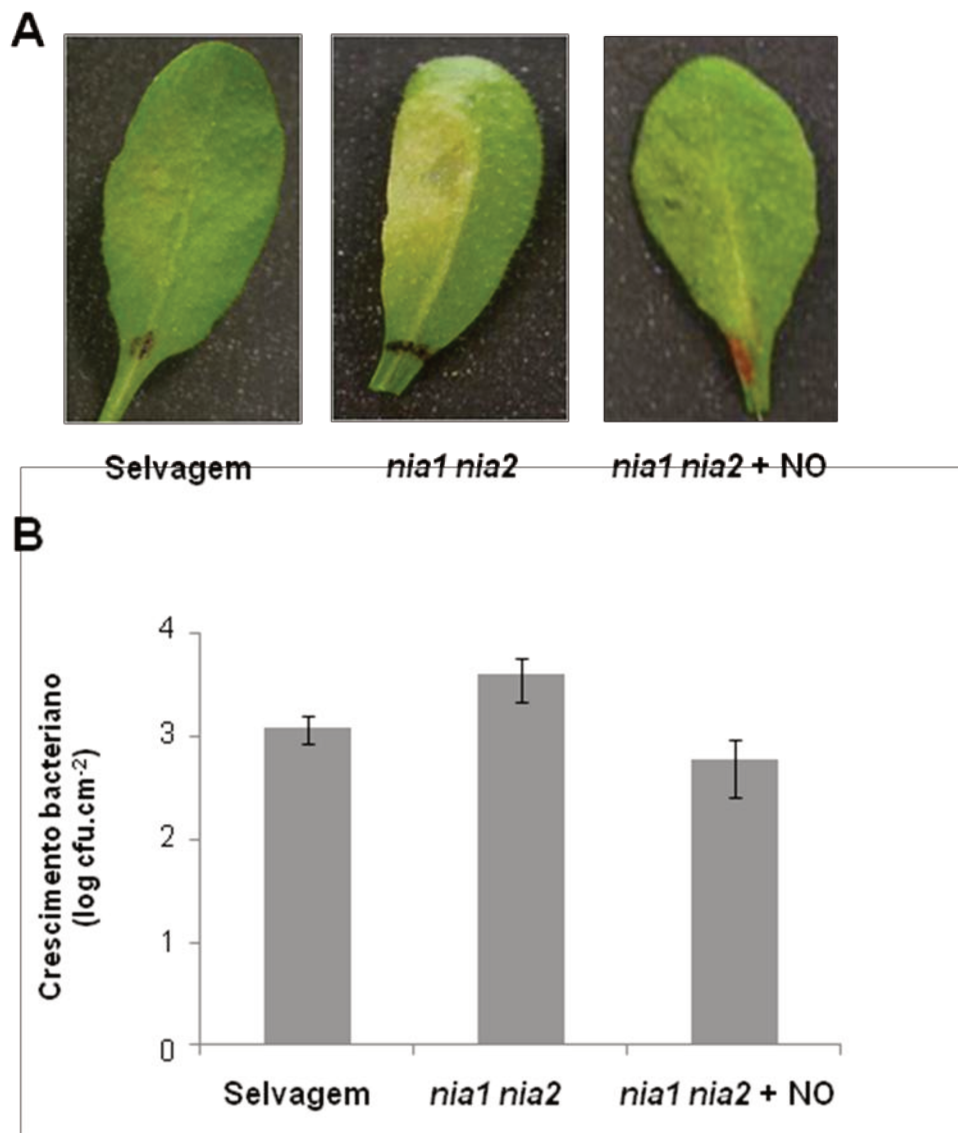
- Sarowar, S., Kim, Y.J., Kim, K.D., Hwang, B.K., Han, S., Shin, J.S. (2009) Overexpression of lipid transfer protein (LTP) genes enhances resistance to plant pathogens and LTP functions in long-distance systemic signaling in tobacco. *Plant Cell Rep.* **28**: 419–427.
- Saviani, E.E., Orsi, C.H., Oliveira, 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
- Schuler, M.A., Werck-Reichhart, D. (2003). Functional Genomics of P450s. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 629–667.
- Schurmann, P., Jacquot, J.P. (2000) Plant thioredoxin systems revisited. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 371-400.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck B.M.A., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* **46**: 941–950.
- Smyth, G.K., Michaud, J., Scott, H.S. (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**: 2067-2075.
- Suty, L., Lequeu, J., Lançon, A., Etienne, P., Petitot, A.S., Blein, J.P. (2003) Preferential induction of 20S proteasome subunits during elicitation of plant defense reactions: towards the characterization of "plant defense proteasomes". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 637-650.
- Sweetlove, L.J., Lytovchenko, A., Morgan, M., Nunes-Nesi, A., Taylor, N.L., Baxter, C.J., Eickmeier, I., Fernie, A.R. (2006) Mitochondrial uncoupling protein is required for efficient photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 19587-19592.
- Tada, Y., Spoel, S.H., Pajerowska-Mukhtar, K., Mou, Z., Song, J., Wang, C., Zuo, J., Dong, X. (2008) Plant immunity requires conformational changes of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* **321**: 952-956.
- Thaler, J.S., Fidantsef, A.L., Bostock, R.M. (2002). Antagonism between jasmonate- and salicylate-mediated induced plant resistance: effects of

concentration and timing of elicitation on defense-related proteins, herbivore, and pathogen performance in tomato. *J. Chem. Ecol.* **28**: 1131-1159.

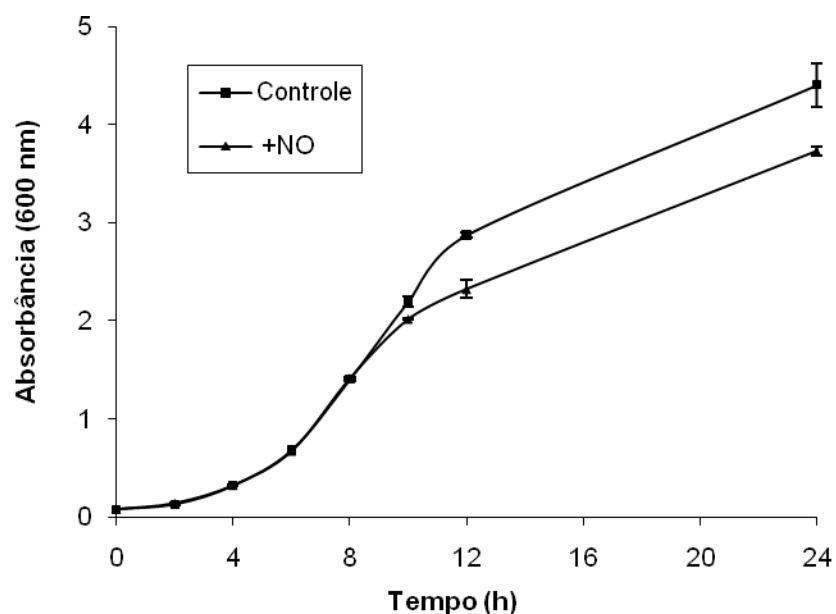
- To, J.P., Haberer, G., Ferreira, F.J., Deruère, J., Mason, M.G., Schaller, G.E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Kieber, J.J. (2004) Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **16**: 658-671.
- van Loon, L.C., Geraats, B.P.J., Linthorst, H.J.M. (2006) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci.* **11**: 184-191.
- Vercesi, A.E., Borecký, J., Maia, I.G., Arruda, P., Cuccovia, I.M., Chaimovich, H. (2006) Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 383-404.
- Vogel, J.P., Raab, T.K., Somerville, C.R., Somerville, S.C. (2004) Mutations in PMR5 result in powdery mildew resistance and altered cell wall composition. *Plant J.* **40**: 968–978.
- Vorwerk, S., Somerville, S., Somerville, C. (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci.* **9**: 203–209.
- Wang, Y.Q., Feechan, A., Yun, B.W., Shafiei, R., Hofmann, A., Taylor, P., Xue, P., Yang, F.Q., Xie, Z.S., Pallas, J.A., Chu, C.C., Loake, G.J. (2009) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J. Biol. Chem.* **284**: 2131-2137.
- Wasternack, C. (2007) Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* **100**: 681-697.
- Weigel, R.R., Bäuscher, C., Pfitzner, A.J.P., Pfitzner, U.M. (2001) NIMIN-1, NIMIN-2 and NIMIN-3, members of a novel family of proteins from *Arabidopsis* that interact with NPR1/NIM1, a key regulator of systemic acquired resistance in plants. *Plant Mol. Biol.* **46**: 143–160.
- Weigel, R.R., Pfitzner, U.M., Gatz, C. (2005). Interaction of NIMIN1 with NPR1 Modulates PR Gene Expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 1279–1291.
- Werner, T., Schmulling, T. (2009) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 527-538.



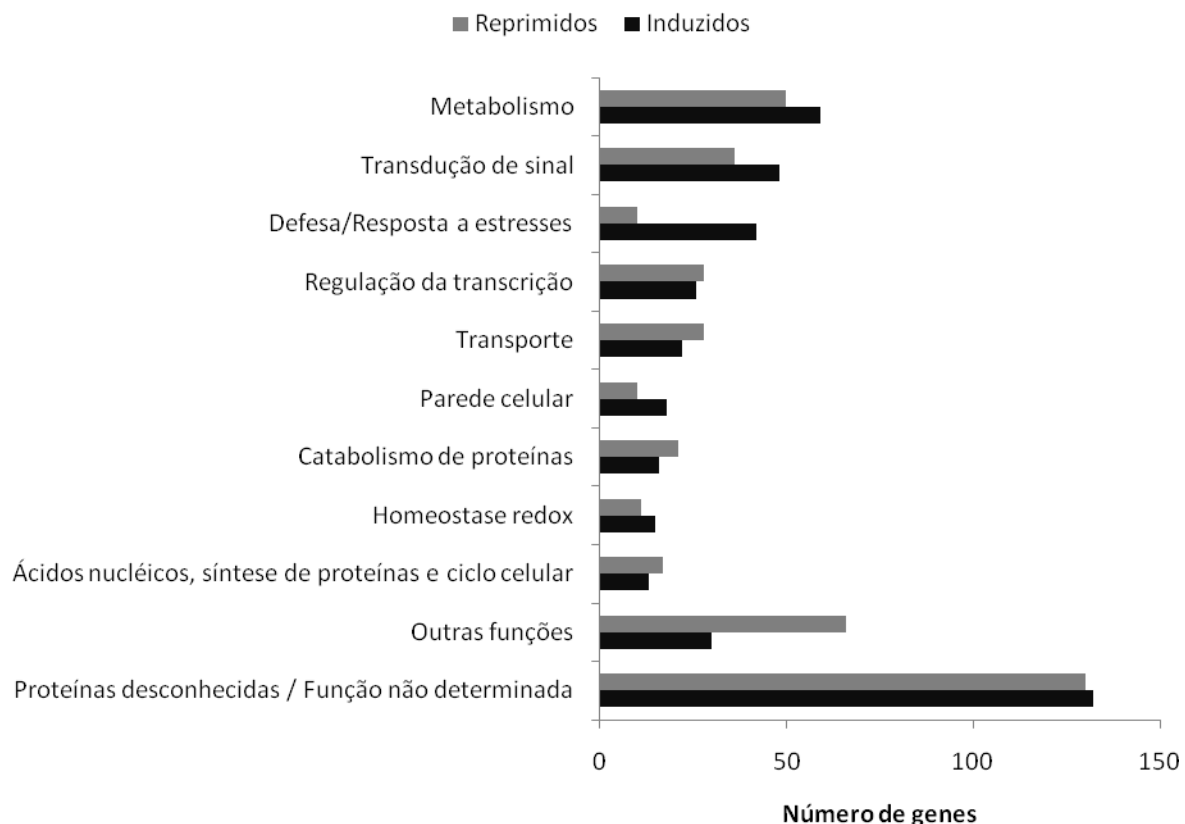
- Wilkinson, J.Q., Crawford, N.M. (1991) Identification of the Arabidopsis *CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *Plant Cell* **3**: 461-471.
- Wilkinson, J.Q., Crawford, N.M. (1993) Identification and characterisation of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 289-297.
- Wiermer, M., Feys, B.J., Parker, J.E. (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 383-389.
- Woodward, A.W., Bartel, B. (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann. Bot.* **95**: 707-735.
- Wulff, A., Oliveira, H.C., Saviani, E.E., Salgado, I. (2009) Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by Arabidopsis mitochondria: influence of external NAD(P)H dehydrogenases and alternative oxidase in the control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide* **21**: 132-139.
- Xue, H., Chen, X., Li, G. (2007) Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**: 483-489.
- Yeats, T.H., Rose, J.K.C. (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* **17**: 191-198.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M., Breusegem, F.V. (2006) Nitric oxide- and hydrogen peroxide-responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiol.* **141**: 404-411.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 15811-15816.



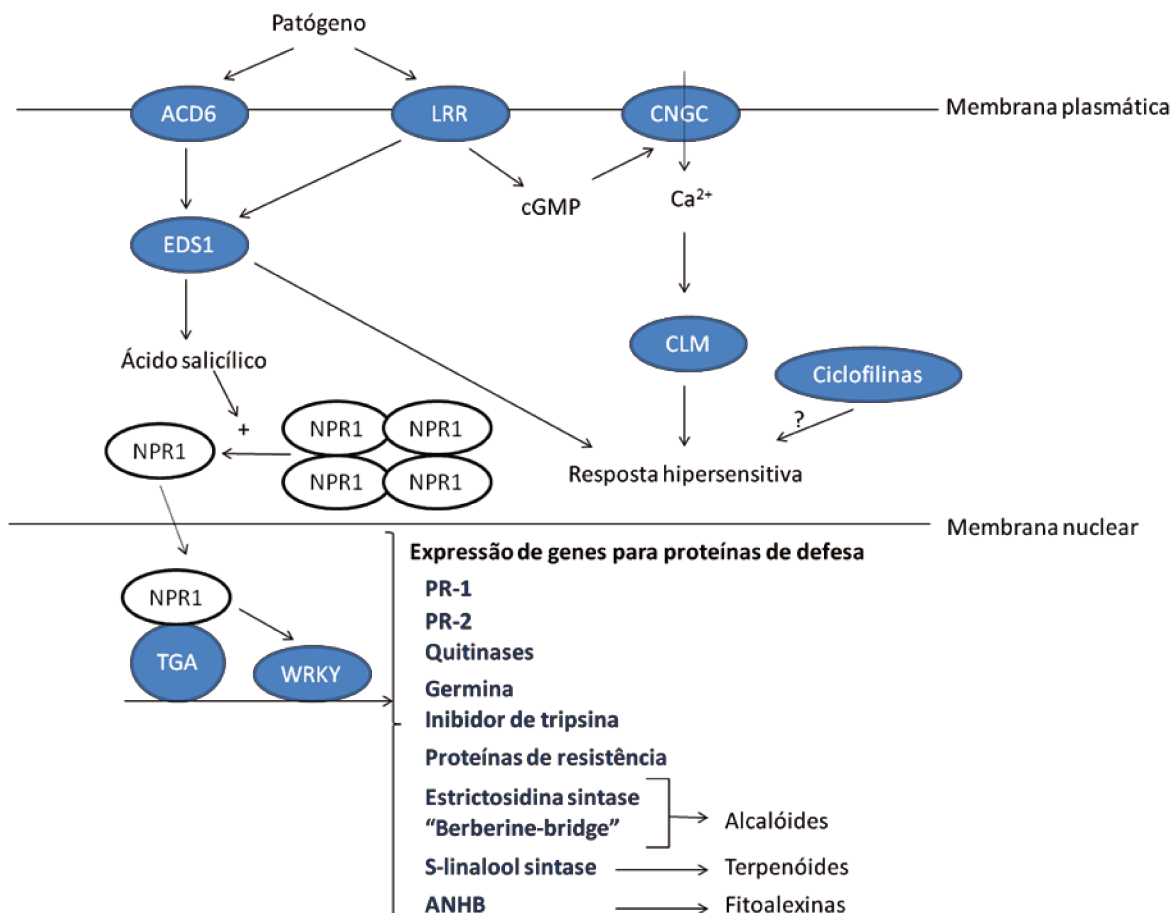
**Figura 1.** Efeito da fumigação com NO nos sintomas macroscópicos e no crescimento de Pst em folhas de plantas *nia1 nia2* cultivadas com glutamina. Folhas de plantas mutante *nia1 nia2* tratadas com glutamina (5 mM), inoculadas com (A)  $5 \times 10^6$  cfu.mL<sup>-1</sup> ou (B)  $5 \times 10^5$  cfu.mL<sup>-1</sup> de Pst, foram mantidas na câmara de fumigação com uma atmosfera de  $15 \pm 5$  ppm de NO, a um fluxo total de 300 mL.min<sup>-1</sup>. Após 48 h, (A) o desenvolvimento de sintomas e (B) o crescimento bacteriano em plantas *nia1 nia2* tratadas com NO (*nia1 nia2* + NO) foram comparados ao observado em plantas *nia1 nia2* (também cultivadas com glutamina) e selvagem infectadas mantidas na câmara com um fluxo de ar comercial puro. Em (B), os dados representam média  $\pm$  SD ( $n = 7$ ).



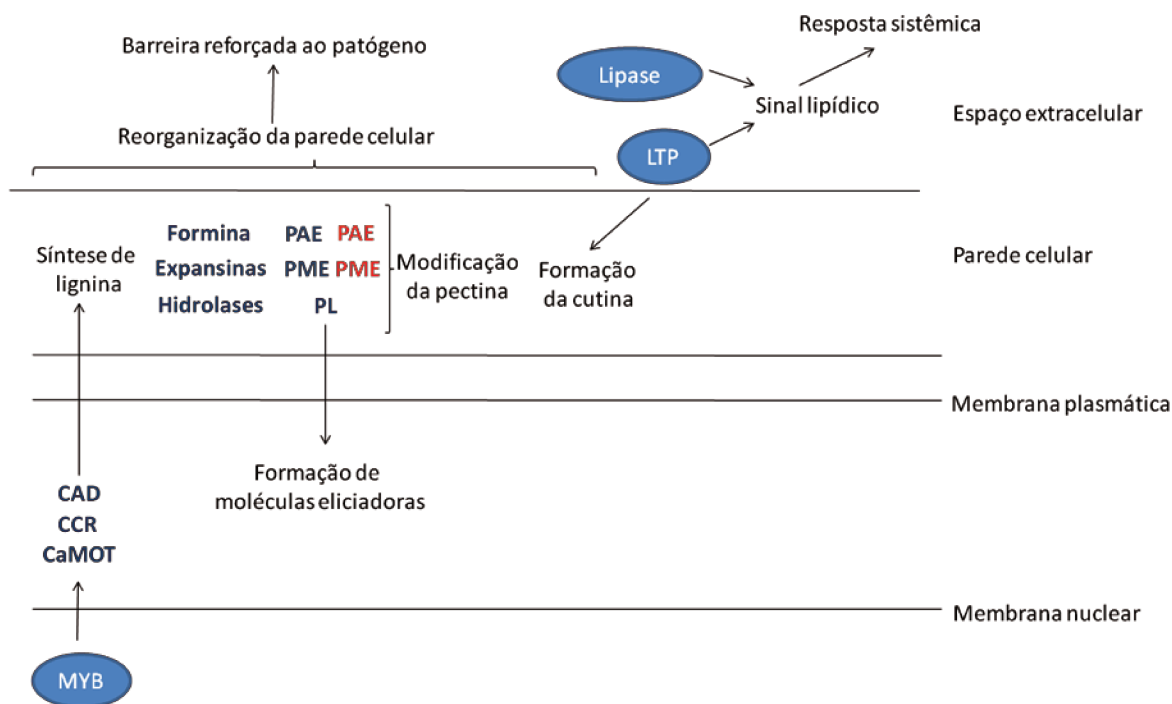
**Figura 2.** Efeito da fumigação com NO no crescimento de suspensões de Pst. Suspensões de Pst em meio B de King líquido ( $A_{600} = 0,05$ ), mantidas sob agitação de 150 rpm, foram tratadas com uma atmosfera de  $15 \pm 5$  ppm de NO. O crescimento bacteriano de suspensões tratadas com NO (+NO), acompanhado pelo aumento da absorbância a 600 nm, foi comparado ao de suspensões de Pst mantidas sob o mesmo fluxo de ar comercial puro (Controle). Os dados representam média  $\pm$  SD ( $n = 3$ ).



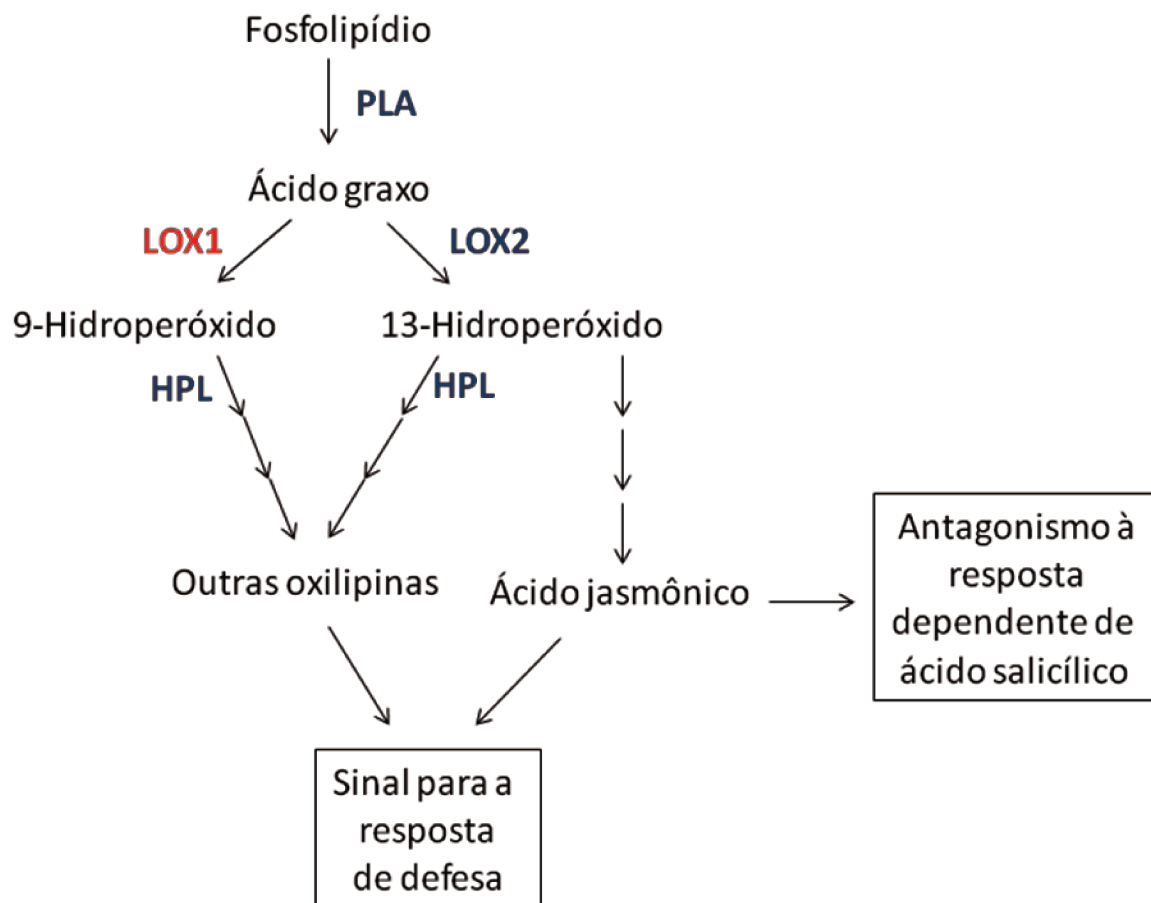
**Figura 3.** Categorização funcional dos genes diferencialmente expressos em folhas *nial nia2*, previamente cultivadas com glutamina (5 mM) e infectadas com  $5 \times 10^6$  cfu.mL<sup>-1</sup> de Pst, após 12 h de fumigação com  $15 \pm 5$  ppm de gás NO. A anotação funcional foi realizada utilizando o programa Blast2GO, o banco de dados Uniprot e informações da literatura. Os genes diferencialmente expressos aqui representados são estatisticamente significantes a  $P < 0,05$  e apresentam uma indução ou repressão de pelo menos 2 vezes.



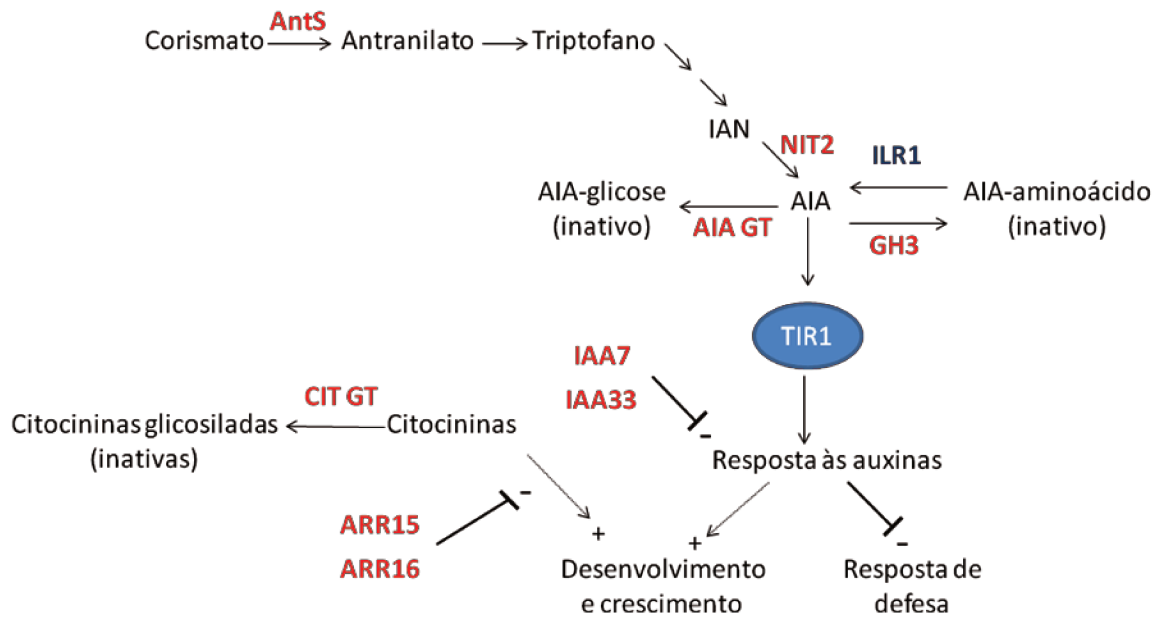
**Figura 4.** Esquema das vias de sinalização de defesa moduladas transcriptomicamente pelo NO. As proteínas destacadas em azul ou representadas como esferas azuis tiveram seus genes induzidos pela fumigação com NO. TGA e WRKY são fatores de transcrição. Abreviaturas: ACD6, “accelerated cell death 6”; ANHB, antranilato N-hidroxicinamoil/benzoiltransferase; CLM, calmodulina; CNGC, canal modulado por nucleotídeos cíclicos; EDS1, “enhanced disease susceptibility 1”; LRR, receptor com repetições ricas em leucina; NPR-1, “non-expressor of pathogenesis-related genes 1”; PR-1, proteína relacionada à patogênese-1; PR-2, proteína relacionada à patogênese-2.



**Figura 5.** Esquema das proteínas de reorganização da parede celular e do metabolismo de lipídios moduladas transcricionalmente pelo NO. As proteínas destacadas em azul ou representadas como esferas azuis tiveram seus genes induzidos pela fumigação com NO, ao passo que as destacadas em vermelho tiveram seus genes reprimidos. Abreviaturas: CAD, cinamil-álcool desidrogenase; CaOMT, ácido caféico 3-O-metiltransferase; CCR, cinamoil-CoA redutase; PAE, pectina acetiltransferase; PL, pectato liase; PME, pectina metiltransferase.

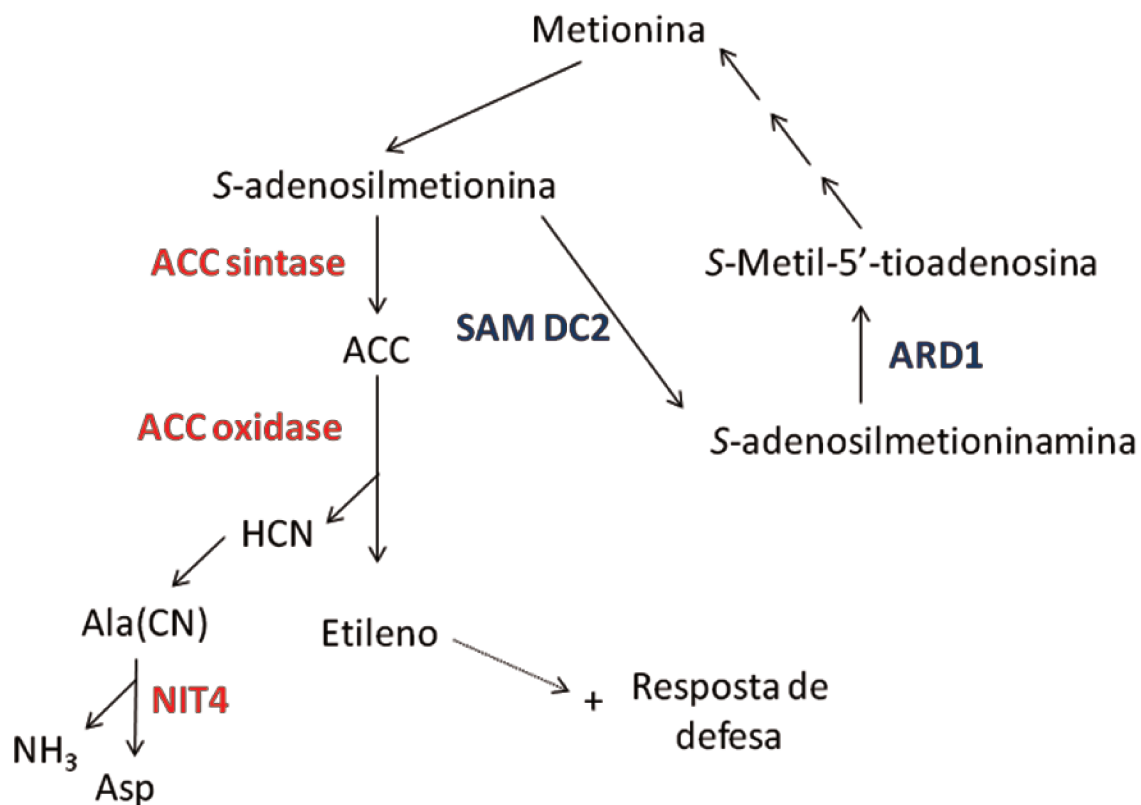


**Figura 6.** Esquema das proteínas da síntese de ácido jasmônico e outras oxilipinas moduladas transcriptomicamente pelo NO. As proteínas destacadas em azul tiveram seus genes induzidos pela fumigação com NO, ao passo que as em vermelho tiveram seus genes reprimidos. Abreviaturas: HPL, hidroperóxido liase; LOX, lipoxigenase; LTP, proteína transferidora de lipídios; PLA, fosfolipase A.

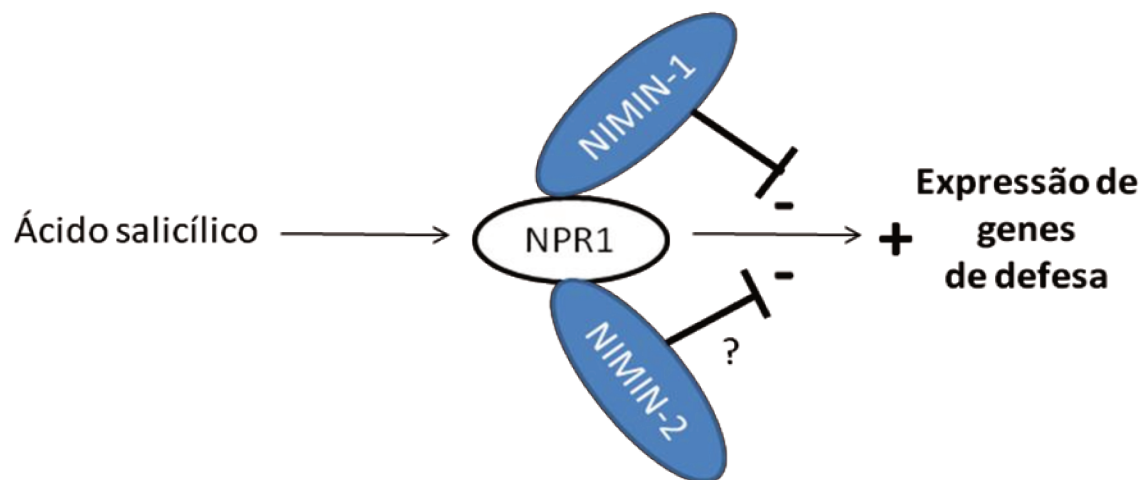


**Figura 7.** Esquema das proteínas da síntese e da via de sinalização das auxinas e citocininas moduladas transcriptomicamente pelo NO. As proteínas destacadas em azul ou representadas como esferas azuis tiveram seus genes induzidos pela fumigação com NO, ao passo que as em vermelho tiveram seus genes reprimidos. Abreviaturas: AIA, ácido indol 3-acético; AIA GT, ácido indol 3-acético glicosiltransferase; AntS, antranilato sintase; CIT GT, citocinina glicosiltransferase; GH3, ácido indol 3-acético-amido sintetase; IAN, indol acetoneitrila; ILR1, AIA-aminoácido hidrolase; NIT2, nitrilase 2; TIR1, “transport inhibitor response 1”.

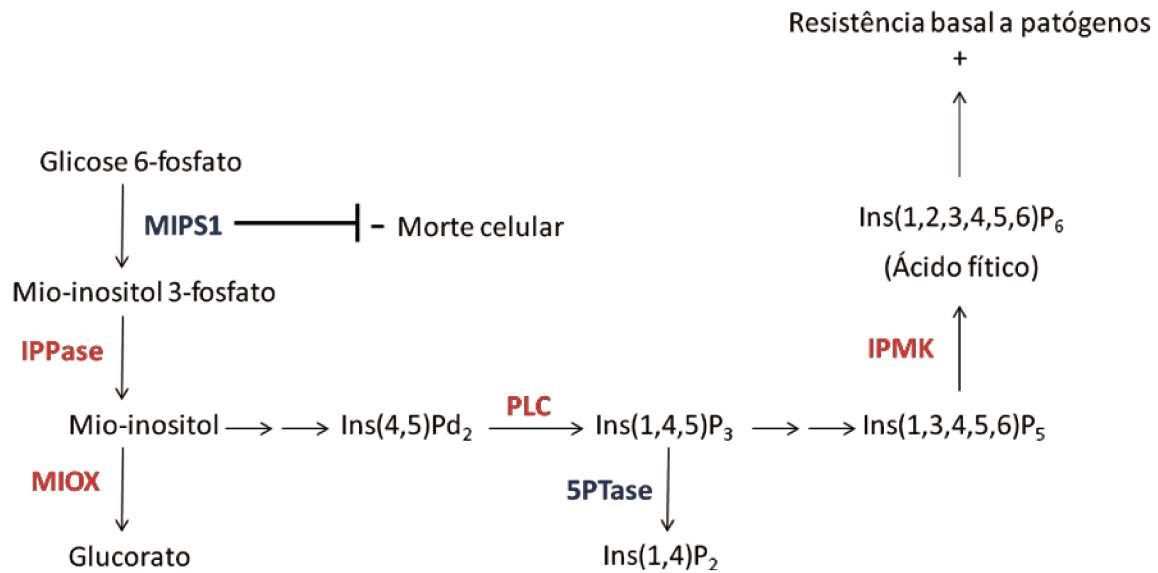




**Figura 8.** Esquema das proteínas da síntese de etileno e da via de salvamento da metionina moduladas transcriptomicamente pelo NO. As proteínas destacadas em azul tiveram seus genes induzidos, ao passo que as destacadas em vermelho tiveram seus genes reprimidos pela fumigação com NO. Abreviaturas: Ala(CN),  $\beta$ -cianoalanina; Asp, aspartato; ACC, 1-aminociclopropano-1-carboxilato; ARD1, aci-reductona dioxigenase 1; NIT4, nitrilase 4; SAM DC2, S-adenosilmetionina decarboxilase 2;.



**Figura 9.** Esquema representativo do papel de NIMIN-1 e, possivelmente, NIMIN-2 na atenuação da expressão de genes de defesa induzida por ácido salicílico via NPR-1. As proteínas representadas como esferas azuis tiveram seus genes induzidos pela fumigação com NO.



**Figura 10.** Esquema das proteínas da via do mio-inositol moduladas transcriptomicamente pelo NO. As proteínas destacadas em azul tiveram seus genes induzidos, ao passo que as destacadas em vermelho tiveram seus genes reprimidos pela fumigação com NO. Abreviaturas: 5PTase, inositol polifosfato 5-fosfatase; IPMK, inositol polifosfato multiquinase; IPPase, inositol-fosfato fosfatase; MIOX, mio-inositol oxigenase; MIPS1, mio-inositol 1-fosfato sintase 1; PLC, fosfolipase C.

**Tabela I.** Lista de genes relacionados à defesa cuja expressão em folhas *nial nia2*, previamente cultivadas com glutamina (5 mM) e infectadas com  $5 \times 10^6$  cfu.mL<sup>-1</sup> de Pst, foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com  $15 \pm 5$  ppm de gás NO.

| Probe ID                                                        | Uniprot | Anotação                                                                                                    | Fold Change |
|-----------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Receptores ricos em leucina</i></b>                       |         |                                                                                                             |             |
| TC287555                                                        | Q9LP24  | Probable leucine-rich repeat receptor-like protein kinase At1g35710                                         | 2,80        |
| TC299472                                                        | Q9C9N5  | Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete     | 2,44        |
| TC299305                                                        | Q9LJS2  | Leucine-rich repeat disease resistance protein-like, complete                                               | 2,39        |
| TC281243                                                        | Q9FKZ0  | Probable disease resistance protein At5g66910, complete (NB-LRR family)                                     | 2,05        |
| TC306791                                                        | C0LGL9  | LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase FEI 2 (EC 2.7.11.1) {Arabidopsis thaliana}, partial (19%) | -3,10       |
| <b><i>Canais de cálcio</i></b>                                  |         |                                                                                                             |             |
| TC283177                                                        | B3FXQ4  | Cyclic nucleotide gated ion channel 11 (ATCNGC11); calmodulin binding {Arabidopsis thaliana}, complete      | 2,27        |
| TC281918                                                        | Q9SKD7  | Probable cyclic nucleotide-gated ion channel 3 (AtCNGC3), complete                                          | 2,08        |
| <b><i>Calmodulinas/Proteínas ligantes de calmodulinas</i></b>   |         |                                                                                                             |             |
| TC308071                                                        | Q9FIH9  | Calcium-binding protein CML37 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (82%)                   | 9,86        |
| TC293788                                                        | P30187  | 22 kDa calmodulin-like calcium-binding protein (CABP-22), complete                                          | 3,04        |
| TC298333                                                        | Q9FI19  | Calmodulin-like protein CML43 (At5g44460), complete                                                         | 2,60        |
| TC300372                                                        | Q9C9T2  | Putative calmodulin-binding protein; 77122-73705, complete                                                  | 2,55        |
| TC285879                                                        | O65550  | Putative calmodulin-binding protein, complete                                                               | 2,45        |
| TC291494                                                        | Q2NND9  | Calmodulin binding protein IQD7, complete                                                                   | 2,33        |
| TC299875                                                        | O22845  | calmodulin-like MSS3 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                 | 2,24        |
| TC310839                                                        | Q8GZN1  | Pollen-specific calmodulin-binding protein, complete                                                        | -4,50       |
| TC293707                                                        | Q9FDX6  | NaCl-inducible Ca <sup>2+</sup> -binding protein-like (AT5g49480/K6M13_2), complete                         | -2,80       |
| <b><i>Outras proteínas de transdução de sinal na defesa</i></b> |         |                                                                                                             |             |
| TC282141                                                        | Q8LPS2  | Arabidopsis thaliana ACD6 (ACCELERATED CELL DEATH 6); complete                                              | 3,10        |
| TC307410                                                        | Q8LPS2  | ankyrin repeat and transmembrane-domain containing protein {Arabidopsis thaliana}, partial (7%)             | 2,05        |
| TC309351                                                        | Q9SU72  | EDS1 (ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1); signal transducer/ triacylglycerol lipase, complete               | 2,05        |
| <b><i>Fatores de transcrição WRKY e TGA</i></b>                 |         |                                                                                                             |             |
| TC291364                                                        | Q8GWF1  | Probable WRKY transcription factor 38 (WRKY DNA-binding protein 38), complete                               | 4,94        |
| TC293239                                                        | Q9LZV6  | homologue to WRKY DNA-binding protein 62 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete             | 3,24        |
| TC288467                                                        | Q9C5T4  | WRKY transcription factor 18 (WRKY DNA-binding protein 18) (AtWRKY18), complete                             | 2,69        |
| TC313555                                                        | Q93WU8  | Probable WRKY transcription factor 54 (WRKY DNA-binding protein 54), complete                               | 2,45        |
| TC286886                                                        | O22900  | Probable WRKY transcription factor 23 (WRKY DNA-binding protein 23), complete                               | 2,06        |
| TC285404                                                        | Q39234  | Transcription factor TGA3 (AtbZIP22), complete                                                              | 2,01        |
| TC291157                                                        | Q9SUS1  | Probable WRKY transcription factor 29 (WRKY DNA-binding protein 29), complete                               | -2,49       |

|                                                          |        |                                                                                                                     |       |
|----------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b><i>Outras proteínas relacionadas à defesa</i></b>     |        |                                                                                                                     |       |
| TC295917                                                 | P33154 | Pathogenesis-related protein 1 precursor (PR-1), complete                                                           | 4,35  |
| TC292547                                                 | Q9FHC1 | photoassimilate-responsive protein PAR-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete           | 4,17  |
| TC308173                                                 | Q9ZQR8 | Late upregulated in response to Hyaloperonospora parasitica (LURP1)                                                 | 4,15  |
| TC288082                                                 | P33157 | Glucan endo-1 3-beta-glucosidase acidic isoform precursor ((1->3)-beta-glucan, complete (PR-2)                      | 3,47  |
| TC291847                                                 | P94040 | Germin-like protein subfamily 3 member 1 precursor (AtGER1) (At-GERM1) (AtGLP1), complete                           | 3,45  |
| TC304170                                                 | Q9ZQ29 | Similar to avrRpt2-induced protein 2, partial (27%)                                                                 | 3,28  |
| TC309349                                                 | Q8VYI5 | Tobacco rattle virus-induced protein variant 1 (At1g78410/F3F9_27) {Arabidopsis thaliana}, complete                 | 3,12  |
| TC296149                                                 |        | similar to viral resistance protein putative {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (1%)              | 2,90  |
| TC280921                                                 | Q9SRL2 | Putative disease resistance protein, complete                                                                       | 2,77  |
| TC311284                                                 | Q6ZZT8 | homologue to (Q6ZZT8) Putative trypsin inhibitor 3, complete                                                        | 2,49  |
| TC290127                                                 | Q9LSP9 | Basic chitinase (AT3g16920/K14A17_4), complete                                                                      | 2,42  |
| TC310287                                                 | Q9MA41 | homologue to chitinase-like protein 1 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (17%)                   | 2,36  |
| TC310159                                                 | O22841 | Putative endochitinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                       | 2,31  |
| TC294658                                                 | Q9LRW9 | Disease resistance protein-like, partial (27%)                                                                      | 2,28  |
| TC284214                                                 | Q8H1N6 | At3g04210/T6K12_17, complete; disease resistance protein (TIR-NBS class)                                            | 2,25  |
| TC309125                                                 | O81747 | homologue to transmembrane receptor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (26%)                     | -3,26 |
| TC281474                                                 | O48851 | Putative disease resistance protein, complete                                                                       | -2,37 |
| TC281338                                                 | Q9MA83 | Putative disease resistance protein; kinase/ protein binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | -2,14 |
| TC292358                                                 | Q9M2U5 | Class IV chitinase (CHIV) (At3g54420), complete                                                                     | -2,12 |
| TC309229                                                 | Q9SSN2 | Disease resistance protein (TIR-NBS class) transmembrane receptor {Arabidopsis thaliana}, complete                  | -2,00 |
| <b><i>Síntese de compostos secundários de defesa</i></b> |        |                                                                                                                     |       |
| TC299493                                                 | Q9FI25 | Berberine bridge enzyme-like protein, complete                                                                      | 2,62  |
| TC288156                                                 | Q94K89 | strictosidine synthase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                       | 2,27  |
| TC280952                                                 | Q93YV0 | Putative S-linalool synthase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                 | 2,23  |
| TC310258                                                 | Q93Y30 | Anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase-like protein, partial (21%)                                      | 2,14  |
| TC287476                                                 | Q9SD04 | Mucin-like protein (At3g51450/F26O13_90), complete                                                                  | 2,03  |
| <b><i>Ciclofilinas</i></b>                               |        |                                                                                                                     |       |
| TC294061                                                 | P34790 | Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase CYP18-3 (PPIase CYP18-3) (Rotamase cyclophilin-1), complete                     | 2,41  |
| TC289547                                                 | P34791 | peptidylprolyl isomerase ROC4 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                | 2,27  |

**Tabela II.** Lista de genes relacionados à reorganização da parede celular cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                          | Uniprot | Anotação                                                                                                  | Fold Change |
|-----------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Modificação da pectina</b>     |         |                                                                                                           |             |
| TC296106                          | Q9LTZ0  | pectate lyase-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0) (EC 4.2.2.2 EC 4.2.2.2), complete  | 9,97        |
| TC287417                          | Q8L7Z5  | Pectin acetylesterase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                              | 2,77        |
| TC293365                          | Q9LZI3  | Putative pectinesterase                                                                                   | 2,67        |
| TC283922                          | Q9C5M8  | Probable pectate lyase 18 precursor (Pectate lyase A10) (EC 4.2.2.2 EC 4.2.2.2), complete                 | 2,44        |
| TC283104                          | Q940Q1  | Probable pectate lyase 1 precursor (Pectate lyase A1) (EC 4.2.2.2 EC 4.2.2.2), complete                   | 2,37        |
| TC283052                          | Q9FK05  | Pectinesterase, complete                                                                                  | 2,33        |
| TC302059                          | O48711  | enzyme inhibitor/ pectinesterase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                   | 2,28        |
| TC314335                          | Q5MFV8  | homologue to VANGUARD 1 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (8%); pectin methylesterase | -9,55       |
| TC298837                          | Q9LN68  | PARVUS (PARVUS); polygalacturonate 4-alpha-galacturonosyltransferase/ transferase                         | -5,11       |
| TC286006                          | Q940J8  | Putative pectin acetylesterase protein                                                                    | -2,79       |
| TC294239                          | Q9LY17  | Pectin methyl-esterase-like protein, complete                                                             | -2,53       |
| TC285124                          | Q7Y201  | enzyme inhibitor/ pectinesterase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                   | -2,18       |
| <b>Metabolismo da celulose</b>    |         |                                                                                                           |             |
| TC281216                          | O49323  | ATCSLD1; cellulose synthase/ transferase transferring glycosyl groups {Arabidopsis thaliana}, complete    | 3,82        |
| TC297624                          | Q8VYG3  | Endo-1,4-beta glucanase 16                                                                                | -9,83       |
| TC292597                          | Q8VZK9  | ATCSLE1; cellulose synthase/ transferase transferring glycosyl groups {Arabidopsis thaliana}, complete    | -2,51       |
| <b>Hidrolases</b>                 |         |                                                                                                           |             |
| TC282682                          | Q8VYE5  | hydrolase hydrolyzing O-glycosyl compounds {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete         | 3,17        |
| TC291006                          | Q8GXR7  | hydrolase hydrolyzing O-glycosyl compounds {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete         | 2,06        |
| TC291995                          | O80803  | Probable xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 17 precursor (At-XTH17), complete              | -31,32      |
| TC309292                          | Q9LXI6  | At3g52790 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                          | -4,17       |
| TC286177                          | O80690  | F8K4.3 protein, complete; hydrolases O-glycosyl compounds                                                 | -3,28       |
| <b>Expansinas e forminas</b>      |         |                                                                                                           |             |
| TC281127                          | Q9SRR2  | Formin-like protein 10 (AT3g07540/F21O3_25), complete                                                     | 3,32        |
| TC286711                          | O48818  | Alpha-expansin 4 precursor (AtEXPA4) (At-EXP4) (AtEx4) (Ath-ExpAlpha-1.6), complete                       | 3,31        |
| TC292939                          | Q9M2S9  | Alpha-expansin 16 precursor (AtEXPA16) (At-EXP16) (AtEx16) (Ath-ExpAlpha-1.7), complete                   | 2,63        |
| TC291079                          | Q38866  | ATEXPA2 EXPANSIN A2 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                | 2,30        |
| <b>Síntese de lignina</b>         |         |                                                                                                           |             |
| TC300639                          | P42734  | cinnamyl-alcohol dehydrogenase CAD1 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0) (EC 1.1.1.195), complete  | 5,40        |
| TC288259                          | Q9M0B3  | Cinnamoyl-CoA reductase-like protein, complete                                                            | 2,39        |
| TC303151                          | Q9FHZ5  | Caffeic acid 3-O-methyltransferase-like protein, partial (40%)                                            | 2,06        |
| <b>Fatores de transcrição MYB</b> |         |                                                                                                           |             |
| TC290196                          | Q9SZP1  | Transcription repressor MYB4 (Myb-related protein 4) (AtMYB4), complete                                   | 4,02        |

|          |        |                                                                                                        |      |
|----------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TC304100 | Q1G3C4 | weakly similar to MYB transcription factor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (76%) | 2,30 |
| TC291496 | Q681D0 | MYB99, complete                                                                                        | 2,13 |
| TC304731 | Q9C773 | MYB transcription factor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                        | 2,05 |

---

**Tabela III.** Lista de genes relacionados ao metabolismo e à sinalização de compostos lipídicos cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                                  | Uniprot | Anotação                                                                                                      | Fold Change |
|-----------------------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Proteínas transferidoras de lipídios</i></b>        |         |                                                                                                               |             |
| TC299264                                                  | Q9LLR6  | Nonspecific lipid-transfer protein 4 precursor (LTP 4), complete                                              | 6,82        |
| TC302264                                                  | Q9LLR7  | Nonspecific lipid-transfer protein 3 precursor (LTP 3), complete                                              | 2,69        |
| TC300537                                                  | Q8GWA4  | Arabidopsis thaliana protease inhibitor/seed storage/lipid transfer {Arabidopsis thaliana}, complete          | 2,41        |
| TC292948                                                  | Q9LJ86  | Non-specific lipid-transfer protein (AT3g22600/F16J14_17) (Xylogen like protein 8), complete                  | 2,40        |
| TC296981                                                  | Q9LJQ3  | Lipid transfer protein (AT3g18280/MIE15_7), complete                                                          | 2,31        |
| TC300902                                                  | Q9ZUK6  | Non-specific lipid-transfer protein 7 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                  | 2,27        |
| TC308239                                                  | Q42589  | Nonspecific lipid-transfer protein 1 precursor (LTP 1), complete                                              | 2,16        |
| <b><i>Lipases</i></b>                                     |         |                                                                                                               |             |
| TC288419                                                  | Q9FIA1  | GDSL-motif lipase/hydrolase-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                | 3,21        |
| TC285545                                                  | Q8L7S1  | Triglyceride lipase activity (At1g45200/At1g45200), complete                                                  | 2,96        |
| TC301188                                                  | Q0WPI9  | GDSL esterase/lipase At3g53100 (EC 3.1.1.-) (Extracellular lipase At3g53100), partial (39%)                   | 2,52        |
| TC299585                                                  | Q9C5N8  | GDSL esterase/lipase At1g54020 (EC 3.1.1.-) (Extracellular lipase At1g54020), complete                        | 2,52        |
| TC289123                                                  | Q6NLP7  | GDSL esterase/lipase At3g62280 (EC 3.1.1.-) (Extracellular lipase At3g62280) {Arabidopsis thaliana}, complete | 2,08        |
| TC283215                                                  | O04340  | triacylglycerol lipase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                 | 2,06        |
| TC286329                                                  | Q67ZU1  | MRNA complete cds clone: RAFL22-74-A06, complete; Triacylglycerol lipase 2                                    | -2,45       |
| <b><i>Outras proteínas do metabolismo de lipídios</i></b> |         |                                                                                                               |             |
| TC306109                                                  | O22813  | 3-beta-hydroxy-delta5-steroid dehydrogenase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete            | 6,27        |
| TC290482                                                  | Q9LVS6  | Palmitoyl-protein thioesterase-like (At5g47330), complete                                                     | 3,83        |
| TC287964                                                  | Q9LF05  | Stearoyl-acyl carrier protein desaturase, complete                                                            | 3,26        |
| TC296937                                                  | Q9LQP8  | 3-ketoacyl-CoA synthase 3 (KCS-3) (EC 2.3.1.-) (Very long-chain fatty acid condensing enzyme 3)               | 2,88        |
| TC289410                                                  | Q9LIH7  | Probable S-acyltransferase At3g18620                                                                          | 2,39        |
| TC307115                                                  | Q9SVM9  | Fatty acid elongase-like protein (Cer2-like) (AT4g13840/F18A5_230), complete                                  | 2,35        |
| TC305913                                                  | Q9FZI1  | Probable glycerophosphoryl diester phosphodiesterase 3                                                        | 2,30        |
| TC283792                                                  | Q39152  | Fatty acyl-CoA reductase 1 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                             | 2,10        |
| TC310321                                                  | Q94FR1  | Glycine-rich protein GRP16 / oleosin, partial (37%)                                                           | -8,11       |
| TC299273                                                  | Q9FKT7  | Glycine-rich protein / oleosin [Arabidopsis thaliana]                                                         | -3,86       |
| TC310191                                                  | Q9SCT5  | AT3g51730/T18N14_110 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (22%)                              | -3,52       |
| TC302080                                                  | Q9LX13  | (3R)-hydroxymyristoyl-[acyl carrier protein] dehydratase-like protein (At5g10160), complete                   | -2,42       |
| TC296387                                                  | Q9FLM1  | Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase family protein                                                    | -2,84       |
| TC286300                                                  | Q949X0  | Palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol delta-7 desaturase chloroplast precursor, complete                     | -2,50       |
| TC298622                                                  | Q9C6B9  | S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase/ phosphoethanolamine, partial (87%)                          | -2,40       |
| TC282825                                                  | Q08891  | Male sterility protein 2, complete; Fatty acyl-CoA reductase 2                                                | -2,16       |
| TC289214                                                  | Q9STX1  | acyl-CoA binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                       | -2,02       |



**Tabela IV.** Lista de genes relacionados à homeostase e à sinalização de hormônios vegetais cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                   | Uniprot | Anotação                                                                                                     | Fold Change |
|--------------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>Ácido jasmônico e outras oxilipinas</b> |         |                                                                                                              |             |
| TC288773                                   | Q9ZSY9  | Hydroperoxide lyase, complete                                                                                | 5,10        |
| TC313103                                   | P38418  | Lipoxygenase chloroplast precursor (EC 1.13.11.12 EC 1.13.11.12) (LOX2), complete                            | 5,09        |
| TC312647                                   | Q8GZB4  | Phospholipase A2 beta, complete                                                                              | 2,29        |
| TC290302                                   | Q8RXN7  | Putative phospholipase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                | 2,16        |
| TC280822                                   | Q06327  | Lipoxygenase 1 (EC 1.13.11.12 EC 1.13.11.12), complete                                                       | -2,57       |
| <b>Auxinas</b>                             |         |                                                                                                              |             |
| TC302067                                   | Q9LTX2  | Transport inhibitor response 1 protein (AT5g49980/K9P8_12), complete                                         | 7,05        |
| TC285463                                   | P54969  | IAA-amino acid hydrolase ILR1-like 1 precursor (EC 3.5.1.- EC 3.5.1.-), complete                             | 2,08        |
| TC299301                                   | Q2VW96  | IAA33, complete                                                                                              | -5,63       |
| TC284373                                   | Q9LR44  | Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase 1 (At1g05560/T25N20_20) (UDP-glucosyltransferase), complete        | -4,16       |
| TC287422                                   | P32962  | Nitrilase 2 (EC 3.5.5.1 EC 3.5.5.1), complete                                                                | -2,98       |
| TC309683                                   | Q38832  | IAA7 like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                      | -2,57       |
| TC282970                                   | Q9FHN7  | auxin-responsive GH3-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | -2,62       |
| TC290507                                   | Q42565  | Anthranilate synthase beta subunit (At1g25220) (EC 4.1.3.27), complete                                       | -2,17       |
| TC283079                                   | Q8GZ29  | Putative auxin responsive protein (At5g13370) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete         | -2,17       |
| <b>Citocininas</b>                         |         |                                                                                                              |             |
| TC313179                                   | Q96500  | homologue to Cytokinin-repressed protein ccr-like (AT3g26740/MLJ15_14) {Arabidopsis thaliana}, partial (57%) | -5,05       |
| TC285111                                   | Q9ZQ94  | Cytokinin-O-glucosyltransferase 3 (UDP-glycosyltransferase 73C5), complete                                   | -4,81       |
| TC296213                                   | Q7G8V2  | Two-component response regulator ARR15, complete                                                             | -2,65       |
| TC300059                                   | Q9SHC2  | Two-component response regulator ARR16, complete                                                             | -2,56       |
| TC285280                                   | Q9SK82  | Cytokinin-O-glucosyltransferase 2 (Zeatin O-glucosyltransferase 2), complete                                 | -2,11       |
| <b>Etileno</b>                             |         |                                                                                                              |             |
| TC304672                                   | Q9S7T9  | S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme 2 (AdoMetDC 2) (SamDC 2), complete                              | 2,63        |
| TC296822                                   | O48707  | 1 2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 1 (Aci-reductone dioxygenase 1), complete               | 2,11        |
| TC286456                                   | Q9STR4  | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 7 (ACC synthase 7), complete                                      | -2,92       |
| TC285084                                   | Q06402  | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 2 (ACC synthase 2), complete                                      | -2,52       |
| TC307624                                   | Q500W9  | S-adenosylmethionine carrier (At1g34065), complete                                                           | -2,30       |
| TC287175                                   | P46011  | Nitrilase 4 (EC 3.5.5.1 EC 3.5.5.1), complete                                                                | -2,11       |
| TC289218                                   | Q9LSW6  | 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (At5g43450), complete                                              | -2,04       |
| <b>Ácido salicílico</b>                    |         |                                                                                                              |             |
| TC298273                                   | Q9FNZ5  | NIMIN-1 protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 4,11        |
| TC30746                                    | Q682X8  | NIMIN-2, complete                                                                                            | 2,71        |

---

|                                        |        |                                                                                                 |       |
|----------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b><i>Mio-inositol e derivados</i></b> |        |                                                                                                 |       |
| TC282753                               | P42801 | Inositol-3-phosphate synthase isozyme 1 (Myo-inositol-1-phosphate synthase 1), complete         | 2,47  |
| TC280448                               | Q9SYK4 | F3F20.8 protein (Inositol polyphosphate 5-phosphatase), complete                                | 2,19  |
| TC288869                               | Q9M8S8 | Inositol-phosphate phosphatase, complete                                                        | -4,06 |
| TC287853                               | O82200 | Inositol oxygenase 2 (Myo-inositol oxygenase 2) (AtMIOX2) (EC 1.13.99.1 EC 1.13.99.1), complete | -3,03 |
| TC288741                               | Q9FLT2 | Inositol polyphosphate multikinase beta (AT5g61760/mac9_60) {Arabidopsis thaliana}, complete    | -2,13 |
| TC288252                               | Q9SW42 | phospholipase C {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                          | -2,08 |

---

**Tabela V.** Lista de genes relacionados à homeostase redox e à proteção contra o estresse oxidativo cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                                       | Uniprot | Anotação                                                                                                    | Fold Change |
|----------------------------------------------------------------|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Glutathione S-transferases</i></b>                       |         |                                                                                                             |             |
| TC291446                                                       | Q8L7C9  | ATGSTU20; glutathione transferase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                    | 3,72        |
| TC291507                                                       | Q9LZG7  | ATGSTU27; glutathione transferase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                    | 2,71        |
| TC295134                                                       | Q9SHH6  | ATGSTU24; glutathione transferase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                    | -5,32       |
| TC294659                                                       | Q9ZW28  | Glutathione S-transferase, complete                                                                         | -2,61       |
| <b><i>Peroxidases</i></b>                                      |         |                                                                                                             |             |
| TC288628                                                       | Q9LSP0  | Peroxidase 29 precursor (Atperox P29) (ATP40) (EC 1.11.1.7 EC 1.11.1.7), complete                           | 2,19        |
| TC289353                                                       | O81755  | peroxidase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                           | 2,17        |
| TC290433                                                       | Q9FLC0  | Peroxidase 52 precursor (Atperox P52) (ATP49) (EC 1.11.1.7 EC 1.11.1.7), complete                           | 2,15        |
| TC290227                                                       | Q9FKA4  | Peroxidase 62 precursor (Atperox P62) (ATP24a) (EC 1.11.1.7 EC 1.11.1.7), complete                          | -2,74       |
| TC288411                                                       | Q9LDN9  | Peroxidase 37 precursor (Atperox P37) (ATP38) (EC 1.11.1.7 EC 1.11.1.7), complete                           | -2,71       |
| <b><i>Tiorredoxinas e Glutarredoxinas</i></b>                  |         |                                                                                                             |             |
| TC297958                                                       | Q39241  | thioredoxin h {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                        | 2,29        |
| TC293025                                                       | Q9XFH8  | Thioredoxin F-type 1 chloroplast precursor (TRX-F1), complete                                               | 2,21        |
| TC298595                                                       | Q9SGP6  | Glutaredoxin-C9 (At1g28480), complete                                                                       | 2,19        |
| TC29509                                                        | C1JGR1  | Glutaredoxin                                                                                                | 2,09        |
| TC306360                                                       | Q8LBK6  | Monothiol glutaredoxin-S15 (At3g15660) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete               | -3,34       |
| <b><i>Metabolismo do ácido ascórbico</i></b>                   |         |                                                                                                             |             |
| TC287934                                                       | Q9ZSA8  | Putative Fe(II)/ascorbate oxidase (At4g10500) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete        | 2,91        |
| TC291005                                                       | Q9FRL8  | GSH-dependent dehydroascorbate reductase (At1g75270) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | -2,25       |
| TC296202                                                       | Q93YG1  | homologue to Monodehydroascorbate reductase, partial (2%)                                                   | -2,06       |
| <b><i>Outras proteínas relacionadas à homeostase redox</i></b> |         |                                                                                                             |             |
| TC287424                                                       | Q9SCX8  | Acid phosphatase type 5 precursor (Purple acid phosphatase-like protein) (At3g17790), complete              | 2,65        |
| TC297319                                                       | Q9SRG3  | Probable protein disulfide-isomerase 2 precursor (PDI 2) (EC 5.3.4.1 EC 5.3.4.1), complete                  | 2,63        |
| TC299462                                                       | Q9C7W0  | Putative uncharacterized protein At1g64360/F15H21_8                                                         | 2,60        |
| TC283468                                                       | Q96528  | Catalase-1 (EC 1.11.1.6 EC 1.11.1.6), complete                                                              | 2,12        |
| TC308723                                                       | Q9LTR0  | Emb CAA17159.1 (At3g20340), complete                                                                        | -4,15       |
| TC304360                                                       | Q39172  | Probable NADP-dependent oxidoreductase P1 (EC 1.3.1.74 EC 1.3.1.74), complete                               | -3,69       |
| TC306221                                                       | P46309  | gamma-glutamylcysteine synthetase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                    | -2,19       |
| TC313231                                                       | Q9SD45  | Epoxide hydrolase-like protein (AT3g51000/F24M12_40), partial (39%)                                         | -2,03       |

**Tabela VI.** Lista de genes relacionados à fotossíntese, bioenergética mitocondrial e a outros processos do metabolismo de açúcares cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                                | Uniprot | Anotação                                                                                                        | Fold Change |
|---------------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Fase de claro</i></b>                             |         |                                                                                                                 |             |
| TC301346                                                | O22527  | Chlorophyllase-1 (AtCLH1) (Chlorophyll-chlorophyllido hydrolase 1) (Chlase 1), complete                         | 3,87        |
| TC286236                                                | O48741  | Protochlorophyllide reductase C chloroplast precursor (PCR C), complete                                         | 3,64        |
| TC303148                                                | Q941B7  | Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic, partial (27%)                               | 3,49        |
| TC311401                                                | P56757  | homologue to ATP synthase F1 sector alpha subunit (EC 3.6.3.14 ), chloroplastic, partial (11%)                  | 3,23        |
| TC302371                                                | Q9FPI3  | Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic, partial (89%)                                                 | 2,67        |
| TC308364                                                | P27202  | Photosystem II 10 kDa polypeptide chloroplast precursor, complete                                               | 2,32        |
| TC309576                                                | Q9S831  | homologue to (Q9S831) Photosystem I reaction center subunit IV A chloroplast precursor (PSI-E A), partial (60%) | 2,18        |
| TC306549                                                | Q2V2S7  | NAD(P)H-quinone oxidoreductase subunit M, chloroplastic, partial (69%)                                          | 2,14        |
| TC311623                                                | P10896  | Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic, , partial (21%)                             | 2,11        |
| TC298144                                                | O04338  | homologue to Photosystem II reaction center 6.1KD protein (At2g30570/T6B20.8) (At2g30570), partial (94%)        | 2,01        |
| TC313870                                                | Q9ZR03  | Cytochrome b6-f complex iron-sulfur subunit, chloroplastic                                                      | -2,11       |
| <b><i>Ciclo de Calvin/Fotorrespiração</i></b>           |         |                                                                                                                 |             |
| TC285006                                                | Q9FI53  | Fumarate hydratase 2 chloroplast precursor (Fumarase 2) (EC 4.2.1.2 EC 4.2.1.2), complete                       | 2,52        |
| TC295677                                                | P10798  | Ribulose biphosphate carboxylase small chain 3B chloroplast precursor, complete                                 | 2,37        |
| TC306831                                                | Q9MAH0  | homologue to Phosphoenolpyruvate carboxylase 1 (PEPCase 1) (PEPC 1) (EC 4.1.1.31 EC 4.1.1.31), partial (17%)    | 2,17        |
| TC292993                                                | P10795  | Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1A chloroplast precursor, complete                                 | 2,10        |
| TC302844                                                | Q9LRR9  | Probable peroxisomal (S)-2-hydroxy-acid oxidase 2 (Glycolate oxidase 2) (GOX 2), complete                       | 2,06        |
| TC306171                                                | P50318  | phosphoglycerate kinase, chloroplastic {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                   | 2,03        |
| TC307718                                                | P10796  | homologue to Ribulose biphosphate carboxylase small chain 1B chloroplast precursor, partial (62%)               | 2,01        |
| <b><i>Bioenergética mitocondrial</i></b>                |         |                                                                                                                 |             |
| TC295084                                                | O81845  | mitochondrial uncoupling protein (AtPUMP2), complete                                                            | 4,97        |
| TC291337                                                | Q42599  | NADH-ubiquinone oxidoreductase 23 kDa subunit mitochondrial precursor (Complex I-23KD), complete                | 2,27        |
| <b><i>Outras enzimas do metabolismo de açúcares</i></b> |         |                                                                                                                 |             |
| TC282515                                                | Q84JL5  | beta-fructofuranosidase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                  | 5,45        |
| TC304414                                                | Q9M379  | Probable sucrose-phosphatase 3a (F24B22.230), complete                                                          | 2,85        |
| TC296231                                                | P49040  | SUS1 (SUCROSE SYNTHASE 1); UDP-glycosyltransferase/ sucrose synthase {Arabidopsis thaliana}, partial (35%)      | 2,72        |
| TC305405                                                | Q9C920  | 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase/ nucleotidyltransferase {Arabidopsis thaliana}, partial (59%)     | 2,18        |
| TC284423                                                | P55231  | Glucose-1-phosphate adenyltransferase large subunit 3 chloroplast precursor, complete                           | 2,14        |
| TC296173                                                | Q9FT97  | Alpha-galactosidase-like protein, complete                                                                      | 2,14        |
| TC288409                                                | Q9ZVJ5  | Putative beta-phosphoglucomutase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                         | 2,13        |
| TC283879                                                | Q9LRA7  | Trehalose-6-phosphate synthase 9 (ATTPS9); transferase transferring glycosyl groups, complete                   | 2,08        |
| TC284561                                                | Q5E924  | At1g16300, complete; glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase family                                            | -3,19       |
| TC306399                                                | Q39041  | Beta-fructosidase (EC 3.2.1.26), complete                                                                       | -3,09       |

|          |        |                                                                                                             |       |
|----------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC296253 | Q9FZP1 | unnamed protein product; contains similarity to heparanase gene_id:MGG23.2 {Arabidopsis thaliana}, complete | -2,45 |
| TC310469 | Q42605 | homologue to UDP-glucose 4-epimerase (Galactowaldenase) (UDP-galactose 4-epimerase), partial (73%)          | -2,43 |
| TC285495 | Q67YT4 | DIN9 (DARK INDUCIBLE 9); mannose-6-phosphate isomerase/ zinc ion binding {Arabidopsis thaliana}, complete   | -2,38 |
| TC307751 | Q9ZV48 | ATTPS11; Trehalose-6-phosphate synthase 11                                                                  | -2,37 |
| TC307521 | Q3YIR8 | homologue to MOP9.15 (Fragment), partial (76%); glycosyl hydrolase 17 family                                | -2,22 |
| TC300632 | Q9MA79 | Fructose-1 6-bisphosphatase cytosolic (D-fructose-1 6-bisphosphate 1-phosphohydrolase), complete            | -2,22 |
| TC284519 | B3H5Q1 | Beta-glucosidase 11 (At1g02850)                                                                             | -2,15 |
| TC303039 | Q9SCV8 | Beta-galactosidase (EC 3.2.1.23), complete                                                                  | -2,01 |

---

**Tabela VII.** Lista de outros genes relacionados à transdução de sinal cuja expressão em folhas *nial nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID        | Uniprot | Anotação                                                                                                             | Fold Change |
|-----------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Quinases</i> |         |                                                                                                                      |             |
| TC292333        | Q9LZF5  | Protein kinase-like (At5g03350), complete; Arabidopsis thaliana legume lectin family protein                         | 14,43       |
| TC281018        | Q9FN94  | Receptor-like protein kinase (At5g59670) (Serine/threonine-specific protein kinase-like), complete                   | 3,51        |
| TC286023        | Q9LSC2  | Protein kinase-like protein                                                                                          | 3,19        |
| TC281751        | O80939  | kinase { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; lectin                                              | 3,13        |
| TC287820        | Q9SYB9  | kinase { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                                      | 3,03        |
| TC290171        | O49610  | Protein kinase-like, partial (97%)                                                                                   | 2,75        |
| TC283282        | Q9LZW4  | kinase { Arabidopsis thaliana } (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                                       | 2,71        |
| TC291001        | Q9SA43  | homologue to F3O9.24 protein, complete; kinase activity                                                              | 2,40        |
| TC283980        | Q8W4G6  | Cysteine-rich receptor-like protein kinase 15 (Cysteine-rich RLK15) (EC 2.7.11.-) { Arabidopsis thaliana }, complete | 2,38        |
| TC307447        | Q9FKL3  | Similarity to protein kinase { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                | 2,37        |
| TC289554        | Q8RWL2  | Calcium-dependent protein kinase 29 (CPK29) { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                 | 2,24        |
| TC310891        | O49575  | Receptor kinase-like protein, partial (70%)                                                                          | 2,12        |
| TC281492        | Q8W2N0  | CDC2CAT; ATP binding { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                        | 2,11        |
| TC280588        | P47735  | Receptor-like protein kinase 5 precursor (EC 2.7.11.1 EC 2.7.1.37), complete                                         | 2,11        |
| TC280869        | O64782  | T1F9.13 (At1g61380/T1F9_13), complete                                                                                | 2,09        |
| TC284929        | O22764  | Putative serine/threonine protein kinase { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                    | 2,02        |
| TC305330        | Q9SKB2  | ATP binding { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                                 | 2,01        |
| TC303381        | Q9ZSA0  | Calcium-dependent protein kinase 23                                                                                  | -7,81       |
| TC289325        | Q9LY82  | Hypothetical protein F18O22_260, complete; GHMP kinase family                                                        | -7,43       |
| TC308223        | Q9C706  | Protein kinase, putative { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                    | -5,63       |
| TC294186        | Q9LYS5  | homologue to Receptor-like protein kinase, complete                                                                  | -5,19       |
| TC304361        | Q3E9X6  | Cysteine-rich receptor-like protein kinase 21 (At4g23290), partial (92%)                                             | -3,85       |
| TC289251        | O23236  | ATMPK14; MAP kinase/ kinase { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                 | -3,48       |
| TC282197        | Q9C547  | Protein kinase, putative; 12576-15979 { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                       | -2,88       |
| TC280665        | Q9SVG2  | Cysteine-rich receptor-like protein kinase 17, complete                                                              | -2,79       |
| TC283533        | Q39016  | ATCDPK2 (CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE 2); calcium- and calmodulin-dependent protein kinase                       | -2,57       |
| TC281087        | O81906  | Serine/threonine kinase-like protein, complete                                                                       | -2,47       |
| TC289981        | SRK2J   | SNF1-related kinase 2.9 { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                     | -2,45       |
| TC307687        | Q9SVZ1  | Protein kinase-like protein, complete                                                                                | -2,30       |
| TC295494        | Q8S9L6  | Cysteine-rich receptor-like protein kinase 29                                                                        | -2,17       |
| TC288674        | Q9SVZ0  | ATP binding { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                                 | -2,17       |
| TC299823        | Q84VQ2  | Protein kinase family, complete                                                                                      | -2,12       |
| TC297573        | Q9CAL2  | Cysteine-rich receptor-like protein kinase 3 { Arabidopsis thaliana } (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                | -2,01       |

|                                              |        |                                                                                                               |       |
|----------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC309159                                     | Q9LNH7 | CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 17                                                            | -2,00 |
| <b><i>Fosfatases</i></b>                     |        |                                                                                                               |       |
| TC282954                                     | Q9LNW3 | Protein phosphatase 2C AIP1 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                             | 3,15  |
| TC311210                                     | Q2V348 | Protein At5g24770, partial (44%); acid phosphatase activity                                                   | 2,27  |
| TC286203                                     | P49598 | Protein phosphatase 2C (PP2C) (EC 3.1.3.16 EC 3.1.3.16), complete                                             | 2,25  |
| TC292004                                     | Q9S9Z7 | F21H2.4 protein (Protein phosphatase type 2C-like protein), complete                                          | 2,13  |
| TC285057                                     | Q9SV41 | Serine/threonine protein phosphatase 2A 57 kDa regulatory subunit B' epsilon isoform, complete                | -2,08 |
| <b><i>Outras proteínas sinalizadoras</i></b> |        |                                                                                                               |       |
| TC301496                                     | Q9M090 | Arabidopsis thaliana SKB1 (SHK1 BINDING PROTEIN 1); protein methyltransferase                                 | 7,34  |
| TC300136                                     | Q9LXB5 | (FPF1-LIKE PROTEIN 1) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                  | 2,88  |
| TC283908                                     | Q9FF17 | Probable dolichyl pyrophosphate Man9GlcNAc2 alpha-1 3-glucosyltransferase, complete                           | 2,17  |
| TC308484                                     | Q0WV60 | acetylglucosaminyltransferase/ transferase transferring glycosyl groups {Arabidopsis thaliana}, complete      | 2,17  |
| TC299133                                     | Q9LUN1 | GTPase-activating protein (GAP) for ADP ribosylation factor (ARF)                                             | 2,28  |
| TC297952                                     | Q8GUG8 | F5A9.22, complete                                                                                             | 2,06  |
| TC314070                                     | Q2V495 | homologue to GRP-3 (GLYCINE-RICH PROTEIN 3) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (77%)       | 2,05  |
| TC295441                                     | Q9SUA6 | Calcineurin B-like protein 7 (SOS3-like calcium-binding protein 3), complete                                  | -3,50 |
| TC312788                                     | Q43125 | flavin-type blue-light photoreceptor (Pfam: PF00875 Score {Arabidopsis thaliana}, complete                    | -3,16 |
| TC304586                                     | Q8VZM1 | EMB2753 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                                | -3,03 |
| TC309472                                     | Q9LM28 | homologue to T10O22.18, partial (28%)                                                                         | -2,58 |
| TC294210                                     | O81223 | Calcineurin B-like protein 4                                                                                  | -2,50 |
| TC301696                                     | Q9SS90 | E3 ubiquitin-protein ligase RGLG1                                                                             | -2,17 |
| TC299645                                     | Q9C9M1 | Pheromone receptor, putative (AR401); S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase {Arabidopsis thaliana} | -2,11 |

**Tabela VIII.** Lista de outros genes relacionados à regulação da transcrição cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                                    | Uniprot | Anotação                                                                                               | Fold Change |
|-------------------------------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Fatores de transcrição “zinc finger”</i></b>          |         |                                                                                                        |             |
| TC287452                                                    | Q8RWD0  | Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 16, complete                                                         | 2,31        |
| TC298710                                                    | O82256  | Zinc finger protein CONSTANS-LIKE 13, partial (46%)                                                    | -3,04       |
| TC312672                                                    | Q9LT81  | Zinc finger CCCH domain-containing protein 39 (AT3g19360/MLD14_8), complete                            | -2,92       |
| TC291194                                                    | Q8GWG1  | Putative C2H2 zinc finger transcription factor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete  | -2,47       |
| TC308128                                                    | P94077  | homologue to Zinc-finger protein Lsd1, partial (22%)                                                   | -2,31       |
| TC310133                                                    | Q9C533  | DHHC-type zinc finger protein putative (Hypothetical protein F23O10.1), partial (5%)                   | -2,23       |
| TC286952                                                    | O82307  | Zinc finger CCCH domain-containing protein 23 (At2g25900/F17H15.7) {Arabidopsis thaliana}, complete    | -2,17       |
| TC309718                                                    | Q2V4B1  | Putative C2H2-type zinc finger protein (At2g01940), partial (58%)                                      | -2,12       |
| TC288852                                                    | Q84K31  | Putative zinc finger transcription factorng {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete     | -2,02       |
| <b><i>Fatores de transcrição responsivos ao etileno</i></b> |         |                                                                                                        |             |
| TC306667                                                    | Q9SK03  | TOE1; DNA binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                               | 2,40        |
| TC309216                                                    | Q9SSA8  | Ethylene-responsive transcription factor RAP2-12 (At1g53910/T18A20_14), partial (5%)                   | 2,03        |
| TC302204                                                    | Q8W3M3  | Ethylene-responsive transcription factor RAP2-9 (Protein RELATED TO APETALA2 9), complete              | -3,43       |
| TC292229                                                    | Q8VY90  | Ethylene-responsive transcription factor ERF105 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | -2,73       |
| <b><i>bHLH</i></b>                                          |         |                                                                                                        |             |
| TC288298                                                    | Q9C690  | Transcription factor bHLH122                                                                           | 2,40        |
| TC297077                                                    | Q8GW32  | bHLH domain                                                                                            | 2,32        |
| TC291504                                                    | Q2HIV9  | Transcription factor bHLH35                                                                            | 2,11        |
| <b><i>NAM</i></b>                                           |         |                                                                                                        |             |
| TC291603                                                    | Q9LS24  | NAM-like (At5g46590), complete                                                                         | 2,29        |
| TC292383                                                    | Q9ASV8  | NAM (No apical meristem)-like protein, complete                                                        | 2,04        |
| TC310035                                                    | Q9M9N8  | NAM-like protein (No apical meristem), complete                                                        | -2,35       |
| <b><i>Outros fatores de transcrição</i></b>                 |         |                                                                                                        |             |
| TC293173                                                    | Q94KB9  | homologue to (Q94KB9) MLO-like protein 3 (AtMlo3), complete                                            | 3,08        |
| TC285143                                                    | P48001  | HOMEBOX PROTEIN KNOTTED-1 LIKE 4 (KNAT4) {Arabidopsis thaliana}, partial (96%)                         | 2,31        |
| TC297289                                                    | Q9LW45  | Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 3 P1 clone: MQP15, complete                                | 2,11        |
| TC288064                                                    | Q9S7F0  | SRD2 (SHOOT REDIFFERENTIATION DEFECTIVE 2) (F3M18.1), partial (90%)                                    | 2,08        |
| TC287588                                                    | Q8LFU0  | transcription factor-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete               | 2,04        |
| TC285071                                                    | Q9SIV3  | Golden2-like transcription factor                                                                      | 2,03        |
| TC310995                                                    | Q9FZL1  | F17L21.2, complete                                                                                     | -4,57       |
| TC289758                                                    | Q9FX67  | T6J4.6 protein (At1g13300/T6J4_6), complete                                                            | -2,53       |
| TC296813                                                    | Q9LTA2  | Similarity to AT-hook DNA-binding protein                                                              | -3,01       |
| TC284700                                                    | Q8LFV3  | H-protein promoter binding factor-2a {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete            | -2,63       |



|          |        |                                                                                                    |       |
|----------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC292913 | Q9FJT5 | Similarity to transcription repressor {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete        | -2,43 |
| TC293451 | Q9LSH8 | Transfactor-like protein, complete                                                                 | -2,40 |
| TC294903 | Q8VYK4 | Nuclear transcription factor Y subunit B-8 (AtNF-YB-8), complete                                   | -2,20 |
| TC303918 | Q2V3S3 | Transcription factor ICE1 (At3g26744), partial (31%)                                               | -2,19 |
| TC294201 | Q680G5 | Transcription factor DREB2A like protein, complete                                                 | -2,16 |
| TC307778 | Q9ZQ18 | transcription factor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                        | -2,15 |
| TC306276 | Q39013 | NAC domain-containing protein 2 (ANAC002), complete                                                | -2,14 |
| TC286473 | Q9FRL5 | Putative uncharacterized protein F22H5.4                                                           | -2,11 |
| TC284381 | Q9LF53 | DELLA protein RGL3 (RGA-like protein 3), complete                                                  | -2,08 |
| TC306183 | Q9LDY8 | ATNAC3; transcription factor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                | -2,03 |
| TC288935 | Q9SHJ0 | Probable CCR4-associated factor 1 homolog 1 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | -2,03 |
| TC282375 | Q9SNB8 | Scarecrow-like protein, complete                                                                   | -2,01 |

---

**Tabela IX.** Lista de genes relacionados ao catabolismo e à modificação conformacional de proteínas cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                                 | Uniprot | Anotação                                                                                                       | Fold Change |
|----------------------------------------------------------|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <i>Proteases e peptidases</i>                            |         |                                                                                                                |             |
| TC284105                                                 | Q9LEW3  | nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete          | 7,55        |
| TC297912                                                 | Q9C7D4  | SCPL16; serine carboxypeptidase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                         | 2,53        |
| TC303189                                                 | O49607  | subtilisin proteinase-like {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | 2,41        |
| TC301999                                                 | Q9LEW3  | homologue to nucleoid DNA-binding protein cnd41-like protein {Arabidopsis thaliana} partial (40%)              | 2,37        |
| TC284787                                                 | Q8L7B2  | Serine carboxypeptidase 1-like protein, complete                                                               | 2,27        |
| TC283516                                                 | Q8LFB7  | Prolylcarboxypeptidase-like protein, complete                                                                  | 2,17        |
| TC281869                                                 | Q9XI11  | F8K7.9 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                                   | 2,01        |
| TC311249                                                 | Q9CAU2  | SCPL5; catalytic/ serine carboxypeptidase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete               | -11,44      |
| TC295060                                                 | Q9SGA5  | OTU-like cysteine protease family protein (At3g02070), complete                                                | -9,59       |
| TC295038                                                 | Q9SAA2  | Identical to gb AF016621 ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit from and is a member of the , complete | -3,21       |
| TC281795                                                 | Q9FIM5  | subtilisin-like serine protease {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                          | -3,20       |
| TC285146                                                 | Q9ZVS4  | F15K9.17 protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete; aspartic-type endopeptidase activity   | -2,85       |
| TC297891                                                 | Q9LMU2  | homologue to At1g17860/F2H15_8 {Arabidopsis thaliana}, partial (41%); endopeptidase inhibitor activity         | -2,35       |
| TC283950                                                 | Q8LCW1  | Nucellin-like protein, complete                                                                                | -2,21       |
| TC313077                                                 | Q9FIG2  | peptidase/ subtilase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (14%)                               | -2,15       |
| TC291849                                                 | Q9FGJ8  | Putative uncharacterized protein At5g47590; ; aspartic-type endopeptidase activity                             | -2,12       |
| TC310738                                                 | Q9FIY3  | Serine-type endopeptidase inhibitor activity (At5g43570), complete                                             | -2,06       |
| TC288131                                                 | Q84WH0  | aspartic-type endopeptidase/ pepsin A {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                   | -2,03       |
| <i>Catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina</i> |         |                                                                                                                |             |
| TC300308                                                 | Q8L4A7  | Proteasome subunit alpha type 2-B (20S proteasome alpha subunit B-2), partial (45%)                            | 19,56       |
| TC292717                                                 | Q9FN60  | RING zinc finger protein-like {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                           | 2,48        |
| TC306234                                                 | P25865  | Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 1 (Ubiquitin-protein ligase 1), complete                                | 2,48        |
| TC285224                                                 | Q9M1E5  | CUL4 RING ubiquitin ligase complex {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                       | 2,16        |
| TC280508                                                 | Q9SZP0  | E3 ubiquitin-protein ligase UPL3 (Hypothetical protein AT4g38610), complete                                    | 2,15        |
| TC302326                                                 | Q9FIR0  | Putative RING-H2 finger protein ATL5L {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                   | 2,14        |
| TC294251                                                 | Q94BY6  | RING-H2 finger protein ATL1I, complete                                                                         | 2,02        |
| TC291018                                                 | Q9ZUW5  | Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related (At2g27630), complete                                            | -7,99       |
| TC282225                                                 | Q680I0  | protein ubiquitination {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                  | -5,88       |
| TC288271                                                 | Q9SHI9  | ubiquitin-dependent protein catabolic process (At1g06440), complete                                            | -4,89       |
| TC291676                                                 | Q9LEX0  | ATPP2-A13 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                               | -4,09       |
| TC298560                                                 | Q9SFX2  | ubiquitin-protein ligase {Arabidopsis thaliana}, complete; U-box domain-containing protein 43                  | -3,00       |
| TC305412                                                 | Q9FLF4  | Emb CAB89350.1 (At5g64660), complete; U-box domain-containing protein 27                                       | -2,70       |
| TC290211                                                 | Q8LD21  | RING-H2 finger protein RHY1a, complete                                                                         | -2,39       |

|                                      |        |                                                                                                        |       |
|--------------------------------------|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC292689                             | Q8LC69 | RING-H2 finger protein ATL1R (RING-H2 finger protein ATL8), complete                                   | -2,36 |
| TC286624                             | Q9C8D1 | U-box domain-containing protein 20                                                                     | -2,06 |
| TC314255                             | Q43821 | similar to Ubiquitin conjugating enzyme (EC 6.3.2.19), partial (56%)                                   | -2,01 |
| <b><i>“Folding” de proteínas</i></b> |        |                                                                                                        |       |
| TC314272                             | Q9STX5 | Endoplasmic homolog precursor (GRP94 homolog) (Protein SHEPHERD) (HSP90-like protein 7), partial (34%) | 2,50  |
| TC309262                             | O04153 | CRT3 (CALRETICULIN 3); calcium ion binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete      | 2,39  |
| TC304246                             | Q9LZK5 | At3g62600/F26K9_30 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                              | 2,37  |
| TC284729                             | Q94AW7 | Calreticulin-2 (At1g09210/T12M4_8), complete                                                           | 2,26  |
| TC282613                             | P29402 | Calnexin homolog 1 precursor, complete                                                                 | 2,23  |
| TC291380                             | Q9LZI7 | Shock protein SRC2-like (At3g62780), complete                                                          | 2,12  |
| TC300285                             | P22954 | Heat shock cognate 70 kDa protein 2 (Hsc70.2), partial (19%)                                           | 2,01  |

**Tabela X.** Lista de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                             | Uniprot | Anotação                                                                                             | Fold Change |
|------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Catabolismo da asparagina</i></b>              |         |                                                                                                      |             |
| TC290404                                             | Q9LW71  | L-asparaginase                                                                                       | 2,70        |
| <b><i>Catabolismo da leucina</i></b>                 |         |                                                                                                      |             |
| TC310556                                             | Q9LDD8  | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase beta chain mitochondrial precursor, complete                         | -4,93       |
| TC295318                                             | Q42523  | Methylcrotonoyl-CoA carboxylase subunit alpha mitochondrial precursor, complete                      | -3,26       |
| <b><i>Metabolismo de glutamato e glutamina</i></b>   |         |                                                                                                      |             |
| TC303897                                             | Q93Z85  | AT5g38200/MXA21_90, partial (31%); glutamine metabolic process                                       | -5,09       |
| TC293462                                             | Q9M0A6  | Glutamine amidotransferase class-I {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete            | -4,31       |
| TC288282                                             | Q38946  | Glutamate dehydrogenase 2 (GDH 2) (EC 1.4.1.3 EC 1.4.1.3), complete                                  | -2,99       |
| TC290124                                             | Q9M9Q1  | Glutamine amidotransferase-related [Arabidopsis thaliana]                                            | -2,96       |
| <b><i>Síntese de valina</i></b>                      |         |                                                                                                      |             |
| TC306838                                             | Q0WM29  | ALDH6B2; aldehyde dehydrogenase/ oxidoreductase {Arabidopsis thaliana}, partial (18%)                | -2,69       |
| TC291692                                             | Q0WM29  | ALDH6B2; aldehyde dehydrogenase/ oxidoreductase {Arabidopsis thaliana}, complete                     | -2,35       |
| <b><i>Síntese de arginina</i></b>                    |         |                                                                                                      |             |
| TC286242                                             | Q9ZUR7  | Putative glutamate/ornithine acetyltransferase (At2g37500/F3G5.29) {Arabidopsis thaliana}, complete  | -2,68       |
| <b><i>Síntese de cisteína</i></b>                    |         |                                                                                                      |             |
| TC287856                                             | Q3E8Z3  | homologue to Cysteine synthase (At5g28030), complete                                                 | 2,16        |
| TC283709                                             | P92981  | 5'-adenylylsulfate reductase 2 chloroplast precursor, complete                                       | -2,17       |
| TC312829                                             | O22682  | Probable cysteine synthase chloroplast precursor (O-acetylserine sulfhydrylase), complete            | -2,09       |
| <b><i>Síntese de isoleucina</i></b>                  |         |                                                                                                      |             |
| TC282081                                             | Q9ZSS6  | Threonine dehydratase biosynthetic chloroplast precursor (Threonine deaminase) (TD), complete        | -2,36       |
| <b><i>Catabolismo de fenilalanina e tirosina</i></b> |         |                                                                                                      |             |
| TC285077                                             | Q9ZRA2  | Homogentisate 1 2-dioxygenase (Homogentisicase) (Homogentisate oxygenase), complete                  | -2,20       |
| <b><i>Síntese de serina</i></b>                      |         |                                                                                                      |             |
| TC282195                                             | O49485  | Phosphoglycerate dehydrogenase-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete   | -2,06       |
| <b><i>Síntese de prolina</i></b>                     |         |                                                                                                      |             |
| TC296742                                             | P54888  | Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase B (P5CS B), complete                                      | -2,03       |
| <b><i>Catabolismo de metionina</i></b>               |         |                                                                                                      |             |
| TC304902                                             | Q9SGU9  | Similar to O-succinylhomoserine sulfhydrylase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | -2,03       |
| <b><i>Síntese de metionina e treonina</i></b>        |         |                                                                                                      |             |
| TC295591                                             | Q9LQU9  | F10B6.22, partial (36%); methionine and threonine biosynthetic process                               | -2,49       |

|                                 |        |                                                                                                       |       |
|---------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b><i>Aminotransferases</i></b> |        |                                                                                                       |       |
| TC303912                        | Q9SK47 | Putative tyrosine aminotransferase (At2g24850) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | 6,13  |
| TC304231                        | Q9LE06 | Probable branched-chain-amino-acid aminotransferase 4 (Atbcat-4), complete                            | 2,14  |
| TC307816                        | Q9FN30 | Tyrosine aminotransferase, complete                                                                   | -2,38 |
| <b><i>Outros</i></b>            |        |                                                                                                       |       |
| TC281817                        | Q9S702 | Aspartate kinase{Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                | 2,72  |
| TC298171                        | Q8LDC4 | Putative alanine acetyl transferase, complete                                                         | -3,78 |
| TC289526                        | O82450 | Branched-chain alpha-keto acid decarboxylase E1 beta subunit (EC 1.2.4.4), complete                   | -3,42 |
| TC283664                        | Q9LPL5 | Branched-chain alpha keto-acid dehydrogenase E1-alpha subunit                                         | -2,39 |
| TC289341                        | Q9LDY2 | Branched chain alpha-keto acid dehydrogenase E1 beta subunit (At3g13450), complete                    | -2,26 |

**Tabela XI.** Lista de genes relacionados ao metabolismo de ácidos nucleicos, síntese protéica e ciclo celular cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                           | Uniprot | Anotação                                                                                             | Fold Change |
|----------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Nucleases</i></b>                            |         |                                                                                                      |             |
| TC289822                                           | P42813  | Ribonuclease 1 precursor (EC 3.1.27.1 EC 3.1.27.1), complete                                         | 3,78        |
| TC295646                                           | Q9SW50  | Hypothetical protein T11I11.80 (Hypothetical protein AT4g34840), complete                            | 2,44        |
| TC308999                                           | Q9LWC0  | CAN (CA-2+ DEPENDENT NUCLEASE); nuclease {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (97%) | 2,21        |
| TC307678                                           | P42814  | homologue to Ribonuclease 2 precursor (EC 3.1.27.1 EC 3.1.27.1), partial (67%)                       | -2,21       |
| <b><i>Helicases</i></b>                            |         |                                                                                                      |             |
| TC294136                                           | Q9C873  | Helicase putative, complete                                                                          | 2,17        |
| TC294969                                           | Q9FT72  | DNA Helicase, complete                                                                               | 2,11        |
| TC307704                                           | Q0WVW7  | Putative ATP-dependent DNA helicase RecQ {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete      | -4,17       |
| TC285696                                           | Q7FGZ2  | ATRH1; ATP-dependent helicase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                 | -2,24       |
| <b><i>Ribossomos e síntese de proteínas</i></b>    |         |                                                                                                      |             |
| TC280792                                           | Q9ASR1  | At1g56070/T6H22_13 (Elongation factor EF-2), complete                                                | 2,19        |
| TC305120                                           | Q9LUQ6  | 60S ribosomal protein L19-2, complete                                                                | 2,10        |
| TC284677                                           | O49736  | Translation initiation factor eIF-2 gamma chain-like protein {Arabidopsis thaliana} , complete       | -4,90       |
| TC291687                                           | Q9LF15  | 40S ribosomal protein S7-like (At5g16130), complete                                                  | -4,70       |
| TC298856                                           | Q9MAC7  | T4P13.14 protein, complete                                                                           | -2,43       |
| TC299866                                           | Q4I6W0  | RS13_XENLA 40S RIBOSOMAL PROTEIN S13, complete                                                       | -2,08       |
| TC304706                                           | Q9M339  | Ribosomal protein S3a homolog (AT3g53870/F5K20_170), partial (44%)                                   | -2,05       |
| TC295434                                           | Q9FKC0  | 60S ribosomal protein L13a-4, complete                                                               | -2,02       |
| <b><i>Reparo do DNA</i></b>                        |         |                                                                                                      |             |
| TC303417                                           | Q9FNI6  | RAD5; ATP binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0) (EC 3.6.1.- EC 3.6.1.-), complete     | -17,65      |
| TC297212                                           | Q9LQQ2  | homologue to (Q9LQQ2) DNA repair protein RAD51 homolog 4 (AtRAD51D), partial (62%)                   | -2,60       |
| TC299393                                           | O48652  | 6-4 photolyase, partial (16%)                                                                        | -2,10       |
| <b><i>Ciclo celular</i></b>                        |         |                                                                                                      |             |
| TC288715                                           | Q9ZW3   | Proliferating cell nuclear antigen 2 (PCNA 2), complete                                              | 2,65        |
| TC280351                                           | O23277  | Protein PRD1 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                   | -2,53       |
| TC286559                                           | Q84M91  | At3g05330 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                     | -2,22       |
| TC289605                                           | Q94CM0  | Cyclin-dependent kinase inhibitor 4, complete                                                        | -2,17       |
| <b><i>Metabolismo de purinas e pirimidinas</i></b> |         |                                                                                                      |             |
| TC287415                                           | Q3EDJ9  | Tiamina pirofosfoquinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                      | 2,36        |
| TC304849                                           | Q8RY94  | adenylosuccinate lyase/ catalytic {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete             | 2,28        |
| TC304374                                           | Q9SU81  | Nucleotide pyrophosphatase-like protein (EC 3.6.1.9), complete                                       | 2,25        |
| TC309575                                           | Q8VYB2  | Uridine kinase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (21%)                           | -2,36       |

---

|                                                                         |        |                                                               |       |
|-------------------------------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------|-------|
| <i>Outras proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos nucléicos</i> |        |                                                               |       |
| TC312130                                                                | Q9ZPU5 | Putative retroelement pol polyprotein, complete               | 3,59  |
| TC288199                                                                | Q8L9H8 | DNA ligase-like protein, complete                             | 2,01  |
| TC282622                                                                | Q8LPK6 | RNA polymerase III subunit-like protein (At3g49000), complete | -2,56 |

---

**Tabela XII.** Lista de genes relacionados ao metabolismo de flavonóides e antocianinas e a outras glicosiltransferases cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                  | Uniprot | Anotação                                                                                                         | Fold Change |
|-------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Metabolismo de antocianinas</i></b> |         |                                                                                                                  |             |
| TC285927                                  | Q8GX09  | Putative anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase, complete                                                | 3,70        |
| TC286078                                  | Q9LTA3  | Putative anthocyanidin-3-glucoside rhamnosyltransferase (At5g49690) {Arabidopsis thaliana}, complete             | -4,96       |
| TC285470                                  | O04201  | Putative anthocyanin 5-aromatic acyltransferase (At2g39980/T28M21.14) {Arabidopsis thaliana}, complete           | -2,69       |
| TC286307                                  | Q9FNP9  | Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase-like protein (AT5g61160/maf19_160), complete                              | -2,31       |
| <b><i>Metabolismo de flavonóides</i></b>  |         |                                                                                                                  |             |
| TC286358                                  | Q9ZQG4  | UDP-glycosyltransferase {Arabidopsis thaliana}, complete; quercetin 3-O-glucosyltransferase                      | -4,18       |
| TC311369                                  | Q94C57  | UDP glucose:flavonoid 7-O-glucosyltransferase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete             | -2,36       |
| TC288573                                  | P52839  | Flavonol sulfotransferase-like (RaRO47) (EC 2.8.2.- EC 2.8.2.-), complete                                        | -2,20       |
| TC286092                                  | Q7Y232  | UDP-glycosyltransferase, complete; quercetin 3-O-glucosyltransferase; quercetin 7-O-glucosyltransferase activity | -2,12       |
| <b><i>Outras glicosiltransferases</i></b> |         |                                                                                                                  |             |
| TC286284                                  | Q9SYK9  | F3F20.13 protein (At1g05680), complete; UDP-glucosyltransferase activity                                         | -4,52       |
| TC305810                                  | O49492  | AT4g34130/F28A23_110 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; Glucosyltransferase-like protein    | -3,40       |
| TC286298                                  | Q9STE3  | At3g46690 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; Glucuronosyl transferase-like protein          | -3,32       |
| TC284810                                  | Q9ZQ96  | UDP-glycosyltransferase/ transferase transferring glycosyl groups {Arabidopsis thaliana}, complete               | -3,18       |
| TC287932                                  | O04536  | LGT8 (GLUCOSYL TRANSFERASE FAMILY 8) {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                       | -2,25       |
| TC285078                                  | Q9ZQ97  | At2g36770/F13K3.17 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; Putative glucosyl transferase         | -2,19       |
| TC297218                                  | Q9LSY5  | UTP-glucose glucosyltransferase, partial (36%)                                                                   | -2,03       |



**Tabela XIII.** Lista de genes relacionados ao transporte de substâncias cuja expressão em folhas *nial nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                           | Uniprot | Anotação                                                                                                  | Fold Change |
|----------------------------------------------------|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Transporte de íons metálicos</i></b>         |         |                                                                                                           |             |
| TC288113                                           | Q5E93   | SLAH1 (SLAC1 HOMOLOGUE 1); transporter (SLAH1) mRNA, complete cds                                         | 3,09        |
| TC288805                                           | O04089  | ZIP4 (ZRT IRT-LIKE PROTEIN); cation transporter {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete    | 2,70        |
| TC312537                                           | Q9ZRE3  | ATFP7 (Fragment), complete; metal ion transport                                                           | 2,35        |
| TC296965                                           | Q93VP2  | At1g22990/F19G10_22 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; metal ion transport           | 2,08        |
| TC296586                                           | A1L4Y1  | ATP binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (47%); metal ion transport              | -6,64       |
| TC300439                                           | Q9ZRE8  | ATFP2 (Fragment), partial (55%); metal ion transport                                                      | -2,98       |
| TC286519                                           | Q9S JL2 | Putative farnesylated protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; metal ion transport | -2,65       |
| TC302020                                           | Q8GWP3  | copper ion transporter {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                             | -2,45       |
| TC296058                                           | Q5PNZ7  | At5g48290, complete; metal ion transport                                                                  | -2,17       |
| <b><i>Transporte de lipídios</i></b>               |         |                                                                                                           |             |
| TC301167                                           | O81318  | F6N15.21 protein (Putative proline-rich protein), partial (33%); lipid transport                          | 2,62        |
| TC307827                                           | O65369  | Extensin-like protein; lipid transport                                                                    | 2,60        |
| TC281432                                           | P57792  | ATPase coupled to transmembrane movement of ions, complete; phospholipid transport                        | 2,11        |
| TC296797                                           | Q9LU33  | Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 3 P1 clone: MXL8, partial (63%); glycolipid transport         | -3,93       |
| <b><i>Transporte de açúcares</i></b>               |         |                                                                                                           |             |
| TC307545                                           | Q6AWX0  | D-xylose-proton symporter-like 2 (At5g17010), complete                                                    | 2,71        |
| TC283775                                           | Q39232  | Sucrose transport protein SUC1 (Sucrose permease 1) (Sucrose-proton symporter 1), complete                | 2,23        |
| TC284887                                           | Q8GW61  | Sugar transport protein 14 (Hexose transporter 14), complete                                              | -3,02       |
| <b><i>Transporte de compostos nitrogenados</i></b> |         |                                                                                                           |             |
| TC283706                                           | P54144  | Ammonium transporter 1 member 1 precursor (AtAMT1;1), complete                                            | 2,49        |
| TC289349                                           | O49722  | ATPUP6; purine transporter {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                         | -8,79       |
| TC310920                                           | Q9LXF8  | amino acid permease {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                | -4,43       |
| TC283042                                           | Q9ZPJ8  | Ammonium transporter 1 member 2 (AtAMT1;2), complete                                                      | -2,18       |
| TC296081                                           | Q0WQJ3  | homologue to amino acid-polyamine transporter {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (46%) | -2,10       |
| <b><i>Transporte de drogas (ABC)</i></b>           |         |                                                                                                           |             |
| TC281670                                           | O80946  | ATPase coupled to transmembrane movement of substances, complete; ABC transporter G family member 1       | 2,16        |
| TC292996                                           | Q9LFH0  | PDR9 ABC transporter, complete                                                                            | -3,42       |
| TC280275                                           | Q9SJR6  | Putative ABC transporter, complete                                                                        | -2,98       |
| TC305936                                           | Q9LUH3  | Gb AAF24840.1 protein; multidrug transport                                                                | -2,88       |
| TC304000                                           | Q8VZZ4  | ATMRP6 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; ABC transporter C family member 6          | -2,79       |
| TC303235                                           | Q9SIA4  | antiporter/ drug transporter/ transporter {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete          | -2,37       |
| TC285505                                           | Q8L731  | At1g15170 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; multidrug transport                     | -2,37       |
| TC309493                                           | Q9C7F2  | Multidrug resistance protein 12 (P-glycoprotein 14), complete; ABC transporter B family member 14         | -2,31       |

|                                                |        |                                                                                                     |       |
|------------------------------------------------|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC304441                                       | O80878 | Putative ABC transporter, complete; ABC transporter G family member 31                              | -2,07 |
| TC300521                                       | O80725 | Multidrug resistance protein 4 (P-glycoprotein 4), complete; ABC transporter B family member 4      | -2,01 |
| <b><i>Outras ATPases</i></b>                   |        |                                                                                                     |       |
| TC309511                                       | Q9LH82 | Similarity to AAA-type ATPase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                | 3,57  |
| TC284229                                       | Q9LH84 | Similarity to AAA-type ATPase                                                                       | 2,91  |
| TC295485                                       | Q8GZ01 | Putative BCS1 protein, complete                                                                     | 2,53  |
| TC301837                                       | O23223 | ATPase-like protein, partial (26%)                                                                  | -6,41 |
| TC285327                                       | Q9SZN1 | Probable H <sup>+</sup> -transporting ATPase (AT4g38510/F20M13_70), complete                        | -3,45 |
| <b><i>Outras proteínas transportadoras</i></b> |        |                                                                                                     |       |
| TC287045                                       | Q9LV81 | mitochondrial carrier protein-like {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete            | 3,28  |
| TC304801                                       | O23482 | Oligopeptide transporter 3 isp4 like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | 2,47  |
| TC305607                                       | Q8GY93 | Putative transport protein subunit, complete                                                        | 2,11  |
| TC299279                                       | O80915 | PRA1 family protein B4 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                       | 2,11  |
| TC294316                                       | Q8VZC9 | Vacuolar protein sorting-associated protein 25                                                      | 2,09  |
| TC282797                                       | O64758 | Vacuolar sorting receptor 5 precursor (AtVSR5), complete                                            | 2,08  |
| TC283786                                       | Q9LDV2 | binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete; transport protein                   | -3,66 |
| TC310722                                       | Q41963 | homologue to Aquaporin TIP1.2 (Gamma-tonoplast intrinsic protein 2), partial (36%)                  | -2,64 |
| TC283939                                       | Q8GYF4 | Inorganic phosphate transporter 1-5 (AtPht1;5) (H <sup>+</sup> )/Pi cotransporter), complete        | -2,34 |
| TC283584                                       | Q84TJ6 | Putative membrane protein, complete                                                                 | -2,29 |
| TC285392                                       | Q9SAK7 | T8K14.17 protein, complete; transport protein                                                       | -2,13 |

**Tabela XIV.** Lista de outros genes, relacionados a funções diversas, cuja expressão em folhas *nia1 nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID                                     | Uniprot | Anotação                                                                                                      | Fold Change |
|----------------------------------------------|---------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b><i>Citocromo P450</i></b>                 |         |                                                                                                               |             |
| TC312959                                     | O64514  | CYP79C1; heme binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                  | -32,24      |
| TC309880                                     | Q9LHA1  | Cytochrome P450, complete                                                                                     | -11,48      |
| TC285103                                     | O64697  | CYP710A1; heme binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                 | -3,55       |
| TC296368                                     | Q9LUC9  | Cytochrome P450, complete                                                                                     | -3,15       |
| TC283526                                     | Q9SK00  | Putative cytochrome P450, complete                                                                            | -3,14       |
| TC284816                                     | Q9SMP5  | Cytochrome P450-like protein (At3g48520), complete                                                            | -2,69       |
| TC284953                                     | Q9LVD6  | Cytochrome P450, complete                                                                                     | -2,67       |
| TC283784                                     | Q9SZT7  | Cytochrome P450-like protein, complete                                                                        | -2,58       |
| TC284035                                     | O80823  | Putative cytochrome P450                                                                                      | -2,49       |
| TC284969                                     | Q9STL1  | Cytochrome P450 71A22 (EC 1.14.-.- EC 1.14.-.-), complete                                                     | -2,24       |
| TC284261                                     | Q9SAE8  | F3F19.17 protein, complete                                                                                    | -2,15       |
| TC284119                                     | Q8LPP9  | Cytochrome P450 71A12                                                                                         | -2,10       |
| TC305528                                     | Q9LIP3  | cytochrome p450 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                         | -2,09       |
| TC310781                                     | Q8LCN8  | homologue to Cytochrome P450-like protein, partial (12%)                                                      | -2,08       |
| TC286537                                     | A8MS53  | similar to CYP702A6; heme binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                      | -2,05       |
| TC284137                                     | O64637  | Cytochrome P450 76C2 (EC 1.14.-.- EC 1.14.-.-), complete                                                      | -2,00       |
| <b><i>Homeostase do ferro</i></b>            |         |                                                                                                               |             |
| TC281684                                     | Q8VY13  | FRO8 (FERRIC REDUCTION OXIDASE 8); ferric-chelate {Arabidopsis thaliana}, complete                            | 2,84        |
| TC289912                                     | Q39101  | Ferritin-1 chloroplast precursor (AtFer1) (EC 1.16.3.1 EC 1.16.3.1), complete                                 | -2,27       |
| TC289098                                     | Q8RXJ6  | DIN11 (DARK INDUCIBLE 11); iron ion binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete            | -3,65       |
| <b><i>Resposta a estresses abióticos</i></b> |         |                                                                                                               |             |
| TC313955                                     | Q03251  | Glycine-rich RNA-binding protein 8 (At4g39260), partial (89%)                                                 | 9,04        |
| TC312470                                     | Q9SDM9  | Myrosinase-binding protein-like At3g16400, complete                                                           | 3,72        |
| TC297341                                     | Q08298  | Dehydration-responsive protein RD22 precursor, complete                                                       | 2,80        |
| TC302445                                     | Q9FWS6  | homologue to At1g75380/F1B16_15 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (29%)                   | 2,72        |
| TC289652                                     | Q9MA63  | Protein At3g05500, complete                                                                                   | 2,45        |
| TC297962                                     | Q9FX45  | RNA-binding glycine-rich protein, putative (At1g73530) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | 2,44        |
| TC305590                                     | Q9LTJ6  | Similarity to photomorphogenesis repressor COP1 (At5g52250) {Arabidopsis thaliana}, complete                  | -2,61       |
| TC309938                                     | Q03250  | homologue to glycine-rich RNA binding protein 7 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (41%)   | -2,26       |
| TC305758                                     | Q9SYG7  | Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 (Antiquitin-1), complete                                            | -2,24       |
| TC293483                                     | Q9SI55  | Putative cold-regulated protein                                                                               | -2,16       |

|                                                         |        |                                                                                                             |       |
|---------------------------------------------------------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b><i>Síntese de coenzimas e grupos prostéticos</i></b> |        |                                                                                                             |       |
| TC309778                                                | Q84MD8 | homologue to At4g21470 (Riboflavin kinase/FMN hydrolase), partial (20%)                                     | 2,76  |
| TC313949                                                | Q9SF23 | dihydroneopterin aldolase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (95%)                       | 2,54  |
| TC289710                                                | Q7Y203 | GLA1 (GLOBULAR ARREST1); tetrahydrofolylpolyglutamate synthase {Arabidopsis thaliana}, complete             | 2,25  |
| TC300025                                                | O80448 | Probable pyridoxin biosynthesis PDX1-like protein 1 (HEVER-like protein), complete                          | -2,22 |
| TC285909                                                | P42043 | Ferrochelatase-1 chloroplast/mitochondrial precursor (Ferrochelatase I), complete                           | -2,19 |
| <b><i>Nodulinas</i></b>                                 |        |                                                                                                             |       |
| TC290887                                                | Q9LRT5 | Similarity to nodulin MtN3 protein, partial (97%)                                                           | 2,68  |
| TC287103                                                | Q9T076 | Early nodulin-like protein 2 precursor (Phytoeyanin-like protein), complete                                 | 2,31  |
| TC294033                                                | Q9LH79 | MtN3-like protein (AT3g14770/T21E2_2), complete                                                             | -3,11 |
| TC308015                                                | Q9SUD5 | Medicago nodulin N21-like protein, partial (33%)                                                            | -2,86 |
| TC308082                                                | Q9FMT8 | Nodulin-like protein, complete                                                                              | -2,11 |
| <b><i>Proteínas contendo repetições anquirina</i></b>   |        |                                                                                                             |       |
| TC297412                                                | Q9FIU3 | Ankyrin-repeat-containing protein-like, complete                                                            | 3,81  |
| TC295859                                                | Q8GYH5 | Putative ankyrin-repeat-containing protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete           | 2,90  |
| TC282546                                                | Q9ZT73 | Ankyrin-repeat-containing protein-like, complete {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete     | 2,23  |
| TC305469                                                | Q56XT0 | Ankyrin-repeat-containing protein-like (Hypothetical protein At4g14400)                                     | 2,08  |
| <b><i>Oxidoredutases</i></b>                            |        |                                                                                                             |       |
| TC305740                                                | Q9LFS7 | oxidoreductase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (97%)                                  | 30,13 |
| TC291660                                                | Q94AL3 | oxidoreductase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                       | 2,64  |
| TC302703                                                | Q9SA85 | Putative reticuline oxidase-like protein (At1g30700) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete | -4,58 |
| TC284300                                                | Q9SA87 | Putative reticuline oxidase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                          | -3,02 |
| TC286079                                                | O81815 | Monooxygenase (MRNA complete cds clone: RAFL21-57-F09), complete                                            | -2,67 |
| TC289905                                                | Q9SSG3 | HIPL1 protein precursor, complete                                                                           | -2,27 |
| <b><i>Outras funções</i></b>                            |        |                                                                                                             |       |
| TC307589                                                | Q682G4 | homologue to MRNA complete cds clone: RAFL21-83-M20, partial (97%)                                          | 3,94  |
| TC289360                                                | Q9FYC4 | S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete     | 3,83  |
| TC313367                                                | Q9FLX6 | Selenium-binding protein-like, complete                                                                     | 3,46  |
| TC301948                                                | Q9S728 | homologue to En/Spm-like transposon protein (At2g42840) (Protodermal factor 1), partial (80%)               | 3,21  |
| TC283808                                                | P37106 | Signal recognition particle 54 kDa protein 1 (SRP54), complete                                              | 3,13  |
| TC310691                                                | Q41187 | Glycine-rich protein (Fragment), complete                                                                   | 2,78  |
| TC295011                                                | Q9M1X3 | Chloroplast outer envelope membrane protein                                                                 | 2,37  |
| TC293532                                                | Q6ID86 | S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases (At4g34360), complete                                     | 2,33  |
| TC308711                                                | Q9LJ68 | F-box protein At3g18980 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (16%)                          | 2,32  |
| TC310669                                                | Q9LU90 | Emb CAB52817.1, complete; F-box protein At3g26010                                                           | 2,21  |
| TC313452                                                | Q8LAC6 | homologue to (Q8LAC6) Glycine rich protein-like, partial (66%)                                              | 2,17  |
| TC307606                                                | Q4PT06 | LOB domain family protein, complete                                                                         | 2,15  |
| TC312786                                                | Q680Z7 | Pentatricopeptide repeat-containing protein At1g09220, mitochondrial , partial (81%)                        | 2,05  |
| TC303461                                                | Q9FQ23 | Tonneau 1b, complete                                                                                        | 2,12  |
| TC282232                                                | O49675 | Neoxanthin cleavage enzyme-like protein (At4g19170) (AT4g19170/T18B16_140), complete                        | 2,11  |

|          |        |                                                                                                             |       |
|----------|--------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC287437 | Q9ZVL6 | UPF0603 protein At1g54780, chloroplastic {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete              | 2,06  |
| TC285095 | C0Z3F9 | HYL1 (HYPONASTIC LEAVES 1) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                           | 2,03  |
| TC286651 | Q9SAU3 | Signal recognition particle 43 kDa protein, chloroplastic                                                   | 2,02  |
| TC285458 | Q9LXJ0 | plastid division protein FtsZ2-2 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                     | 2,02  |
| TC285081 | Q9SSD1 | TOO MANY MOUTHS protein precursor (TMM), complete                                                           | 2,02  |
| TC288775 | Q9C6E4 | PHI-1 (PHOSPHATE-INDUCED 1) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                          | -4,71 |
| TC305891 | Q9M0H8 | homologue to Predicted proline-rich protein, complete                                                       | -3,73 |
| TC303986 | O49629 | homologue to fibrillin precursor-like protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (30%)   | -3,32 |
| TC289828 | Q8GTR7 | Putative Serine/arginine rich protein, complete                                                             | -3,11 |
| TC302129 | A8MS73 | Putative RING zinc finger protein {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (17%)               | -2,85 |
| TC285293 | Q9SZP8 | translation initiation factor {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                        | -2,81 |
| TC285397 | Q9FJT7 | Pollen specific protein SF21 (AT5g56750/MIK19_22), complete                                                 | -2,76 |
| TC282715 | Q9LF46 | 2-hydroxyphytanoyl-CoA lyase-like protein, complete                                                         | -2,71 |
| TC307878 | Q3E7K1 | Protein At3g51325 (At3g51325), complete                                                                     | -2,70 |
| TC308096 | Q93XW5 | Nitrile-specifier protein 5 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                           | -2,61 |
| TC308303 | Q9U5K6 | weakly similar to Moderately methionine rich storage protein, partial (3%)                                  | -2,60 |
| TC306557 | Q38852 | Senescence-associated protein, partial (54%)                                                                | -2,58 |
| TC311632 | Q9ZWA8 | FLA9 (fasciclin-like arabinogalactan-protein 9) {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (30%) | -2,43 |
| TC299250 | O22909 | protein binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                      | -2,40 |
| TC290989 | Q29PX7 | At1g19540, complete                                                                                         | -2,35 |
| TC289205 | Q9LK72 | Lectin-like protein (AT3g16530/MDC8_16), complete                                                           | -2,33 |
| TC289720 | Q9SN23 | LOB domain protein 38, complete                                                                             | -2,31 |
| TC297561 | Q9LN40 | F18O14.30, complete                                                                                         | -2,28 |
| TC307581 | Q9T0I9 | calcium ion binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (78%)                             | -2,26 |
| TC308736 | Q9LH02 | homologue to Similarity to human diaphanous 1, partial (4%)                                                 | -2,23 |
| TC284791 | Q93YU2 | EMB1879 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                              | -2,22 |
| TC299360 | O80856 | homologue to ARPC1A; nucleotide binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (59%)         | -2,13 |
| TC311586 | Q38853 | Senescence-associated protein sen1 (AT4g35770/F8D20_280), partial (59%)                                     | -2,13 |
| TC289622 | Q9FL70 | Cotton fiber expressed protein 1-like protein, complete                                                     | -2,11 |
| TC298008 | Q676C3 | similar to SNS protein-like protein, partial (1%)                                                           | -2,10 |
| TC300914 | Q9FLS0 | Emb CAB85517.1, complete                                                                                    | -2,10 |
| TC287910 | Q5XF59 | Enoyl-CoA hydratase like protein (At3g60510), complete                                                      | -2,08 |

**Tabela XV.** Lista de genes relacionados a proteínas desconhecidas ou de função não determinada cuja expressão em folhas *nia1* *nia2* infectadas foi significativamente modulada após 12 h de fumigação com NO.

| Probe ID | Anotação                                                                                                     | Fold Change |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| TC307882 | Unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 16,52       |
| TC311080 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (63%)                                   | 7,75        |
| TC295642 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 7,11        |
| TC301625 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 6,13        |
| TC304468 | unknown protein; 38223-37750 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (82%)                      | 5,60        |
| TC288705 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 5,42        |
| TC307179 | (Q6ID74) At4g32785, complete                                                                                 | 5,10        |
| TC301443 | (Q8RX84) AT5g28150/T24G3_80, complete                                                                        | 5,09        |
| TC308507 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (85%)                                   | 5,00        |
| TC310143 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (42%)                                           | 4,76        |
| TC300335 | (Q8S8H2) Expressed protein, complete                                                                         | 4,70        |
| TC306237 | (Q9FXA1) F14J22.4 protein (At1g49750), complete                                                              | 4,33        |
| TC305004 | (Q9LHA6) Dbj BAA87936.1 (AT3g28220/T19D11_3), complete                                                       | 3,89        |
| TC303801 | putative protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (41%)                                  | 3,85        |
| TC302039 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,81        |
| TC305361 | homologue to unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                   | 3,76        |
| TC294935 | (Q9ZPS5) Hypothetical protein At2g01990, complete                                                            | 3,75        |
| TC293058 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,70        |
| TC312394 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,68        |
| TC286299 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,62        |
| TC302948 | (Q9ZU23) F5F19.6 protein, complete                                                                           | 3,59        |
| TC303041 | (Q8S8H2) Expressed protein, complete                                                                         | 3,54        |
| TC292136 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,53        |
| TC289283 | DNA binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                           | 3,51        |
| TC301236 | (Q3EDJ9) Protein At1g02880, partial (79%)                                                                    | 3,50        |
| TC306256 | (Q9FYK6) F21J9.24, complete                                                                                  | 3,50        |
| TC282735 | putative protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                       | 3,45        |
| TC296666 | (Q9ZQB8) Hypothetical protein F1K3.5 (Hypothetical protein AT4g07970), complete                              | 3,43        |
| TC307609 | (Q570K8) Hypothetical protein, complete                                                                      | 3,43        |
| TC305691 | Unknown protein; Location of ESTs 126N5T7 gb T44905 and 137K23T7 gb T46004 {Arabidopsis thaliana} , complete | 3,42        |
| TC298424 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,41        |
| TC311591 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (78%)                                   | 3,38        |
| TC292012 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,25        |
| TC283996 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                        | 3,14        |

|          |                                                                                              |      |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TC287740 | (Q9FGL4) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MNJ7 (At5g47440), complete   | 3,10 |
| TC300287 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 3,05 |
| TC289168 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 3,04 |
| TC296204 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,99 |
| TC308872 | (Q9LW52) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 3 P1 clone: MLM24, complete             | 2,98 |
| TC312302 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,97 |
| TC311682 | homologue to (Q3ECR7) Protein At1g52827, complete                                            | 2,95 |
| TC288986 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,93 |
| TC286152 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,92 |
| TC302125 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,91 |
| TC301389 | (O48681) F3I6.7 protein, partial (71%)                                                       | 2,89 |
| TC288768 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,86 |
| TC300926 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                | 2,84 |
| TC312077 | (Q9S7L7) F1C9.28 protein (F28J7.27 protein), complete                                        | 2,82 |
| TC309199 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,81 |
| TC292166 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,80 |
| TC302987 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,74 |
| TC308663 | (Q94AE1) At1g52410/F19K6_14, complete                                                        | 2,67 |
| TC309826 | (Q570K8) Hypothetical protein, complete                                                      | 2,67 |
| TC293708 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                | 2,66 |
| TC311966 | homologue to At4g14930 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (11%)           | 2,65 |
| TC307404 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,64 |
| TC288721 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,64 |
| TC291657 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,61 |
| TC294388 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,61 |
| TC292006 | (Q9SU07) Hypothetical protein T20K18.140 (Hypothetical protein AT4g12790), complete          | 2,60 |
| TC297790 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,59 |
| TC306320 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                | 2,59 |
| TC306711 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,55 |
| TC291405 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,53 |
| TC287758 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                | 2,52 |
| TC284306 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,50 |
| TC311601 | unknown protein {Oryza sativa (japonica cultivar-group)} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (29%) | 2,48 |
| TC313270 | putative protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                       | 2,48 |
| TC313610 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (86%)                           | 2,48 |
| TC296029 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,47 |
| TC302076 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (23%)                   | 2,47 |
| TC281373 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,46 |
| TC313593 | (Q2V367) Protein At5g19140, partial (67%)                                                    | 2,46 |
| TC301033 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                        | 2,46 |

|          |                                                                                            |      |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| TC295495 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,43 |
| TC286505 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | 2,43 |
| TC286961 | (O49559) Hypothetical protein F7J7.120 (Hypothetical protein AT4g21180), complete          | 2,43 |
| TC282504 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,41 |
| TC289410 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,39 |
| TC310750 | (Q9C8N3) Hypothetical protein F7P12.4, complete                                            | 2,39 |
| TC304046 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,38 |
| TC305641 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (2%)                  | 2,38 |
| TC289303 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,37 |
| TC305350 | homologue to (Q9FYG0) F1N21.15 (At1g67330), partial (25%)                                  | 2,36 |
| TC287613 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,35 |
| TC286316 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,32 |
| TC300174 | AT5g44580/K15C23_2 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                  | 2,30 |
| TC303091 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,30 |
| TC311573 | homologue to {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                        | 2,29 |
| TC303090 | (Q3ECN6) Protein At1g56060, complete                                                       | 2,29 |
| TC303716 | (Q9FIG4) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MDH9, complete             | 2,28 |
| TC294908 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,27 |
| TC301200 | (Q9FFA2) Gb AAC72114.1, complete                                                           | 2,26 |
| TC292272 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,24 |
| TC312561 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,24 |
| TC299943 | (Q2V3E2) Protein At4g27740, complete                                                       | 2,23 |
| TC291758 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,22 |
| TC291609 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,21 |
| TC288258 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | 2,20 |
| TC305893 | (O65714) Hypothetical protein AT4g19430, complete                                          | 2,19 |
| TC298650 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,18 |
| TC285769 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,18 |
| TC306481 | homologue to (Q5VNE1) Hypothetical protein P0491D10.24, partial (5%)                       | 2,18 |
| TC292816 | (Q56XA4) Hypothetical protein, complete                                                    | 2,17 |
| TC301358 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,17 |
| TC290288 | At1g16500 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                           | 2,16 |
| TC288694 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,16 |
| TC296378 | (Q9SZM9) Hypothetical protein F20M13.50 (Hypothetical protein AT4g38490), complete         | 2,15 |
| TC292574 | (Q9FM16) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MQB2 (At5g62770), complete | 2,15 |
| TC297621 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,15 |
| TC296836 | At5g08185 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                           | 2,13 |
| TC281479 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,12 |
| TC286585 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,11 |
| TC293420 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                      | 2,11 |



|          |                                                                                         |        |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| TC307172 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | 2,10   |
| TC298731 | (Q94JR3) AT4g18280/T9A21_130, complete                                                  | 2,10   |
| TC312040 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (50%) | 2,10   |
| TC309073 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | 2,10   |
| TC288250 | (Q8RX70) AT5g52030/MSG15_11, complete                                                   | 2,09   |
| TC291986 | (Q6NPD4) At5g27490, complete                                                            | 2,09   |
| TC294376 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | 2,09   |
| TC307022 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (24%)              | 2,09   |
| TC295002 | (O49716) Hypothetical protein T8O5.140 (Hypothetical protein AT4g21930), partial (97%)  | 2,08   |
| TC297210 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | 2,08   |
| TC307321 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                           | 2,08   |
| TC285308 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                           | 2,07   |
| TC297223 | (Q29Q07) At4g16447, complete                                                            | 2,06   |
| TC299710 | (Q9LNE9) T21E18.2 protein, complete                                                     | 2,06   |
| TC306379 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (43%) | 2,06   |
| TC308638 | (Q56YC6) Hypothetical protein (Fragment), complete                                      | 2,05   |
| TC301371 | (O80529) F14J9.12 protein, complete                                                     | 2,04   |
| TC292252 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | 2,01   |
| TC313569 | (Q9FHI3) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MFC19, complete         | -25,47 |
| TC290314 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -22,38 |
| TC310838 | homologue to (Q9LJV7) Gb AAC61810.1, complete                                           | -19,17 |
| TC291627 | (Q9ZVA5) F9K20.9 protein, complete                                                      | -6,97  |
| TC302575 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -6,88  |
| TC308435 | (Q9FMY8) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MJB21, complete         | -6,19  |
| TC304945 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (89%) | -5,37  |
| TC293541 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -5,23  |
| TC280700 | (O23096) A_TM018A10.23 protein (AT4g00800 protein), complete                            | -5,18  |
| TC282302 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -5,08  |
| TC294320 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -5,05  |
| TC296559 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -4,79  |
| TC293180 | (O49689) Hypothetical protein AT4g17900, complete                                       | -4,66  |
| TC296745 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -4,59  |
| TC301076 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -4,31  |
| TC285257 | (Q9SUW9) Hypothetical protein AT4g22500, complete                                       | -4,29  |
| TC301433 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -3,78  |
| TC305381 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (24%)                      | -3,78  |
| TC285536 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -3,67  |
| TC288083 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -3,62  |
| TC294492 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                           | -3,45  |
| TC300491 | Unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -3,41  |

|          |                                                                                                    |       |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC307740 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,29 |
| TC299167 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,26 |
| TC305739 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,21 |
| TC295017 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,18 |
| TC286389 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,17 |
| TC288549 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,06 |
| TC297562 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -3,04 |
| TC300948 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (50%)            | -3,01 |
| TC305989 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (21%)                         | -2,93 |
| TC296498 | similar to similar to predicted CDS reverse transcriptase like family member (4D351), partial (3%) | -2,89 |
| TC300539 | (Q8LK92) Hypothetical protein AT2G03810_1/F19B11.11, complete                                      | -2,87 |
| TC298080 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,81 |
| TC311645 | (Q9LNV9) F22G5.26, complete                                                                        | -2,80 |
| TC307504 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,78 |
| TC291511 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,75 |
| TC299155 | (Q9SA88) T5I8.18 protein, complete                                                                 | -2,72 |
| TC289766 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,71 |
| TC297997 | (O80533) F14J9.16 protein (At1g09500/F14J9_16), complete                                           | -2,69 |
| TC292972 | (Q9FK31) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MXI22 (At5g50410), complete        | -2,65 |
| TC312532 | unknown protein; 93089-95433 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (93%)            | -2,64 |
| TC289124 | (Q9LMH1) F16A14.7, partial (87%)                                                                   | -2,59 |
| TC301813 | (Q6NPS8) At3g02280, complete                                                                       | -2,58 |
| TC290327 | (Q9LPG3) T3F20.21 protein, complete                                                                | -2,57 |
| TC286073 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,57 |
| TC290555 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,56 |
| TC305858 | (Q7Y225) At3g24020, complete                                                                       | -2,54 |
| TC289515 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,54 |
| TC295775 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,48 |
| TC298000 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,47 |
| TC292874 | (Q9S9X1) F28D6.18 protein (AT4g07440 protein), complete                                            | -2,47 |
| TC283866 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,41 |
| TC288352 | (Q944H1) AT4g10470/F7L13_50 (At4g10470), complete                                                  | -2,40 |
| TC285711 | (Q5XET7) At4g28070, complete                                                                       | -2,39 |
| TC295922 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,39 |
| TC305192 | (Q9FZ72) F13B4.3 protein, complete                                                                 | -2,36 |
| TC303530 | Unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0) (EC 1.1.1.195), complete               | -2,36 |
| TC312317 | (Q3E7H6) Protein At3g18540, partial (42%)                                                          | -2,36 |
| TC295570 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,35 |
| TC297673 | (Q9FJ28) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 TAC clone:K16L22, complete                  | -2,34 |
| TC292538 | (O23261) Hypothetical protein AT4g14000, complete                                                  | -2,32 |

|          |                                                                                                     |       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC281324 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,32 |
| TC297379 | putative protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                              | -2,32 |
| TC289940 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,31 |
| TC286123 | (Q8S9J0) At2g36630/F1O11.26, complete                                                               | -2,31 |
| TC291859 | (Q9LS54) Gb AAF16598.1 (At3g18360), complete                                                        | -2,30 |
| TC299503 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,30 |
| TC292512 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,30 |
| TC308890 | (Q6NNL3) At3g02240, complete                                                                        | -2,29 |
| TC283409 | unknown protein; 95319-98330 {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                  | -2,28 |
| TC292515 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                       | -2,28 |
| TC301161 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                       | -2,28 |
| TC295217 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,27 |
| TC293675 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                       | -2,25 |
| TC290863 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                                       | -2,24 |
| TC292365 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,24 |
| TC307772 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,24 |
| TC312575 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,23 |
| TC303276 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (25%)             | -2,22 |
| TC303313 | (Q9LE10) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 3 P1 clone: MJK13 (MJK13.10 protein), complete | -2,22 |
| TC293710 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,22 |
| TC283452 | (O04250) Hypothetical protein T10M13.11 (Hypothetical protein AT4g02100), complete                  | -2,21 |
| TC292196 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,21 |
| TC294766 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,20 |
| TC312934 | (Q9SKW2) F5J5.8, partial (7%)                                                                       | -2,19 |
| TC298673 | (Q9FJJ1) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 TAC clone:K19B1, complete                    | -2,19 |
| TC292237 | (Q9SX80) F16N3.23 protein, complete                                                                 | -2,18 |
| TC287345 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,17 |
| TC292114 | (Q3EB61) Protein At3g14850, partial (75%)                                                           | -2,17 |
| TC283542 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,16 |
| TC310271 | similar to (Q616H0) Hypothetical protein CBG15279, partial (3%)                                     | -2,16 |
| TC305618 | Putative uncharacterized protein                                                                    | -2,15 |
| TC289684 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,15 |
| TC293626 | similar to similar to ENSANGP00000023327 {Apis mellifera} (exp=-1; wgp=0; cg=0), partial (27%)      | -2,15 |
| TC311821 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,14 |
| TC291260 | (Q9FLY3) Arabidopsis thaliana genomic DNA chromosome 5 P1 clone:MUL8, partial (92%)                 | -2,14 |
| TC297992 | (Q9SSB3) T18A20.3 protein, partial (17%)                                                            | -2,14 |
| TC312290 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (33%)             | -2,13 |
| TC312827 | homologue to (Q94AB0) AT5g35560/MOK9_21, partial (15%)                                              | -2,12 |
| TC299730 | binding {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                                      | -2,12 |
| TC294913 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                               | -2,12 |

|          |                                                                                         |       |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| TC303842 | (Q9S3N3) Expressed protein (At2g36220/F2H17.17), complete                               | -2,11 |
| TC290243 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,11 |
| TC291858 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,10 |
| TC302106 | At1g17860/F2H15_8 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                | -2,10 |
| TC286301 | (Q8W568) At1g73750/F25P22_17, complete                                                  | -2,10 |
| TC289254 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,09 |
| TC293266 | (O65701) Hypothetical protein, complete                                                 | -2,08 |
| TC313285 | (Q9LYF2) Hypothetical protein T22P22_180, complete                                      | -2,08 |
| TC288309 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,06 |
| TC306591 | homologue to unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (94%) | -2,06 |
| TC289263 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,06 |
| TC283493 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,06 |
| TC283738 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,05 |
| TC305105 | At1g69585 {Arabidopsis thaliana} (exp=-1; wgp=0; cg=0), complete                        | -2,05 |
| TC285812 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,04 |
| TC308166 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                           | -2,04 |
| TC289065 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,04 |
| TC309544 | (Q9SAI0) F23A5.16 protein, partial (9%)                                                 | -2,04 |
| TC309363 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,03 |
| TC308280 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,03 |
| TC303146 | (O80644) Expressed protein, complete                                                    | -2,03 |
| TC287210 | (Q9SKK3) Expressed protein, complete                                                    | -2,02 |
| TC294566 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,02 |
| TC313939 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), partial (94%)              | -2,02 |
| TC311361 | (Q9LPQ8) F15H18.9, partial (28%)                                                        | -2,02 |
| TC307767 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,02 |
| TC304160 | unknown protein {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                   | -2,01 |
| TC309289 | unknown {Arabidopsis thaliana} (exp=0; wgp=1; cg=0), complete                           | -2,01 |

## **CONCLUSÕES**

As seguintes conclusões foram obtidas a partir dos resultados apresentados e discutidos nos capítulos desta tese:

- A existência de uma atividade de degradação de NO por mitocôndrias isoladas de tubérculos de batata, através de um mecanismo dependente de sua reação com  $O_2^-$ , foi demonstrada. Além da participação do vazamento de elétrons no complexo III, ensaios com diferentes substratos e inibidores respiratórios evidenciaram o envolvimento das NAD(P)H desidrogenases externas nesse mecanismo de consumo de NO, revelando um papel até então desconhecido dessas proteínas, características da cadeia respiratória vegetal, na homeostase do NO. Esse processo foi também caracterizado em mitocôndrias isoladas de células em suspensão de *A. thaliana* (Wulff et al., 2009), sugerindo que ele pode constituir um mecanismo geral de as mitocôndrias vegetais controlarem a homeostase do NO e o efeito inibitório desse radical sobre a atividade respiratória.
- Esse mecanismo de degradação de NO se diferenciou em certos aspectos daquele verificado em mitocôndrias isoladas de fígado de rato. Além do vazamento de elétrons pelo complexo III, o transporte reverso de elétrons da succinato desidrogenase para o complexo I foi demonstrado como uma importante fonte de geração de  $O_2^-$  para a degradação de NO por mitocôndrias de fígado de rato, o que não foi detectado em mitocôndrias vegetais. Adicionalmente, observou-se o envolvimento no consumo de NO de uma atividade geradora de  $O_2^-$  na presença de NAD(P)H, que se distinguiu da degradação de NO dependente de NAD(P)H caracterizada em mitocôndrias de batata por não estar associada à cadeia respiratória. Esses resultados sugeriram a possível existência de uma enzima do tipo NAD(P)H oxidase em mitocôndrias animais, o que constituía um dado extremamente novo e relevante. Muito recentemente, essa hipótese foi ratificada por um trabalho que demonstrou, por métodos bioquímicos e imunofluorimétricos, a localização mitocondrial de uma NAD(P)H oxidase tipo 4 em rins de rato, relacionada à produção de radicais livres durante o diabetes (Block et al., 2009).
- Mesmo com o aumento do conteúdo endógeno de Arg, obtido através do cultivo das plantas *nia1 nia2* com aminoácidos, as folhas desse genótipo continuaram apresentando uma baixa emissão de NO quando inoculadas com *Pseudomonas*

*syringae*, indicando que a Arg não é a principal fonte de NO durante essa interação fitopatogênica. Adicionalmente, plantas *nial1 nia2* com níveis de aminoácidos recuperados permaneceram susceptíveis à bactéria. Esses resultados demonstraram que as alterações metabólicas pleiotrópicas decorrentes da assimilação deficiente de nitrogênio, como os baixos níveis de aminoácidos, não são determinantes no estabelecimento da resposta de defesa de *nial1 nia2* à *P. syringae*

- Por outro lado, quando plantas *nial1 nia2* com os níveis de aminoácidos recuperados foram fumigadas com baixas concentrações de gás NO, a resposta de resistência desse mutante à *P. syringae* foi restabelecida, demonstrando que a susceptibilidade de *nial1 nia2* é de fato devido a sua produção deficiente de NO. Isso foi ratificado pelo efeito do tratamento com NO em ativar a expressão de diversos genes relacionados à defesa em folhas *nial1 nia2* infectadas com *P. syringae*, o que foi observado através da realização de uma análise em larga escala do perfil transcriptômico usando microarranjos de DNA. Essa análise também indicou novos genes como potenciais alvos do NO, abrindo a possibilidade de estudos futuros acerca de papéis até então desconhecidos do NO na interação fitopatogênica, bem como na sinalização de processos relacionados ao controle do crescimento e desenvolvimento vegetal.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



- Abu-Soud, H.M., Hazen, S.L. (2000) Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian peroxidases. *J. Biol. Chem.* **275**: 37524-37532.
- Aliyev, A., Seyidova, D., Rzayev, N., Obrenovich, M.E., Lamb, B.T., Chen, S.G., Smith, M.A., Perry, G., de la Torre, J.C., Aliev, G. (2004) Is nitric oxide a key target in the pathogenesis of brain lesions during the development of Alzheimer's disease? *Neurol. Res.* **26**: 547-553.
- Andreyev, A.Y., Kushnareva, Y.E., Starkov, A.A. (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry* **70**: 200-214.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**: 332-341
- Block, K., Gorin, Y., Abboud, H.E. (2009) Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 14385-14390.
- Blokhina, O., Fagerstedt, K.V. (2010) Reactive oxygen species and nitric oxide in plant mitochondria: origin and redundant regulatory systems. *Physiol. Plant.* doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01340.x
- Boccara, M., Mills, C.E., Zeier, J., Anzi, C., Lamb, C., Poole, R.K., Delledonne, M. (2005) Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *Plant J.* **43**: 226-37.
- Borisjuk, L., Rolletschek, H. (2009) The oxygen status of the developing seed. *New Phytol.* **182**: 17-30.
- Brown, G. C., Borutaite, V. (2004) Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1658**: 44-49.
- Brunelli, L., Yermilov, V., Beckman, J.S. (2001) Modulation of catalase peroxidatic and catalatic activity by nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 709-714.
- Castello, P., David, P., McClure, T., Crook, Z., Poyton, R. (2006) Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxia signaling in eukaryotes. *Cell Metabol.* **3**: 277-287.

- Cecconi, D., Orzetti, S., Vandelle, L., Rinalducci, S., Zolla, L., Delledonne, M. (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* **30**: 2460–2468.
- Chen, Y.R., Chen, C.L., Yeh, A., Liu, X., Zweier, J.L. (2006) Direct and indirect roles of cytochrome *b* in the mediation of superoxide generation and NO catabolism by mitochondrial succinate-cytochrome *c* reductase, *J. Biol. Chem.* **291**: 13159–13168.
- Cleeter, M.W., Cooper, J.M., Darley-USmar, V.M., Moncada, S., Schapira, A.H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome *c* oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* **345**: 50–54.
- Clementi, E., Brown, G.C., Feelisch, M., Moncada, S. (1998) Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 7631–7636.
- Coffey, M.J., Natarajan, R., Chumley, P.H., Coles, B., Thimmalapura, P.R., Nowell, M., Kuhn, H., Lewis, M.J., Freeman, B.A., O'Donnell, V.B. (2001) Catalytic consumption of nitric oxide by 12/15- lipoxygenase: inhibition of monocyte soluble guanylate cyclase activation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 8006–8011.
- Cooper, C.E. (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**:290-309.
- Cooper, C.E., Giulivi, C. (2007) Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**: C1993-C2003.
- Courtois, C., Beson, A., Dahan, J., Bourque, S., Dobrowolska, G., Pugin, A., Wendehenne, D. (2008). Nitric oxide signalling in plants: interplays with Ca<sup>2+</sup> and protein kinases. *J. Exp. Bot.* **59**: 155–163.
- Dangl, J.L., Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**: 826–833.

- 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., Dixon, R.A., Lamb, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A., Lamb, C. (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 13454-13459.
- 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.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 10328-10333.
- Durrant, W.E., Dong, X. (2004) Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**: 185-209.
- Enkhardt, U., Pommer, U. (2000) Influence of nitric oxide and nitrite on the activity of cinnamic acid 4-hydroxylase of *Zea mays* *in vitro*. *J. Appl. Bot.* **74**: 151-154.
- Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverari, A., Puppo, A., Delledonne, M. (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**: 781-790.
- Flores, T., Todd, C.D., Tovar-Mendez, A., Dhanoa, P.K., Correa-Aragunde, N., Hoyos, M.E., Brownfield, D.M., Mullen, R.T., Lamattina, L., Polacco, J.C. (2008) Arginase-negative mutants of *Arabidopsis* exhibit increased nitric oxide signaling in root development. *Plant Physiol.* **147**: 1936-1946.
- Gao, Y. (2010) The multiple actions of NO. *Pflugers Arch.* DOI 10.1007/s00424-009-0773-9
- Gardner, P.R., Martin, L.A., Hall, D., Gardner, A.M. (2001) Dioxygen-dependent metabolism of nitric oxide in mammalian cells. *Free Radical Biol. Med.* **31**: 191-204.

- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhaes, A.C.N., Martins, I.S. (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.* **21**: 183–187.
- Grun, S., Lindermayr, C., Sell, S., Durner, J. (2006) Nitric oxide and gene regulation in plants. *J. Exp. Bot.* **57**: 507-516.
- Guo, F., Okamoto, M., Crawford, N.M. (2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100–103.
- Guo, P., Cao, Y., Li, Z., Zhao, B. (2004). Role of an endogenous nitric oxide burst in the resistance of wheat to stripe rust. *Plant Cell Environ.* **27**: 473-477.
- Gupta, K.J., Stoimenova, M., Kaiser, W.M. (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *J. Exp. Bot.* **56**: 2601–2609
- Hammerschmidt, R. (1999). Phytoalexins: What have we learned after 60 years? *Annu. Rev. Phytopathol.* **37**: 285-306.
- Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.O., Marshall, H.E., Stamler, J.S. (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 150-166.
- Huang, X., Stettmaier, K., Michel, C., Hutzler, P., Mueller, M.J., Durner, J. (2004) Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **218**: 938-946.
- Igamberdiev, A.U., Seregélyes, C., Manac'h, N., Hill, R.D. (2004) NADH-dependent metabolism of nitric oxide in alfalfa root cultures expressing barley hemoglobin. *Planta* **219**: 95-102.
- Igamberdiev, A.U., Baron, K., Manac'h-Little, N., Stoimenova, M., Hill, R.D. (2005) The haemoglobin/nitric oxide cycle: involvement in flooding stress and effects on hormone signalling. *Ann. Bot.* **96**: 557-564.
- Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 9265-9269.
- Jasid, S., Simontacchi, M., Bartoli, C.G., Puntarulo, S. (2006) Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species and chloroplastic lipids and proteins. *Plant Physiol.* **142**: 1246–1255

- Kharitonov, V.G., Sundquist, A.R., Sharma, V.S. (1994) Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solutions. *J. Biol. Chem.* **269**: 5881–5883.
- Klepper, L.A. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmos. Environ.* **13**: 537-542.
- Kolbert, Z., Bartha, B., Erdei, L. (2008) Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *J. Plant Physiol.* **165**: 967–975.
- Kozlov, A.V., Staniek, K., Nohl, H. (1999) Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* **454**: 127-130.
- 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.
- Lea, P.J. (1993) Nitrogen Metabolism. In: Lea PJ, Leegood RC (Eds.) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York, USA. Wiley. pp. 155-180.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D., Delledonne, M. (2009) NO signals in the haze: Nitric oxide signaling in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 451–458.
- Leshem, Y. Y., Wills, R. B. H., Ku, V. V. (1998) Evidence for the function of the free radical gas — nitric oxide (NO<sup>•</sup>) — as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **36**: 825–826.
- Lindermayr, C., Saalbach, G., Durner, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **137**: 921–930.
- Millar, A.H., Day, D.A. (1996) Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* **398**: 155–158.
- Millenaar, F.F., Lambers, H. (2003) The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. *Plant Biol.* **5**: 2–15
- 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* elicitor. *Plant Physiology* **130**: 1288–1297.

- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., 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.
- Moncada, S., Bolaños, J.P. (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J. Neurochem.* **97**: 1676-1689.
- Moreau, M., Lee, G.I., Wang, Y., Crane, B.R., Klessig, D.F. (2008) AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* GTPase and not a nitric-oxide synthase. *J. Biol. Chem.* **283**: 32957–32967.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J., Klessig, D.F. (2010) NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiol. Plant.* doi:10.1111/j.1399-3054.2009.01308.x
- Mur, L.A., Brown, I.R., Darby, R.M., Bestwick, C.S., Bi, Y.M., Mansfield, J.W., Draper, J. (2000) A loss of resistance to avirulent bacterial pathogens in tobacco is associated with the attenuation of a salicylic acid-potentiated oxidative burst. *Plant J.* **23**: 609–621.
- Mur, L.A., Carver, T.L., Prats, E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J. Exp. Bot.* **57**: 489-505.
- Murphy, M.P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**:401-414.
- Napoli, C., Ignarro, L.J. (2009) Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. *Arch. Pharm. Res.* **32**: 1103-1108.
- Navarre, D.A., Wendehenne, D., Durner, J., Noad, R., Klessig, D.F. (2000) Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. *Plant Physiol.* **122**: 573-582.
- Noritake, T., Kawakita, K., Doke, N. (1996) Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* **37**: 113-116.

- O'Donnell, V.B., Lewis, M.J., Crews, B.C., Marnett, L.J., Freeman, B.A. (2000) Catalytic consumption of nitric oxide by prostaglandin H synthase-1 regulates platelet function. *J. Biol. Chem.* **275**: 38239-38244.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**: 524-526.
- Palmieri, M.C., Sell, S., Huang, X., Scherf, M., Werner, T., Durner, J., Lindermayr, C. (2008) Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J. Exp. Bot.* **59**: 177-186.
- Parani, M.R., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W., Goldman, S.L. (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* **2**: 359–366.
- Perazzolli, M., Dominici, P., Romero-Puertas, M.C., Zago, E., Zeier, J., Sonoda, M., Lamb, C., Delledonne, M. (2004) *Arabidopsis* nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *Plant Cell* **16**: 2785-2794.
- Planchet, E., Gupta, K.J., Sonoda, M., Kaiser, W.M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J.* **41**: 732–743.
- Poderoso, J.J., Carreras, M.C., Lisdero, C., Riobó, N., Schöpfer, F., Boveris, A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.* **328**: 85–92.
- Poderoso, J.J., Lisdero, C., Schöpfer, F., Riobó, N., Carreras, M.C., Cadenas, E., Boveris, A. (1999) The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol, *J. Biol. Chem.* **274**: 37709–37716.
- Poderoso, J.J. (2009) The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **484**: 214-220.
- Qiao, W., Fan, L.M. (2008) Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J. Integr. Plant Biol.* **50**: 1238-1246.
- Rasmusson, A.G., Soole, K.L., Elthon, T.E. (2004) Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 23-39.

- Rockel, P., 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**: 103–110
- 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.
- Romero-Puertas, M.C., Laxa, M., Matte, A., Zaninotto, F., Finkemeier, I., Jones, A.M.E., Perazzolli, M., Vandelle, E., Dietz, K.J., Delledonne, M. (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**: 4120-4130.
- Rustérucci, C., Espunya, M.C., Díaz, M., Chabannes, M., Martínez, M.C. (2007) S-nitrosogluthathione reductase affords protection against pathogens in Arabidopsis, both locally and systemically. *Plant Physiol.* **143**: 1282-1292.
- 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.
- Salgado, I., Modolo, L.V., Augusto, O., Braga, M.R., Oliveira, H.C. (2006) Mitochondrial nitric oxide synthesis during plant-pathogen interactions: Role of nitrate reductase in providing substrates. In: Lamattina L, Polacco JC (Eds.) Nitric oxide in plant growth, development and stress physiology. Berlin, Germany. Springer-Verlag. pp. 239-254.
- Shi, F.M., Li, Y.Z. (2008) *Verticillium dahliae* toxins-induced nitric oxide production in *Arabidopsis* is major dependent on nitrate reductase. *BMB Rep.* **41**: 79–85
- Shi, S., Wang, G., Wang, Y., Zhang, L., Zhang, L. (2005) Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B radiation. *Nitric Oxide* **13**: 1-9.
- Simontacchi, M., Jasid, S., Puntarulo, S. (2004) Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci.* **167**: 839-847.
- Song, F., Goodman, R.M. (2001) Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of, salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **14**: 1458–1462.



- Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**: 1898-1902.
- Stohr, 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
- 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**: 151-155.
- Torres, J., Sharpe, M.A., Rosquist, A., Cooper, C.E., Wilson, M.T. (2000) Cytochrome *c* oxidase rapidly metabolises nitric oxide to nitrite. *FEBS Lett.* **475**: 263-266.
- Tun, N.N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E.I., Scherer, G.F. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Physiol.* **47**: 346-354.
- Tun, N.N., Livaja, M., Kieber, J.J., Scherer, G.F.E. (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytol.* **178**: 515-531.
- Wilson, I.D., Neill, S.J., Hancock, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ.* **31**: 622-631.
- Wulff, A., Oliveira, H.C., Saviani, E.E., Salgado, I. (2009) Nitrite reduction and superoxide-dependent nitric oxide degradation by *Arabidopsis* mitochondria: Influence of external NAD(P)H dehydrogenases and alternative oxidase in the control of nitric oxide levels. *Nitric Oxide* **21**: 132–139
- Yamamoto-Katou, A., Katou, S., Yoshioka, H., Doke, N., Kawakita, K. (2006) Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* **47**: 726-735.

- Yamasaki, H., Sakihama, Y., Takahashi, S. (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends Plant Sci.* **4**: 128-129.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **468**: 89–92
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y., Sakihama, Y. (2001) Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria, *Nitric Oxide* **5**: 261–270.
- Zeidler, D., Zahringer, 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. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 15811–15816.
- Zeier, J., Delledonne, M., Mishina, T., Severi, E., Sonoda, M., Lamb, C. (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol.* **136**: 2875-2886.
- Zhao, M.G., Chen, L., Zhang, L.L., Zhang, W.H. (2009) Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**: 755-767.
- Zottini, M., Formentin, E., Scattolin, M., Carimi, F., Lo Schiavo, F., Terzi, M. (2002) Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. *FEBS Lett.* **515**: 75-78.