

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Luzia Valentina Modolo**

**PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASE, NITRATO REDUTASE  
E UMA ATIVIDADE MITOCONDRIAL  
REDUTORA DE NITRITO NA RESPOSTA  
DE DEFESA DE *Arabidopsis thaliana*  
À *Pseudomonas syringae***

**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**



Data da Defesa: 16/12/2004

**Banca Examinadora**

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)

---

Assinatura

Profa. Dra. Márcia Regina Braga

---

Assinatura

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira

---

Assinatura

Prof. Dr. José Ronaldo de Magalhães

---

Assinatura

Prof. Dr. Marcos Antônio Machado

---

Assinatura

Profa. Dra. Selma Giorgio

---

Assinatura

Prof. Dr. Carlos Francisco Sampaio Bonafé

---

Assinatura

*“... O valor das coisas não está no tempo em que  
elas duram, mas na intensidade com que acontecem.  
Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas  
inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”*

Fernando Pessoa

Ao meu amado Ângelo,  
esta tese dedico

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Ione Salgado pela orientação, experiência científica e seriedade. Obrigada pela oportunidade e, acima de tudo, por acreditar na minha capacidade.

À Profa. Dra. Ohara Augusto (Depto. de Bioquímica, IQ, USP, São Paulo, SP) pela orientação nas análises por EPR, bem como discussão destes resultados.

Ao Prof. Dr. José R. Magalhães (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Juiz de Fora, MG) pelo fornecimento das sementes de *A. thaliana* mutante deficiente para NR e pelas discussões e sugestões junto à versão escrita desta tese.

Aos Profs. Dr. Celso E. Benedetti (Lab. Nacional de Luz Sincrotron, Campinas, SP) pelo fornecimento de sementes de *A. thaliana* Col-0 selvagem e Dr. Júlio Rodrigues Neto (Lab. de Bacteriologia, Instituto Biológico, Campinas, SP) pelo fornecimento da bactéria *P. syringae* pv. *maculicola*.

À Profa. Dra. Cláudia R. B. Haddad (Depto. de Fisiologia Vegetal, IB, UNICAMP, SP) por ceder um espaço na casa de vegetação para o cultivo das plantas de *A. thaliana*.

Aos Profs. Dra. Carmen V. Ferreira (Depto. de Bioquímica, IB, UNICAMP, SP), Dra. Cecília A. F. P. Maglio (Instituto Agronômico de Campinas, SP), Dra. Márcia R. Braga (Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, Instituto de Botânica, São Paulo, SP), Dra. Selma Giorgio (Depto. de Parasitologia, IB, UNICAMP, SP) e Dr. Marcos A. Machado (Centro de Citricultura “Sylvio Moreira”, Cordeirópolis, SP) pelas discussões e sugestões junto à versão escrita desta tese.

À FAPESP pela concessão da bolsa de doutoramento.

À Profa. Irene M. G. Almeida (Lab. de Bacteriologia, Instituto Biológico, Campinas, SP), Bióloga Jusceley F. P. de Oliveira (Depto Bioquímica, IB, UNICAMP, Campinas, SP) e Dra. Edlaine Linares (Depto. Bioquímica, IQ, USP, São Paulo, SP) pelo auxílio no cultivo da bactéria e testes relacionados, na coleta de material vegetal e no treinamento no aparelho de ressonância paramagnética eletrônica, respectivamente.

Ao meu marido, Ângelo, pela discussão dos resultados e importante apoio nos momentos de estresse. Divido esta tese com você.

Aos meus familiares, em especial ao primeiro amor da minha vida, minha mãe Alzerina, pelo incentivo desde o início da minha carreira acadêmica. Irmãos do coração, obrigada pelos telefonemas carinhosos.

À todos os atuais e ex-membros do laboratório de Bioquímica de Plantas (Lab. 05) pelos momentos de descontração e lazer extra-universidade. Elzira, Juliana e Jusceley: vou sentir saudades dos nossos momentos de feirinha, de sorvete La Basque e tapioca da barraquinha próxima a Fiscop, sem esquecer das conversas nostálgicas.

À todos os membros dos laboratórios de Bacteriologia (Instituto Biológico em Campinas) e de Bioquímica de Radicais Livres e EPR (USP) pelas agradáveis conversas em raras ocasiões devido à minha correria. Edlaine: obrigada pela companhia nas minhas refeições na USP.

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

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

## ÍNDICE

Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xii
Abstract.....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	8
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Material vegetal.....	9
3.2. Cultura bacteriana.....	10
3.3. Inoculação de plantas com <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i> (Psm)....	11
3.4. Testes para a confirmação da espécie e do patovar da cultura bacteriana....	11
3.4.1. Teste LOPAT.....	11
3.4.2. Testes bioquímicos e de patogenicidade.....	13
3.5. Medida da atividade NOS.....	16
3.6. Medida da atividade nitrato redutase (NR).....	17
3.7. Medida da produção de $\bullet$ NO pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	18
3.8. Determinação de proteínas totais.....	19
3.9. Visualização de células mortas em <i>A. thaliana</i> inoculada com <i>P. syringae</i> ....	20
3.10. Visualização <i>in situ</i> da produção de $\bullet$ NO.....	20
4. Resultados.....	22
4.1. Medida da atividade NOS.....	22

4.2. Medida da atividade nitrato redutase (NR).....	25
4.3. Produção de $^*NO$ monitorada por EPR.....	29
4.4. Fontes potenciais de $^*NO$ detectável por EPR.....	34
4.5. Produção de $^*NO$ detectada com DAF-2DA.....	50
4.6. Influência da enzima NR sobre a morte celular em <i>A. thaliana</i> durante sua interação com <i>P. syringae</i> .....	54
4.7. Identificação da cultura bacteriana.....	59
5. Discussão.....	66
6. Referências bibliográficas.....	76
7. Apêndice.....	90
Lista de figuras e tabelas.....	95
Lista de publicações.....	98
<i>Curriculum Vitae</i> .....	102

## ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
Anti-A	Antimicina A
AOX	Oxidase alternativa
AtNOS1	Óxido nítrico sintase isolada de <i>A. thaliana</i>
BSA	Albumina de soro bovino
CaM	Calmodulina
DAF-2	4,5 Diaminofluoresceína
DAF-2DA	4,5 Diaminofluoresceína diacetato
DAF-2T	Triazolofluoresceína
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis( $\beta$ -aminoetil éter)- <i>N,N,N,N</i> -tetracético
EPM	Erro padrão da média
EPR	Ressonância paramagnética eletrônica
FAD	Flavina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
H <sub>4</sub> B	Tetrahidrobiopterina
HEPES	Ácido <i>N</i> -2-hidroxietil piperazina- <i>N</i> -2-etanossulfônico
(MGD) <sub>2</sub> Fe(II)	Complexo <i>N</i> -metil-D-glucamina ditiocarbamato de ferro (II)
MOPS	Ácido 3-( <i>N</i> -morfolino) propanossulfônico

NA	Nutriente ágar
LOPAT	Testes Levano, Oxidase, Podridão da batata, Arginina dihidrolase, HR de Tabaco, utilizados para determinação de espécies bacterianas
L-NAME	$N^G$ -Nitro-L-arginina éster de metila
L-NIL	L- $N^6$ -(1-iminoetil) lisina
L-NIO	L- $N^5$ -(1-iminoetil) ornitina
$\beta$ -NADH	$\beta$ -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo (forma reduzida)
$\beta$ -NADPH	$\beta$ -Nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
$\bullet$ NO	Óxido nítrico
$\bullet$ NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
NI-NOR	Enzima ligada á membrana plasmática de células de raízes, capaz de converter nitrito em $\bullet$ NO
NiR	Nitrito redutase
NR	Nitrato redutase
$\bullet$ OH	Radical hidroxil
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
PAL	Fenilalanina amônia liase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilssulfonila
Psm	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>maculicola</i>

PVPP	Polivinilpolipirrolidona
RH	Resposta de hipersensibilidade
SHAM	Ácido salicilhidroxâmico
SOD	Superóxido dismutase
TMV	Vírus do mosaico do fumo
Tris-HCl	Tris-(hidroximetil) aminometano
XO	Xantina oxidase

## RESUMO

A origem do óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) em plantas tem sido controversa e uma enzima do tipo óxido nítrico sintase (NOS), bem como nitrato redutase (NR) são consideradas possíveis fontes deste radical livre. Contudo, ainda não há nenhuma evidência direta da formação de  $\bullet\text{NO}$  a partir da NR durante interações planta-patógeno. Nos estudos aqui descritos foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* deficientes na enzima NR para investigar o mecanismo de produção de  $\bullet\text{NO}$  em resposta à inoculação da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm). Aumento na síntese de L-citrulina a partir de L-arginina foi observado em homogenatos de folhas de plantas do tipo selvagem e daquelas deficientes na síntese de NR, após inoculação com Psm. Experimentos de ressonância paramagnética eletrônica, contudo, mostraram uma produção muito maior de  $\bullet\text{NO}$  dependente de  $\text{NO}_2^-$ , mas não de L-arginina ou  $\text{NO}_3^-$ , síntese esta inibida por alta concentração de L-arginina. A inibição da cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria aboliu ou inibiu parcialmente esta atividade em plantas mutantes ou selvagens, respectivamente. A utilização do marcador fluorescente 4,5 diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) mostrou que a inoculação com Psm aumentou substancialmente a produção de  $\bullet\text{NO}$  *in situ* em plantas selvagens, mas não em mutantes deficientes na síntese de NR. No entanto, a infiltração de L-arginina ou  $\text{NO}_2^-$  causou uma produção de  $\bullet\text{NO}$  *in vivo* nas plantas mutantes. Plantas de *A. thaliana* deficientes na síntese de NR mostraram suscetibilidade à *P. syringae* que foi prevenida pela co-infiltração de  $\text{NO}_2^-$ . O conjunto de resultados sugere que NOS, NR e uma importante atividade mitocondrial de redução de  $\text{NO}_2^-$  podem cooperar para produzir

\*NO em quantidade suficiente para prevenir a disseminação de Psm em plantas de *A. thaliana*.

## ABSTRACT

The origin of nitric oxide ( $\bullet\text{NO}$ ) in plants has been controversial and nitric oxide synthase (NOS)-like enzyme and nitrate reductase (NR) are claimed as potential sources. However, there is still no direct evidence for  $\bullet\text{NO}$  formation from NR during plant-pathogen interactions. Here, we used NR-defective double mutants of *Arabidopsis thaliana* to investigate the mechanism of  $\bullet\text{NO}$  production following infection by an avirulent strain of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm). Increased formation of L-citrulline from L-arginine was observed in leaf homogenates of both wild-type and *nia1 nia2* mutant plants. Electron paramagnetic resonance experiments, however, showed a much higher  $\bullet\text{NO}$  production that was dependent on  $\text{NO}_2^-$  rather than on L-arginine or  $\text{NO}_3^-$  and was also inhibited at high L-arginine concentrations. Inhibition of mitochondrial electron transport abolished and inhibited partially this activity in *nia1 nia2* mutants and wild-types, respectively. *In situ*  $\bullet\text{NO}$  production was substantially increased in wild type-plants but not in mutants, following Psm challenge, as measured with the fluorescent probe 4,5-diaminofluorescein diacetate. However, *in vivo*  $\bullet\text{NO}$  production in NR-deficient mutants was visualized only after L-arginine or  $\text{NO}_2^-$  infiltration into the leaves. *A. thaliana* plants defective in NR showed susceptibility to *P. syringae* that was prevented by infiltration of  $\text{NO}_2^-$ . The overall results suggest that NOS, NR, and an important mitochondrial-dependent nitrite-reducing activity cooperate to produce  $\bullet\text{NO}$  in amounts enough to prevent Psm dissemination in *A. thaliana* plants.

## 1. INTRODUÇÃO

O radical óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) vem emergindo como uma molécula sinalizadora fundamental no reino vegetal assim como o é em mamíferos. Este radical tem-se revelado uma molécula capaz de influenciar vários processos em vegetais como crescimento de raízes (Gouvêa et al., 1997), germinação de sementes (Grubisic e Konjevic, 1992; Keeley e Fortheringham, 1997), fotomorfogênese (Pagnussat et al., 2003), lignificação de parede celular (Ferrer and Ros Barceló, 1999), senescência (Leshem e Hamaraty, 1996; Leshem et al., 1998; Magalhaes et al., 2000; Corpas et al., 2004), movimento de estômatos (Neill et al., 2002; Desikan et al., 2002; Garcia-Mata et al., 2003; Sakihama et al., 2003), via de sinalização por citocinas (Scherer e Holk, 2000; Tun et al., 2001), aumento da disponibilidade de ferro (Graziano et al., 2002), acúmulo de ferritina mediado por ferro (Murgia et al., 2002), morte celular (Pedroso et al., 2000; Saviani et al., 2002), funcionalidade mitocondrial (Saviani et al., 2002; Zottini et al., 2002) e de cloroplastos (Takahashi e Yamasaki, 2002) e sinalização durante injúria (Orozco-Cárdenas e Ryan, 2002; Huang et al., 2004), entre outros.

Além da sua influência sobre a regulação de diversos processos, o  $\bullet\text{NO}$  também atua como um componente importante na resposta de defesa de plantas ao ataque de patógenos (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; McDowell e Dangl, 2000; Wendehenne et al., 2001). Muitas aproximações experimentais sugerem que uma enzima do tipo óxido nítrico sintase (NOS) de mamíferos esteja envolvida na síntese de  $\bullet\text{NO}$  durante a resposta de defesa de plantas, a citar: determinação da produção de L-citrulina a partir de L-arginina marcada com radioisótopos ( $^{14}\text{C}$  ou  $^3\text{H}$ ) avaliando a

dependência de cofatores para a NOS de origem animal e avaliação de reação imunológica com anticorpos contra NOS de mamíferos (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Huang e Knopp, 1998; Modolo et al., 2002). Porém, análise proteômica de eixos embrionários de milho revelou que vinte proteínas foram imunorreativas para anticorpos contra NOS de mamíferos. Quinze delas foram identificadas, não sendo relacionadas ao metabolismo do  $\text{NO}$ . As cinco proteínas restantes, embora não identificadas, apresentam seqüência de aminoácidos com praticamente nenhuma região homóloga às proteínas NOS de origem animal (Butt et al., 2003).

Durante uma interação incompatível, vários mecanismos de defesa são ativados nas plantas com o objetivo de conter a disseminação microbiana. Estas respostas incluem o aumento da expressão de vários genes de defesa, como aquele para fenilalanina amônia liase (PAL), primeira enzima da via dos fenilpropanóides que leva à síntese de fitoalexinas (Lamb e Dixon, 1997). Níveis aumentados de transcritos que codificam a enzima PAL e outras proteínas relacionadas à defesa e o acúmulo de fitoalexinas durante a interação planta-patógeno são relatados na literatura (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998). Tratamento de células vegetais com doadores de  $\text{NO}$ , eliciadores de patógenos ou ainda infiltração de enzima NOS de mamíferos em plantas já mostraram desencadear tais respostas de defesa em tecidos vegetais (Noritake et al., 1996; Durner et al., 1998; Foissner et al., 2000; Klessig et al., 2000; Modolo et al., 2002; Hu et al., 2003; Lamotte et al., 2004).

Recentemente, nosso grupo mostrou que a eliciação de cotilédones de soja com oligossacarídeos de parede celular do fungo *Diaporthe phaseolorum meridionalis*, agente causador da doença cancro da haste em soja, induziu a produção de

fitoalexinas via ativação de uma enzima do tipo NOS dependente de cálcio (Modolo et al., 2002). A atividade máxima da enzima precedeu o acúmulo das substâncias antimicrobianas e inibidores da NOS de mamíferos comprometeram a resposta dos cotilédones. Estes resultados sugeriram que uma enzima com atividade conversora de L-arginina em L-citrulina é ativada durante a interação soja-*D. phaseolorum*, ocasionando um aumento na produção de  $\bullet\text{NO}$  que sinaliza a ativação da enzima PAL. Assim, estes resultados, juntamente com aqueles obtidos por outros grupos a partir do estudo da interação planta-patógeno (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998), apontam o  $\bullet\text{NO}$  como uma importante molécula ativadora da via dos fenilpropanóides para a produção de compostos antimicrobianos.

Igualmente relevante, o  $\bullet\text{NO}$  apresenta importante papel como sinal-chave no desenvolvimento da resposta de hipersensibilidade (RH) em plantas durante uma interação incompatível. A RH consiste na morte celular localizada, desenvolvida no tecido da planta para prevenir a proliferação do patógeno a partir do sítio de infecção (Dangl et al., 1996; Lamb and Dixon, 1997; Lam et al., 2001). Em adição, produção aumentada de espécies reativas de oxigênio como ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxil ( $\bullet\text{OH}$ ), entre outras, parece preceder a RH. Um efeito sinérgico entre o  $\bullet\text{NO}$  e tais espécies mostrou potencializar a RH em vegetais (Delledonne et al., 2001; Romero-Puertas e Delledonne, 2003). No entanto, Clarke e colaboradores (2000) mostraram que apenas o  $\bullet\text{NO}$  é capaz de induzir morte em células de *A. thaliana* em cultura em uma maneira similar à observada à tentativa de infecção destas células com uma bactéria avirulenta.

Apesar do  $\bullet\text{NO}$  ter se mostrado polivalente no controle e indução de muitos

processos que ocorrem em plantas, o mecanismo molecular responsável por sua síntese ainda é controverso.

Em células animais, a família de enzimas óxido nítrico sintases (NOS, EC 1.14.13.39) é a principal fonte de produção de  $\bullet\text{NO}$  catalisando a oxidação de L-arginina em L-citrulina (Tayeh e Marletta, 1989). Esta reação requer  $\text{O}_2$  e NADPH como co-substratos e grupo heme ligado à enzima, tetrahydrobiopterina ( $\text{H}_4\text{B}$ ), calmodulina, FAD e FMN como cofatores (Stuehr, 1997). A análise de vários tecidos vegetais demonstrou que estes são capazes de produzir L-citrulina a partir de L-arginina em um processo que é dependente dos cofatores para a NOS de mamíferos e sensível a análogos da L-arginina (Sen e Cheema, 1995; Cueto et al., 1996; Ninnemann e Maier, 1996; Delledonne et al., 1998; Durner et al. 1998; Barroso et al. 1999; Ribeiro et al. 1999; Modolo et al. 2002).

Embora muitos trabalhos apontem a ocorrência de uma enzima do tipo NOS em plantas, mecanismos adicionais para a produção enzimática de  $\bullet\text{NO}$  são propostos, dentre eles: atividade de nitrato redutase (NR) (Magalhaes et al., 2000; Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002; Lea et al., 2004; Vanin et al., 2004), xantina oxidase (XO) (Godber et al., 2000; Sauer and Frébort, 2003; Li et al., 2004), uma atividade produtora de  $\bullet\text{NO}$  associada à membrana plasmática (NI-NOR) (Sthör et al., 2001), citocromo P-450 (Boucher et al., 1992; Morant et al. 2003) e nitrito redutase (NiR) (Kuznetsova et al., 2004). Ainda, mecanismos não-enzimáticos de produção de  $\bullet\text{NO}$  também podem ocorrer em plantas. Cooney e colaboradores (1994) reportaram que dióxido de nitrogênio ( $\bullet\text{NO}_2$ ) pode gerar  $\bullet\text{NO}$  na presença de carotenóides, num processo mediado pela luz. Além disso, formação de  $\bullet\text{NO}$  pode ocorrer a partir da

redução de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) ou nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), na presença de ascorbato (Klepper, 1990). De fato, camadas de aleurona de cevada consumiram  $\text{NO}_2^-$  para a formação de  $\bullet\text{NO}$  a partir de condições de acidez do espaço apoplástico (Bethke et al., 2004).

Mesmo que vários resultados bioquímicos e imunológicos indiquem a existência de uma enzima do tipo NOS em plantas, o gene ou uma proteína homóloga à NOS de mamíferos ainda não foi encontrado em geral, ou particularmente em *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Uma proteína com atividade NOS foi isolada a partir de folhas de fumo infectadas com o vírus do mosaico do fumo (TMV) (Chandok et al., 2003). A atividade desta enzima mostrou ser dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e esta proteína apresentou várias propriedades bioquímicas características da NOS de mamíferos. De início, a análise molecular da proteína purificada revelou que esta é uma variante da proteína P do complexo glicina descarboxilase não apresentando homologia com a NOS de mamíferos. Apesar de ser dependente de cálcio, a enzima isolada foi denominada NOS induzida (iNOS) por estar presente praticamente apenas em folhas de fumo infectadas com o vírus TMV. No entanto, recentemente, este mesmo grupo de pesquisa publicou uma retratação informando que esta caracterização deve ser desconsiderada, pois os dados não são reprodutíveis (Klessig et al., 2004). Assim, a identidade desta enzima cuja atividade conversora de L-arginina em L-citrulina é aumentada em plantas de fumo sob infecção viral permanece desconhecida.

Adicionalmente, Guo et al. (2003) identificaram um gene de *A. thaliana* (*AtNOS1*) que codifica uma proteína com atividade conversora de L-arginina em L-citrulina e  $\bullet\text{NO}$ . *AtNOS1* é uma proteína homóloga àquela responsável pela síntese de  $\bullet\text{NO}$  em *Helix pomatia* (Huang et al., 1997). Uma linhagem mutante isogênica deficiente para este

gene foi isolada e apresentou considerável redução da produção de  $\text{NO}^*$  (Guo et al., 2003). Aumento da produção deste radical foi observado em plantas selvagens tratadas com ácido abscísico (ABA), mas não naquelas mutantes deficientes no gene *AtNOS1*, sugerindo o envolvimento desta enzima na via de sinalização hormonal por ABA. A atividade de AtNOS1 foi sensível a L-NAME, um inibidor da NOS de mamíferos, e apresentou dependência de NADPH, calmodulina e cálcio (Guo et al., 2003). No entanto, tetrahidrobiopterina, FAD, FMN ou heme não estimularam a atividade de AtNOS1, o que mostra que esta enzima apresenta apenas algumas das propriedades descritas para a NOS de animal. Recentemente, He et al. (2004) mostraram que plantas de *A. thaliana* deficientes na síntese de AtNOS1 florescem prematuramente quando comparadas às plantas selvagens ou àquelas mutantes que produzem  $\text{NO}^*$  em quantidades aumentadas. Inicialmente esta enzima foi apontada como uma fonte de  $\text{NO}^*$  durante a via de sinalização por ABA. Recentemente, Zeidler et al. (2004) demonstraram a ocorrência de ativação da AtNOS1 em folhas de *A. thaliana* eliciadas com lipopolissacarídeos de diferentes bactérias Gram-negativas. A ativação de AtNOS1 provocou um aumento na síntese de  $\text{NO}^*$  que por sua vez mediou a ativação da expressão de vários genes relacionados à defesa conferindo imunidade inata às plantas de *A. thaliana*. O silenciamento do gene *AtNOS1* causou uma dramática suscetibilidade das plantas ao patógeno avirulento *P. syringae* pv. *tomato* por prevenir a indução de genes de defesa tanto local quanto sistemicamente.

Neste contexto, torna-se claro que as rotas para a produção de  $\text{NO}^*$  em plantas necessitam ainda ser estabelecidas. Em função de todas as evidências relatadas na literatura, uma análise da contribuição das enzimas óxido nítrico sintase e nitrato

redutase no processo de síntese de  $\cdot\text{NO}$  em *Arabidopsis thaliana* foi realizada com o objetivo de esclarecer o mecanismo pelo qual este radical é gerado nas plantas durante sua interação com a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*.

## 2. OBJETIVOS

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de identificar a principal fonte de  $\bullet\text{NO}$  na resposta de defesa de *Arabidopsis thaliana* na presença da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* procurando também diferenciar a produção deste radical via atividade Óxido Nítrico Sintase (NOS) daquela resultante da enzima Nitrato Redutase (NR). Para atingir tais objetivos, as seguintes metas foram propostas:

1. Determinar as atividades NOS e NR em folhas de *A. thaliana* Columbia-0 inoculadas com *P. syringae* comparando estes resultados com aqueles obtidos para plantas saudáveis, bem como para plantas mutantes isogênicas *nia1 nia2* que apresentam deficiência na síntese da enzima NR;
2. Avaliar o efeito da luz sobre a atividade NOS em plantas do tipo selvagem e naquelas mutantes deficientes para NR uma vez que a luz fortemente controla a atividade da enzima NR;
3. Realizar análises de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) utilizando substratos marcados com  $^{15}\text{N}$  para determinar a principal fonte de  $\bullet\text{NO}$  em *A. thaliana* durante sua resposta de defesa à *P. syringae*;
4. Determinar, *in situ*, a produção de  $\bullet\text{NO}$  em folhas de *A. thaliana* de ambos os genótipos comparando as plantas inoculadas com as plantas-controle;
5. Determinar a capacidade de resposta de plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem e aquelas mutantes deficientes na síntese de NR à tentativa de infecção por *P. syringae* avaliando a evolução da morte celular nos tecidos vegetais.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal

Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia-0, expressando o gene *RPM1* que confere resistência à bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* e plantas da mesma linhagem, mutantes para o genes *NIA1* *NIA2*, sendo deficientes na síntese da enzima nitrato redutase (NR).

Sementes de *Arabidopsis thaliana* foram embebidas em H<sub>2</sub>O deionizada durante 15 min seguido da desinfecção com uma solução de hipoclorito de sódio 0,25%. Decorridos 8 min as sementes foram submetidas a oito lavagens seqüenciais com H<sub>2</sub>O deionizada estéril e plantadas diretamente em vasos contendo vermiculita/perlita (1:1). Para o cultivo das plantas do tipo selvagem foi empregado o meio de Murashige e Skoog (1962), utilizando os compostos à metade dos valores de concentração indicados, sendo glicose e glicina, ausentes. Para o cultivo das plantas mutantes foi utilizado o meio descrito por Wilkinson e Crawford (1991) que contém amônia como principal fonte de nitrogênio. As plantas foram cultivadas em câmaras de crescimento sob umidade relativa de 100%, 24 °C e fotoperíodo de 12 h. Folhas de plantas de 30-40 dias de idade foram utilizadas nos experimentos de medida de atividade enzimática, produção de •NO por Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), ensaios de morte celular bem como ensaios de visualização *in situ* da produção de •NO.

### 3.2. Cultura bacteriana

Cultura liofilizada de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm) (IBSBF-1115), bactéria isolada de *Brassica napus* var. *oleifera* (canola) em 1994 (Brasil) por I.M.G. Almeida, foi re-hidratada por um período de 1 h com 5 a 6 gotas de H<sub>2</sub>O destilada estéril. A reativação do isolado bacteriano e manutenção da cultura foram realizados em meio nutriente ágar (NA; pH 7,0) contendo peptona 5 g/L, extrato de carne 3 g/L, NaCl 5 g/L e ágar 17 g/L (Levine, 1954) com incubação a 28 °C por 48 horas.

Padronização da concentração bacteriana de inóculo foi realizada através da técnica de contagem em placa (Klement et al., 1990). Tomando-se como base o tubo 3 x 10<sup>-8</sup> da escala de McFarland (McFarland, 1907) cuja turbidez decorrente da presença de BaSO<sub>4</sub> se aproxima grosseiramente daquela observada para suspensões bacterianas, foi preparada uma suspensão aquosa de Psm crescida em meio NA a 28 °C durante 48 h. Diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) a partir da suspensão original foram realizadas e alíquotas de 100 µL das últimas diluições (10<sup>-4</sup> a 10<sup>-7</sup>) foram plaqueadas em meio NA (quadruplicata). As placas foram incubadas a 28 °C e, após 48 horas, a concentração bacteriana foi estimada por contagem do número de colônias desenvolvidas (UFC) e por medida da transmitância da suspensão original a 530 nm (UFC/mL = número de colônias x diluição da amostra x 10).

### **3.3. Inoculação de plantas com *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (Psm)**

Suspensão aquosa de Psm ( $\sim 10^8$  UFC/mL) foi utilizada na inoculação de folhas de *Arabidopsis thaliana*. O método de inoculação empregado foi por aspersão sobre a região abaxial das folhas, exceto nos experimentos para a determinação de morte celular onde cada folha das plantas foi infiltrada com 100  $\mu$ L de suspensão de Psm ou solução-teste, utilizando-se uma seringa de insulina. Doze horas antes da inoculação, os vasos contendo as plantas foram individualmente acondicionados em câmara úmida de forma a promover a abertura dos estômatos e assim facilitar a penetração do patógeno.

### **3.4. Testes para a confirmação da espécie e do patovar da cultura bacteriana**

#### **3.4.1. Teste LOPAT**

Os testes LOPAT (Levano, Oxidase, Podridão da batata, Arginina dihidrolase e Reação de hipersensibilidade em folhas de Tabaco) foram realizados para identificar a espécie da cultura bacteriana empregada nos experimentos.

**A) Produção de levano** - O isolado bacteriano foi cultivado por 4 dias a 28 °C em meio NA contendo sacarose 5%, após o que, a morfologia das colônias desenvolvidas foi analisada.

**B) Teste da oxidase** - Com uma alça de platina, uma colônia bacteriana foi espelhada em papel Whatman n. 1 embebido com uma solução de dicloreto de tetrametil-*p*-fenilenediamina 1% (Kovacs, 1956) para a observação de alteração instantânea na coloração do reagente.

**C) Teste de podridão em batata** - Fatias transversas de tubérculo de batata, previamente lavado e flambado com etanol, foram inoculadas com a bactéria-teste e incubadas por 48 horas a 28 °C e umidade relativa de 100% (Lelliott et al., 1966). Após este período foi avaliado o aspecto do tecido que ficou em contato com a bactéria.

**D) Teste de atividade arginina dihidrolase** - Com uma alça de platina, uma colônia bacteriana foi transferida para um tubo de ensaio contendo meio 2A de Thornley (peptona 1 g/L; NaCl 5 g/L; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,3 g/L; vermelho de fenol 0,01 g/L; L-arginina 10 g/L; ágar 3 g/L). Para restringir o oxigênio do sistema, pequeno volume de glicerol foi adicionado sobre o meio e o tubo de ensaio incubado por 4 dias a 28 °C para a observação de alteração de coloração do meio (Thornley, 1960).

**E) Reação de hipersensibilidade em folhas de fumo** - Folhas de fumo foram inoculadas com suspensão aquosa da cultura bacteriana, utilizando o método por infiltração descrito por Klement (1963). A cada 12 horas, por um período de 2 dias, foi analisado o aparecimento de lesões necróticas nas folhas com o auxílio de uma lupa.

### 3.4.2. Testes bioquímicos e de patogenicidade

Os testes bioquímicos foram conduzidos com a finalidade de identificar o patovar de *P. syringae*. Tais testes foram realizados, como descrito a seguir, utilizando suspensão aquosa ou colônias da bactéria crescida em meio NA.

**A) Produção de pigmento fluorescente** - Suspensão aquosa bacteriana foi plaqueada em meio B de King (King et al., 1954) contendo protease peptona 20 g/L, glicerol 10 g/L,  $K_2HPO_4$  1,5 g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1,5 g/L e ágar 17 g/L. Após 48 horas de incubação a 28 °C, as colônias desenvolvidas foram observadas à luz UV para a verificação da produção de pigmentos fluorescentes como piocianina e fluoresceína.

**B) Atividade catalase** - Com uma alça de platina, uma colônia de bactéria foi espalhada em superfície contendo  $H_2O_2$  3% (v/v) e a formação de bolhas, decorrentes da liberação de  $O_2$ , foi avaliada (Lelliot et al., 1966).

**C) Produção de 2-cetogluconato** - Suspensão aquosa bacteriana (2 gotas) foi introduzida em meio a pH 7,0 contendo triptona 1,5 g/L, extrato de levedura 1 g/L,  $K_2HPO_4$  1 g/L e gluconato de sódio 40 g/L. Após 5 dias, igual volume de reagente de Benedict foi adicionado e o sistema foi aquecido em banho por 10 min para a observação de alteração de coloração do meio (Lelliott e Stead, 1987).

**D) Hidrólise de macromoléculas (gelatina e aesculina)** - Suspensão aquosa bacteriana (2 gotas) foi introduzida em meio a pH 7,0 contendo extrato de levedura 3 g/L, peptona 5 g/L e gelatina 120 g/L. Após 21 dias de incubação a 28 °C, o tubo de ensaio foi resfriado a 5 °C, por aproximadamente 30 minutos, e a ocorrência de hidrólise de gelatina foi avaliada através da liquefação do meio de cultura (Lelliott e Stead, 1987). Para o teste de hidrólise de aesculina, suspensão aquosa bacteriana (2 gotas) foi introduzida em um tubo de ensaio contendo peptona oxid L37 10 g/L, aesculina 1 g/L, citrato férrico 0,5 g/L e ágar 12 g/L. Alteração na fluorescência do meio decorrente da presença de aesculina foi monitorada, sob lâmpada de UV, após 21 dias de incubação a 28 °C (Lelliott e Stead, 1987).

**F) Redução de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ )** - Suspensão aquosa bacteriana (2 gotas) foi introduzida em um meio contendo  $\text{KNO}_3$  1 g/L, peptona 5 g/L e extrato de levedura 3 g/L. Após 10 dias de incubação a 28 °C, igual volume de reagente de Follet e Ratcliff (ácido acético 10%; ácido sulfanílico 0,13 g/L;  $\alpha$ -naftol 0,1 g/L;  $\text{NH}_4\text{OH}$  2%) foi adicionado e a ocorrência de alteração de coloração do meio (amarela para marrom-avermelhada) foi avaliada (Stanier et al., 1966).

**G) Utilização de carboidratos** - Suspensão aquosa bacteriana (2 gotas) foi introduzida em tubos de ensaio contendo meio-base de Ayers e colaboradores (1919) (pH 7,0;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1 g/L, KCl 0,2 g/L e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/L) adicionado do indicador púrpura de bromocresol (0,016 g/L) e diferentes carboidratos (individualmente) à concentração final de 1% (m/v) [adonitol, D (-) arabinose, L (+) arabinose, D (+) celobiose, eritritol, D-

frutose, glicerol, mio-inositol, inulina, lactose, D (+) maltose, D (-) manitol, D (-) salicina, sacarose, D (-) sorbitol, D (+) trealose]. Os tubos foram incubados a 28 °C e alteração da coloração do meio (púrpura para amarela) decorrente da oxidação de cada carboidrato ao seu respectivo ácido foi acompanhada por 21 dias.

**H) Utilização de ácidos orgânicos** - Suspensão aquosa bacteriana (2 gotas) foi introduzida em tubos de ensaio contendo meio-base de Ayers e colaboradores (1919) (pH 7,0;  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  1 g/L, KCl 0,2 g/L e  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/L) adicionado do indicador azul de bromotimol (0,016 g/L) e diferentes ácidos orgânicos, individualmente, à concentração final de 0,4% (m/v) [benzoato, betaína, citrato, gluconato, glutarato, DL-lactato, malonato, oxalato, succinato, D (-) tartarato L (+) tartarato]. Os tubos foram incubados a 28 °C e alteração da coloração do meio (amarela para azul) decorrente da redução da acidez do meio foi acompanhada por 21 dias.

O teste de patogenicidade foi realizado em folhas de couve. Uma suspensão aquosa da cultura bacteriana foi inoculada nas folhas pelo método de aspersão. A planta foi acondicionada em estufa sob umidade relativa de 100% e observada por um período de 30 dias para a verificação de aparecimento de sintomas da doença.

### 3.5. Medida da atividade NOS

Atividade NOS em folhas de *Arabidopsis thaliana* foi determinada pelo método da L-citrulina, de acordo com Modolo e colaboradores (2002). Folhas inoculadas com Psm e folhas-controle (0,3 mg) foram homogeneizadas em 1,0 mL de tampão de extração a 4 °C (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4; sacarose 320 mM; leupeptina 10 µg/mL; inibidor de tripsina de soja 10 µg/mL; aprotinina 2 µg/mL; PMSF 1 mM; DTT 10 mM; glutatona reduzida 10 mM) e PVPP (50 mg/g de tecido), utilizando sistema de dispersão e mistura Polytron Kinematica AG. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 10 min a 4 °C. A quarenta microlitros do sobrenadante resultante foram adicionados 100 µL de tampão de ensaio [HEPES 40 mM, pH 7,2; FAD 10 µM; FMN 10 µM; DTT 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 1,25 mM; H<sub>4</sub>B 50 µM; CaM 10 µg/mL; β-NADPH 1 mM e L-[U-<sup>14</sup>C] arginina 0,5 µCi/mL] acrescido de L-arginina não radioativa (100 µM). Seguindo incubação por 30 minutos à temperatura ambiente, a reação foi paralisada pela adição de 1 mL de suspensão de Dowex-Ag50W (200-400, 8% carregada com Na<sup>+</sup>) em tampão HEPES 100 mM/EDTA 10 mM, pH 5,5 (1:1,5 v/v). Por ser uma resina de troca catiônica, o Dowex adsorve a L-[U-<sup>14</sup>C] arginina remanescente no sistema o que permite a determinação da radioatividade oriunda apenas de moléculas de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina formadas. A resina foi removida centrifugando o sistema a 10.000 x g por 10 min a 18 °C. Foram adicionados 3 mL de líquido de cintilação a 400 µL do sobrenadante resultante e a amostra foi analisada em contador de cintilação (Beckman LS 6000).

A atividade NOS nas amostras foi determinada pela conversão de L-[U-<sup>14</sup>C] arginina a L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina. Foi considerada atividade NOS a diferença entre a produção de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina na ausência e na presença de L-N<sup>6</sup>-(1-iminoetil) lisina (L-NIL; 3 mM), conhecido inibidor da NOS de mamíferos. A dependência de Ca<sup>2+</sup> foi determinada a partir da diferença entre a produção de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina na ausência e na presença de EGTA 2 mM, um agente quelante específico para este cátion.

### **3.6. Medida da atividade nitrato redutase (NR)**

Atividade NR em folhas de *Arabidopsis thaliana* foi determinada de acordo com Su e colaboradores (1996), com algumas modificações. Folhas inoculadas com Psm e folhas-controle (0,2 a 0,3 g) foram extraídas em 1 mL de tampão de extração a 4 °C (MOPS 50 mM pH 7,4; EDTA 1 mM; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 1 μM; FAD 5 μM, DTT 5 μM, Triton X-100 0,1% e PMSF 2 μg/mL). As amostras foram maceradas em cadinhos de porcelana, contendo nitrogênio líquido e PVPP (50 mg/g de tecido) até total pulverização. O homogenato foi centrifugado a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C. Ao sobrenadante resultante foi adicionado igual volume de tampão de ensaio (MOPS 50 mM, pH 7,4; KNO<sub>3</sub> 40 mM; EDTA 10 mM; NADH 1 mM) e a mistura foi incubada à temperatura ambiente e ausência de luz de modo a evitar a conversão direta de nitrato a amônia. Após diferentes períodos de tempo, alíquotas de 250 μL desta mistura reacional foram removidas e a reação paralisada por adição de acetato de zinco (20 mg/mL de meio reacional). O nitrito produzido no meio foi dosado utilizando reagente de Griess

[sulfanilamida 0,5%, *N*-(1-naftil) etilenodiamina 0,05% e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,25%] (Green et al., 1982).

### **3.7. Medida da produção de <sup>•</sup>NO pela técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)**

Extratos de folhas de *Arabidopsis thaliana* foram obtidos por homogeneização de 170 mg de tecido vegetal em 200 µL de tampão fosfato (100 mM; pH 7,2) e complexo *N*-metil-D-glucamina ditiocarbamato de ferro [Fe(II)-(MGD)<sub>2</sub>] (Fe<sup>2+</sup> a 2 mM) de acordo com Vanin e colaboradores (2000; 2002), utilizando sistema de dispersão e mistura Polytron Kinematica AG. Após centrifugação a 10.000 x g por 10 min, o sobrenadante foi incubado por 1 h à temperatura ambiente em igual volume de tampão fosfato (100 mM; pH 7,2), L-arginina ou L-[<sup>15</sup>N<sub>2</sub>-guanidineimino] arginina (Isotec, Miamisburg, OH) 1 mM e todos os cofatores para a NOS de mamíferos às concentrações descritas na medida de atividade NOS (Modolo et al., 2002). Em alguns casos, o sobrenadante também foi incubado com 1 mM de NADH e 1 mM das seguintes fontes de nitrogênio: K<sup>15</sup>NO<sub>3</sub>, Na<sup>15</sup>NO<sub>2</sub> (Isotec, Miamisburg, OH), KNO<sub>3</sub> ou NaNO<sub>2</sub>. Procedimento similar foi realizado em suspensão aquosa de Psm (10<sup>8</sup> UFC/mL) e homogenatos de folhas fervidos, exceto que os últimos foram fervidos por 8 min antes da adição do captador de spin e os substratos nitrogenados. As amostras foram então congeladas, armazenadas em nitrogênio líquido e descongeladas imediatamente antes da análise. Para a aquisição dos espectros de EPR as amostras foram acondicionadas em celas

de quartzo e analisadas à temperatura ambiente em um aparelho Bruker EMX equipado com uma cavidade “Super High Q” sob as condições instrumentais descritas na legenda da Figura 5.

O complexo  $(MGD)_2Fe(II)$  foi preparado imediatamente antes de cada experimento, a partir da adição de  $FeSO_4$  sólido a uma solução concentrada de MGD preparada em citrato de sódio 20 mM (para manter o ferro no estado de oxidação 2+). Após a formação de  $(MGD)_2Fe(II)$ , tampão fosfato (100 mM; 7,2) foi adicionado à solução de maneira a obter o complexo a 2 mM de  $Fe^{2+}$  e 20 mM de MGD. Este complexo foi utilizado à concentração final de 1 mM ( $Fe^{2+}$ ). A concentração do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  foi estimada a partir da dupla integração dos espectros de EPR usando concentrações conhecidas de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi como padrão (Giorgio et al, 1998; Bonini et al, 1999; Linares et al, 2001).

### **3.8. Determinação de proteínas totais**

A dosagem de proteína nas amostras, quando conveniente, foi realizada através do método de ligação com *Coomassie blue* utilizando o reagente de determinação de proteína (Pierce, Rockford, IL) e BSA como padrão (Bradford, 1976).

### **3.9. Visualização de células mortas em *A. thaliana* inoculada com *P. syringae***

Folhas de *Arabidopsis thaliana* (controle ou infiltradas com Psm) foram coletadas a partir de plantas mantidas por diferentes períodos de tempo (9, 24, 48 e 60 h) na ausência de luz e a 24 °C. Adicionalmente, plantas deficientes para a enzima NR foram co-infiltradas com Psm e  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  (equivalente a 5 nmol) e mantidas pelos mesmos períodos de tempo sob ausência de luz. Decorrido os tempos de incubação, cada folha foi imersa por 1 min em solução fervente de lactofenol (ácido láctico/glicerol/fenol/água destilada; 1:1:1:1, v/v) contendo azul de tripan (0,25 mg/mL) segundo Rate e colaboradores (1999). Os tecidos foram lavados por 2 min em uma solução de etanol/lactofenol (2:1, v/v) e então em uma solução de etanol 50%, seguindo armazenamento em água destilada. As folhas foram montadas em lâminas e estas examinadas em um Microscópio Nikon Eclipse E800 equipado com uma câmera RS Photometric.

### **3.10. Visualização *in situ* da produção de $\cdot\text{NO}$**

Folhas de *Arabidopsis thaliana* de ambos os genótipos (sadias ou inoculadas com Psm) foram coletadas após 6 h de incubação para análise *in vivo* da produção de  $\cdot\text{NO}$ . Para tal, foram realizados cortes transversais finos nas folhas que foram incubados em uma solução de 4,5 diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA) 10  $\mu\text{M}$  à temperatura ambiente, na ausência de luz e sob agitação (Kojima et al., 1998;

Magalhaes et al., 2000). Decorridos 15 min, os cortes foram lavados em água deionizada, montados em lâminas sob Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) e analisados em Microscópio de Fluorescência Olympus BX50 equipado com uma câmera digital Olympus U-TV1X e filtro Olympus U-MNB2 de comprimentos de onda de excitação e emissão de 450 e 570 nm, respectivamente.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Medida da atividade NOS

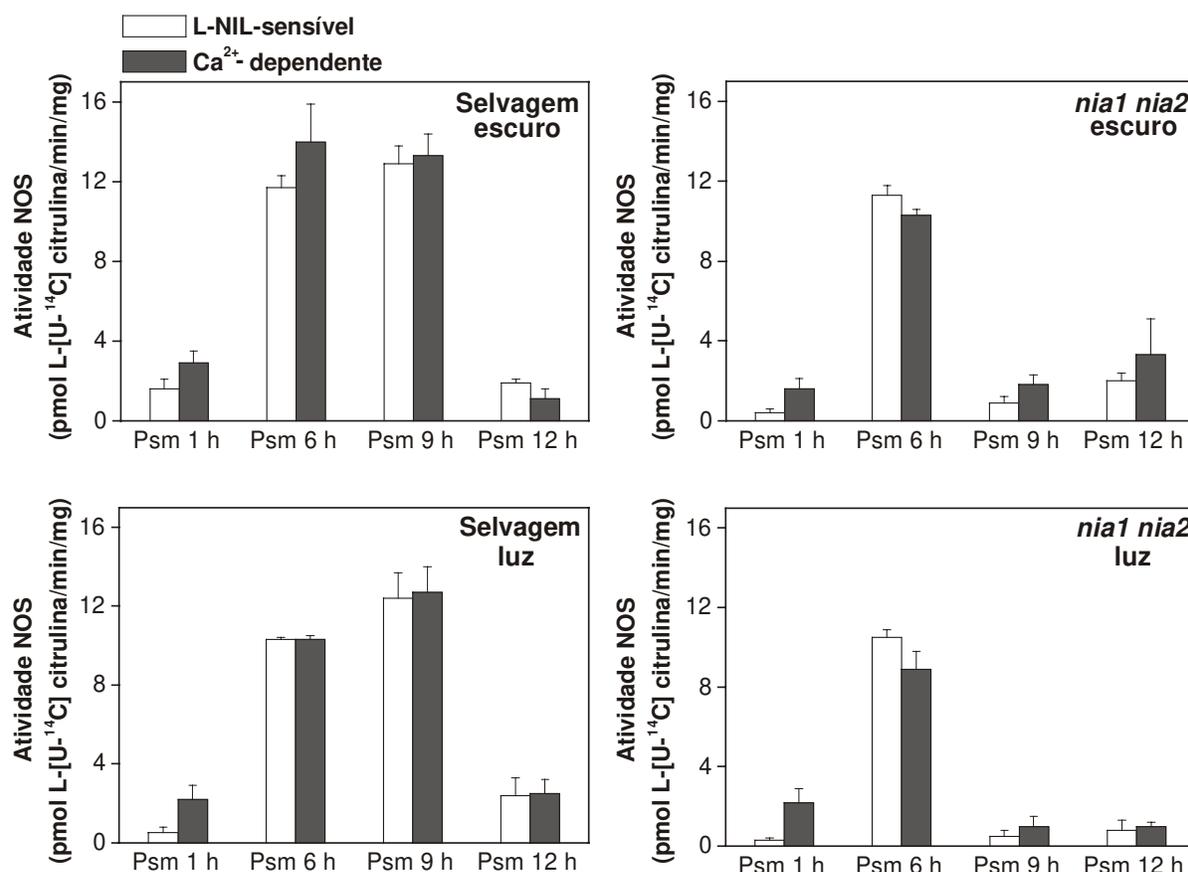
Inicialmente foi avaliado se a inoculação da bactéria *P. syringae* pv. *maculicola* (Psm) em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem ou deficiente para a enzima nitrato redutase (NR) induz uma atividade óxido nítrico sintase (NOS) nas plantas. A atividade NOS foi medida a partir da conversão de L-[U-<sup>14</sup>C] arginina a L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina sensível ao inibidor de NOS L-N<sup>6</sup>-(1-iminoetil) lisina (L-NIL) e dependente de cálcio, avaliada pela sensibilidade a EGTA, um quelante específico para este cátion. Como a atividade da enzima NR é altamente controlada pela luz, a atividade NOS foi acompanhada por 24 h em plantas mantidas na presença ou na ausência de luz.

De acordo com o apresentado na Figura 1, atividade NOS sensível a L-NIL ou EGTA atingiu praticamente os mesmos níveis sob as várias condições indicando uma atividade dependente de cálcio específica que foi muito menor que a encontrada em modelo animal (Rees et al., 1995). A inoculação de Psm em plantas do tipo selvagem, bem como em plantas mutantes aumentou substancialmente a formação de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina, indicando uma atividade NOS induzida por patógeno que não foi afetada pela luz. A atividade NOS induzida por Psm encontrada em plantas mantidas no escuro ou na luz foi máxima 6 h após a inoculação bacteriana com formação de  $11,7 \pm 0,6$  e  $10,3 \pm 0,1$  pmol de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg proteína para as selvagens e  $11,3 \pm 0,5$  e  $10,5 \pm 0,4$  pmol de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg proteína para as mutantes deficientes na síntese de NR, respectivamente. Doze horas após a inoculação no escuro ou na luz, a

atividade NOS induzida por Psm em plantas do tipo selvagem e naquelas deficientes para NR diminuiu para 1,9 - 2,4 pmol de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg proteína e 2,0 - 0,8 pmol de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg proteína, respectivamente.

No entanto, a atividade NOS em plantas do tipo selvagem permaneceu máxima até 9 h de inoculação ( $12,9 \pm 0,9$  e  $12,4 \pm 1,3$  pmol de L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg, para escuro e luz, respectivamente) enquanto que neste período, a atividade diminuiu consideravelmente em plantas deficientes para NR ( $0,9 \pm 0,3$  e  $0,5 \pm 0,3$  L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg, para escuro e luz, respectivamente).

Estes resultados indicam que a inoculação de Psm induziu atividade NOS em folhas de *A. thaliana* que não foi influenciada pela ausência de enzima NR durante as seis primeiras horas pós-inoculação. Entretanto, após 9 h, a atividade NOS de plantas do tipo selvagem foi mantida enquanto que em plantas deficientes para NR houve uma diminuição substancial da atividade NOS. Conforme será mostrado posteriormente, esta menor habilidade das plantas mutantes em sustentar a atividade NOS parece resultar da suscetibilidade destas plantas à bactéria.

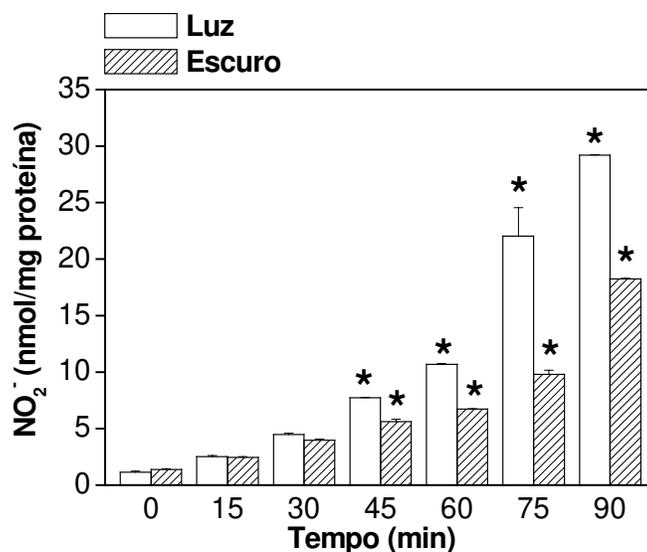


**Figura 1.** Atividade NOS induzida em folhas de *A. thaliana* selvagem e mutante deficiente para NR, inoculadas com *P. syringae*. Plantas controle ou inoculadas com Psm foram mantidas na presença ou na ausência de luz durante os períodos especificados. Posteriormente, extratos foliares solúveis foram utilizados na medida de atividade NOS, determinada pela diferença entre a L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina produzida no meio completo de reação e aquela produzida em meio contendo o inibidor de NOS L-N<sup>6</sup>-(1-iminoetil) lisina (L-NIL-sensível). A dependência de Ca<sup>2+</sup> foi determinada como a diferença entre a L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina produzida no meio completo de reação e aquela produzida na presença de EGTA (Ca<sup>2+</sup>-dependente). Os valores correspondem a atividade NOS medida em plantas inoculadas subtraída da atividade medida em plantas controle, e representam a média ± EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. Atividade NOS em plantas-controle foi de 1-3 pmol L-[U-<sup>14</sup>C] citrulina/min/mg.

## 4.2. Medida da atividade nitrato redutase (NR)

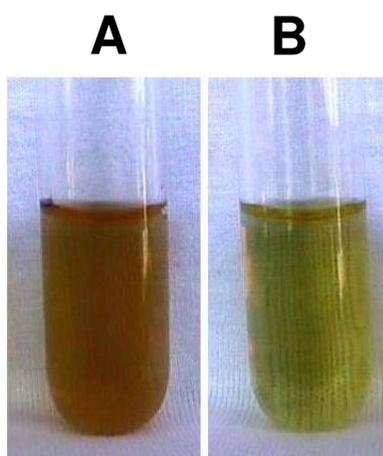
Para avaliar se a atividade NR em folhas de *A. thaliana* é afetada pela inoculação de Psm, a redução de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  foi monitorada. Folhas de *A. thaliana* pertencentes aos mesmos lotes do material vegetal empregado na medida de atividade NOS foram homogeneizadas e a fração citossólica foi utilizada para a determinação da atividade NR. As medidas foram feitas no tempo 0, para a determinação do  $\text{NO}_2^-$  basal, e após 75 min de incubação da fração protéica em meio de reação. Este tempo foi determinado como sendo o ideal para se estimar a atividade da enzima NR neste sistema a partir de testes realizados com plantas-controle (Figura 2). Os ensaios para a determinação da atividade NR foram conduzidos na ausência de luz uma vez que esta estimula a conversão de nitrato à amônia em maior extensão que a conversão de nitrato à nitrito (Lea, 1997).

Plantas selvagens acondicionadas por 6 h sob luz apresentaram uma atividade NR de  $1420 \pm 82$  e  $1480 \pm 68$  pmol  $\text{NO}_2^-$ /min/mg em folhas controle e inoculadas com Psm, respectivamente. Quando as plantas foram mantidas no escuro, a atividade NR foi de  $213 \pm 14$  pmol  $\text{NO}_2^-$ /min/mg no controle e  $201 \pm 17$  pmol  $\text{NO}_2^-$ /min/mg em folhas inoculadas. Estes valores correspondem à quantidade de  $\text{NO}_2^-$  produzida em 75 min de reação subtraída da porção pré-existente no tecido foliar medida no tempo 0 de reação. Dessa forma, a atividade NR em plantas acondicionadas na presença de luz foi cerca de 7 vezes maior que a encontrada em plantas acondicionadas no escuro, estando de acordo com relatos prévios (Dembinski et al., 1996; Rockel et al., 2002).

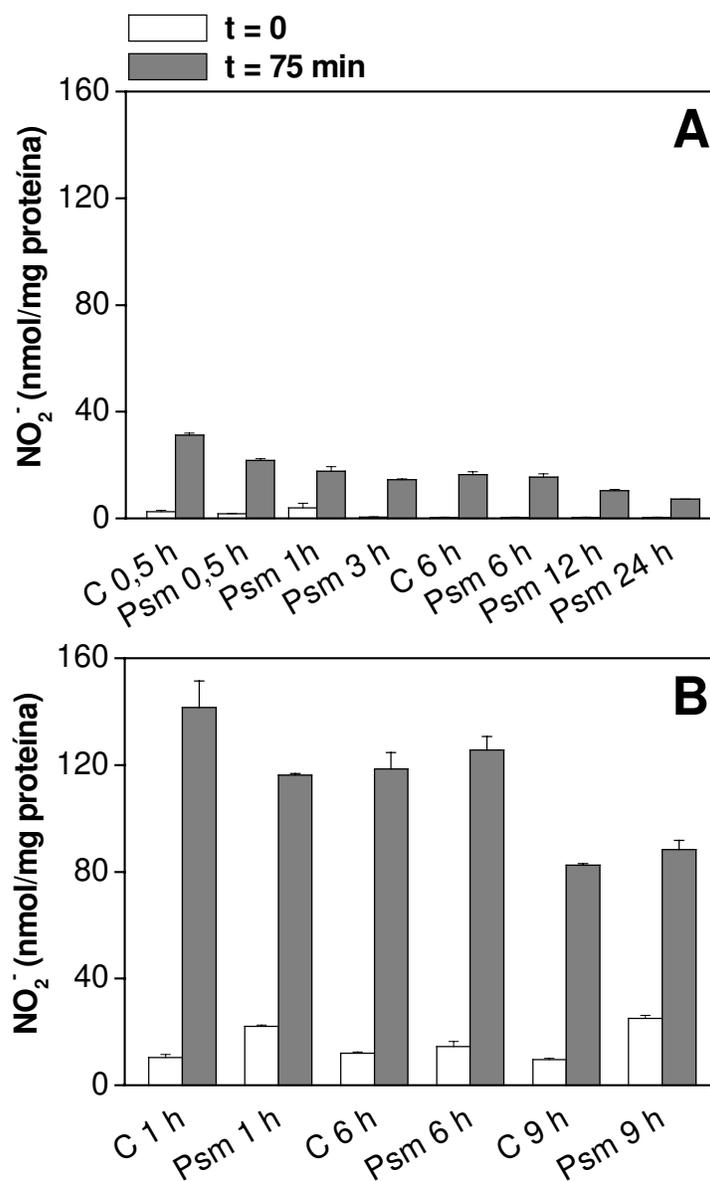


**Figura 2.** Atividade NR em folhas de *Arabidopsis thaliana* em função do tempo. Plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem foram mantidas no escuro ou na luz a 24 °C. Após 6 h, as folhas foram coletadas para a dosagem de  $\text{NO}_2^-$  em diferentes períodos de incubação com  $\text{NO}_3^-$  (40 mM), como indicado. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata. \*,  $P < 0,05$ , Teste *t*, representando diferença significativa entre plantas acondicionadas na luz e aquelas mantidas no escuro.

Como Psm não apresenta atividade redutora de  $\text{NO}_3^-$  seja via atividade NR ou por processo de desnitrificação (Figura 3), os resultados de medida da redução de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  correspondem apenas ao metabolismo da planta. É notável que a atividade NR de plantas mantidas no escuro ou na luz não foi significativamente afetada pela inoculação com Psm mesmo após 24 h de interação planta-bactéria (Figura 4). Assim, em contraste aos resultados obtidos para atividade NOS (Figura 1), a atividade NR não foi afetada pela interação *A. thaliana*-*P.syringae*. Como esperado não foi detectada atividade NR nas plantas duplo mutante *nia1 nia2*.



**Figura 3.** Análise qualitativa da atividade redutora de nitrato na bactéria-teste. A bactéria-teste cresceu em meio contendo  $\text{NO}_3^-$  e após 10 dias de incubação a  $28^\circ\text{C}$ , produção de  $\text{NO}_2^-$  foi determinada pela mudança de coloração do meio de amarela para marrom-avermelhada, após adição de reagente de Follet e Ratcliff. **A**, controle positivo (*Erwinia chrysanthemi*) e **B**, resultado negativo para a bactéria-teste.

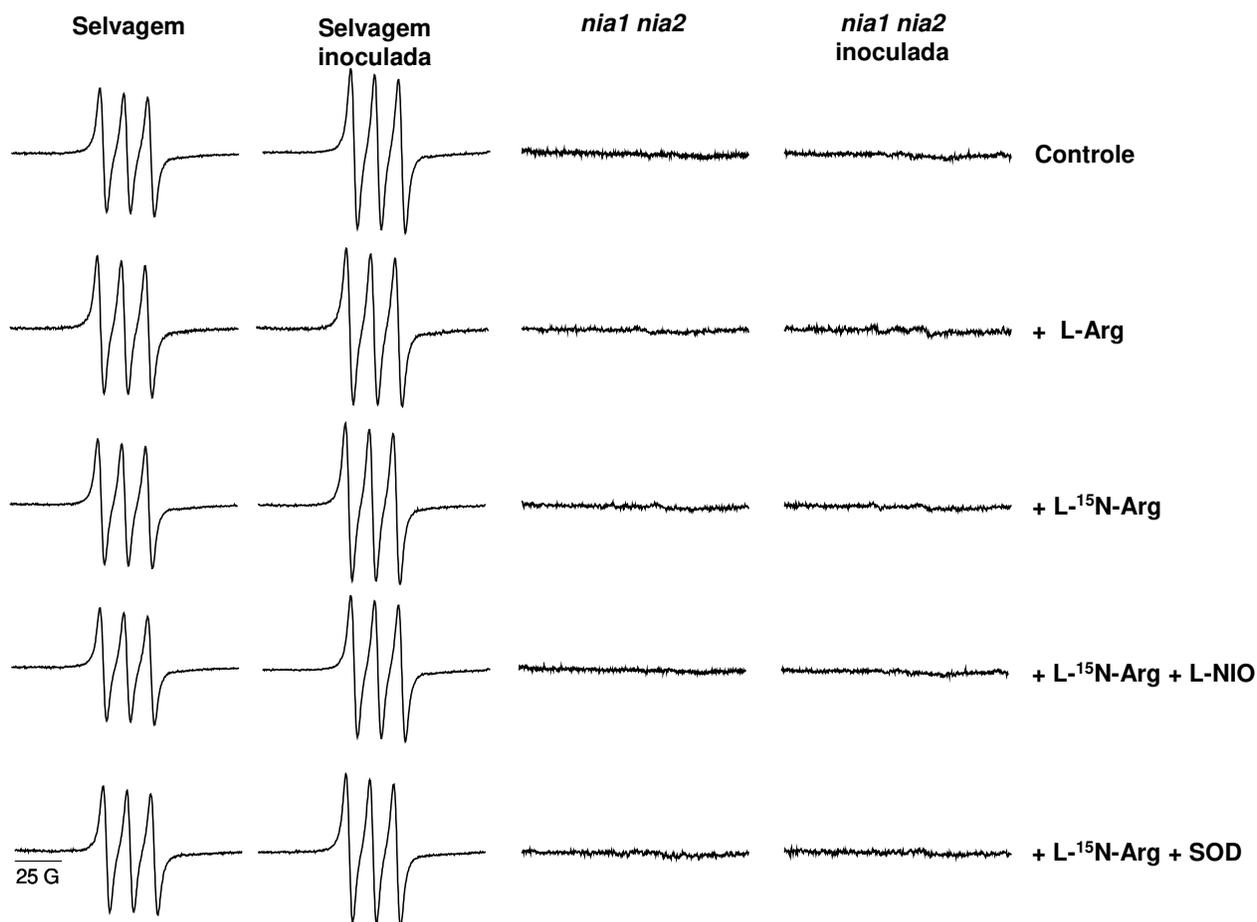


**Figura 4.** Atividade NR em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem inoculadas com Psm por diferentes períodos de tempo. Atividade NR foi determinada em plantas que permaneceram na ausência **(A)** ou na presença **(B)** de luz durante os períodos indicados. A determinação de produção de  $\text{NO}_2^-$  foi feita nos tempos 0 e após 75 min de incubação com  $\text{NO}_3^-$ . Barras representam a média  $\pm$  EPM de experimentos realizados em triplicata.

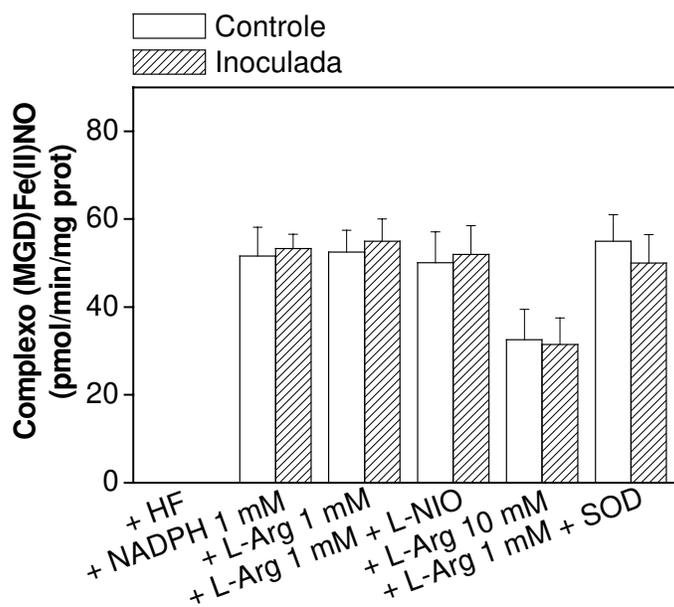
### 4.3. Produção de $\bullet$ NO monitorada por EPR

A produção de  $\bullet$ NO em folhas de *A. thaliana* foi monitorada, por EPR, empregando-se o captador de spin  $(MGD)_2Fe(II)$  de acordo com Vanin e colaboradores (2000; 2002). Como plantas de ambos os genótipos mostraram máxima atividade NOS induzida por Psm após 6 h de inoculação bacteriana, este intervalo de tempo foi inicialmente adotado para a coleta das folhas a serem analisadas nos experimentos de EPR.

A incubação de homogenatos de folhas de *A. thaliana* com L-arginina 1 mM, todos os cofatores para a NOS de mamíferos, incluindo NADPH 1 mM, e o captador de spin em tampão fosfato 100 mM por 1 h levou à detecção de um espectro de três linhas (triplete), característico do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  (Figura 5) (Komarov e Lai, 1995). Este resultado forneceu evidência inequívoca da produção de  $\bullet$ NO nos homogenatos de folhas de plantas selvagens. Em contraste, tal complexo não foi detectado em homogenatos de plantas deficientes para NR (Figura 5). Surpreendentemente, os níveis do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  foram similares na ausência ou na presença de L-arginina 1 mM. Esse resultado foi confirmado por diversos experimentos realizados para quantificar de maneira significativa o complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  produzido (Figura 6,  $P < 0,05$ ; Teste *t*). Da mesma forma, os níveis deste complexo foram aproximadamente os mesmos em plantas selvagens controle e naquelas inoculadas com Psm (Figura 6). Estes resultados diferiram daqueles apresentados na Figura 1 onde inoculação bacteriana desencadeou em ambos os genótipos um aumento na conversão de L-arginina a L-citrulina com formação de  $\bullet$ NO.



**Figura 5.** Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas selvagens e mutantes deficientes para NR, incubados com complexo  $(MGD)_2Fe(II)$  e L-arginina. Os espectros foram obtidos a partir de homogenatos de folhas controle e folhas inoculadas com Psm e acondicionadas no escuro por 6 h. Os espectros foram adquiridos após 1 h de incubação dos homogenatos em tampão fosfato com complexo  $(MGD)_2Fe(II)$  e todos os cofatores para a NOS de mamíferos somente (controle) ou + L-arginina 1 mM (+ L-Arg) ou + L- $^{15}N_2$ -guanidineimino] arginina 1 mM somente (+ L- $^{15}N$ -Arg) ou em associação com inibidor de NOS L- $N^5$ -(1-iminoetil) ornitina 3 mM (+ L- $^{15}N$ -Arg + L-NIO) ou em associação com 100 U de SOD/mL (+ L- $^{15}N$ -Arg + SOD). Os espectros correspondem ao acúmulo de 4 “scans”. Condições instrumentais: potência, 20 mW; amplitude de modulação, 2,5 G; constante de tempo time, 81,92 ms; taxa de scan, 2,4 G/s; ganho,  $2,0 \times 10^5$ .



**Figura 6.** Produção de  $\bullet\text{NO}$ , quantificada por EPR, em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem em resposta a *P. syringae*. Os dados apresentados coletam os resultados obtidos nos experimentos representados na Figura 5. Os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  foram quantificados por dupla integração utilizando concentrações conhecidas de 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametil-1-piperidiniloxi como padrão. Plantas controle e inoculadas com Psm foram mantidas no escuro por 6 h. Homogenatos de folhas (HF) foram preparados e incubados com o captador de spin, todos os cofatores para a NOS de mamíferos, incluindo NADPH 1 mM, na presença (+ L-Arg) ou ausência (+ NADPH) de L-arginina nas concentrações especificadas. Quando indicado, foram utilizados o inibidor da NOS L- $\text{N}^{\beta}$ -(1-iminoetil) ornitina (L-NIO) 3 mM ou SOD 100 U/mL. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Para verificar a participação da atividade NOS na produção do  $\bullet$ NO detectado por EPR, incubações foram feitas utilizando L-arginina marcada isotopicamente com  $^{15}\text{N}$  (L-[ $^{15}\text{N}_2$ -guanidineimino] arginina) (Komarov and Lai, 1995; Bonini et al, 1999; Li et al, 2004). Tal substrato produziria  $\bullet^{15}\text{NO}$  que, quando complexado com  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  forneceria um espectro de duas linhas (dubleto) ao invés de três. Contudo, espectro de duas linhas característico do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})^{15}\text{NO}$  não foi detectado nas amostras (Figura 5) mesmo quando concentrações de 10 e 50 mM de L-arginina marcada com  $^{15}\text{N}$  foram empregadas. Na verdade, os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})^{14}\text{NO}$  observado em homogenatos de plantas do tipo selvagem diminuíram em torno de 40% quando na presença de altas concentrações deste aminoácido (Figura 6). Ainda, a presença de L-N<sup>5</sup>-(1-iminoetil) ornitina (L-NIO), um inibidor para a NOS de mamíferos, não causou qualquer alteração nos níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})\text{NO}$  (Figura 6). Experimento-controle, realizado com suspensão aquosa de Psm revelou ausência de sinal de complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})^{14}\text{NO}$  ou  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})^{15}\text{NO}$  após incubação da bactéria com L-[ $^{15}\text{N}_2$ -guanidineimino] arginina 1 mM e  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  (Apêndice, Figura 1).

As dificuldades em detectar  $\bullet$ NO derivado de L-arginina por EPR, sob as condições experimentais aqui descritas, poderia ser causada por uma produção paralela de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Vanin et al., 2004). Um considerável aumento na produção de  $\text{O}_2^-$  durante uma interação incompatível entre plantas e microrganismos já foi demonstrado (Lamb e Dixon, 1997). Dessa forma, a presença de  $\text{O}_2^-$  no meio provocaria uma subestimação dos níveis de  $\bullet$ NO devido à ocorrência de reação rápida entre tais espécies, com formação de peroxinitrito (Beckman et al, 1990). Para

investigar essa possibilidade, foram feitas incubações dos homogenatos na presença de 100 U de superóxido dismutase (SOD)/mL. A presença desta enzima não alterou os resultados (Figura 5). Como apresentado na Figura 6, os níveis do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  foram na faixa de 50-57 pmol/min/mg e não foram influenciados pela inoculação com Psm ou presença de SOD, mas diminuídos na presença de L-arginina 10 mM. Interessantemente, a luz não afetou os níveis basais de  $\bullet NO$  detectados nas plantas selvagens (Apêndice, Tabela A1). O  $\bullet NO$  detectado por EPR nas plantas selvagens foi formado por um processo enzimático, uma vez que incubações do captador de spin com homogenatos previamente fervidos não produziu complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  detectável por esta técnica espectroscópica (Apêndice, Figura 1A e 1B). O fato que os níveis de  $\bullet NO$  monitorados pela formação de L-citrulina (em torno de 12 pmol/min/mg) não poderia ser discriminado por EPR é consistente com a sensibilidade da metodologia. Além disso, variações de 20-30% são usuais em análise quantitativa realizada por EPR (Giorgio et al, 1998; Bonini et al, 1999; Linares et al., 2001).

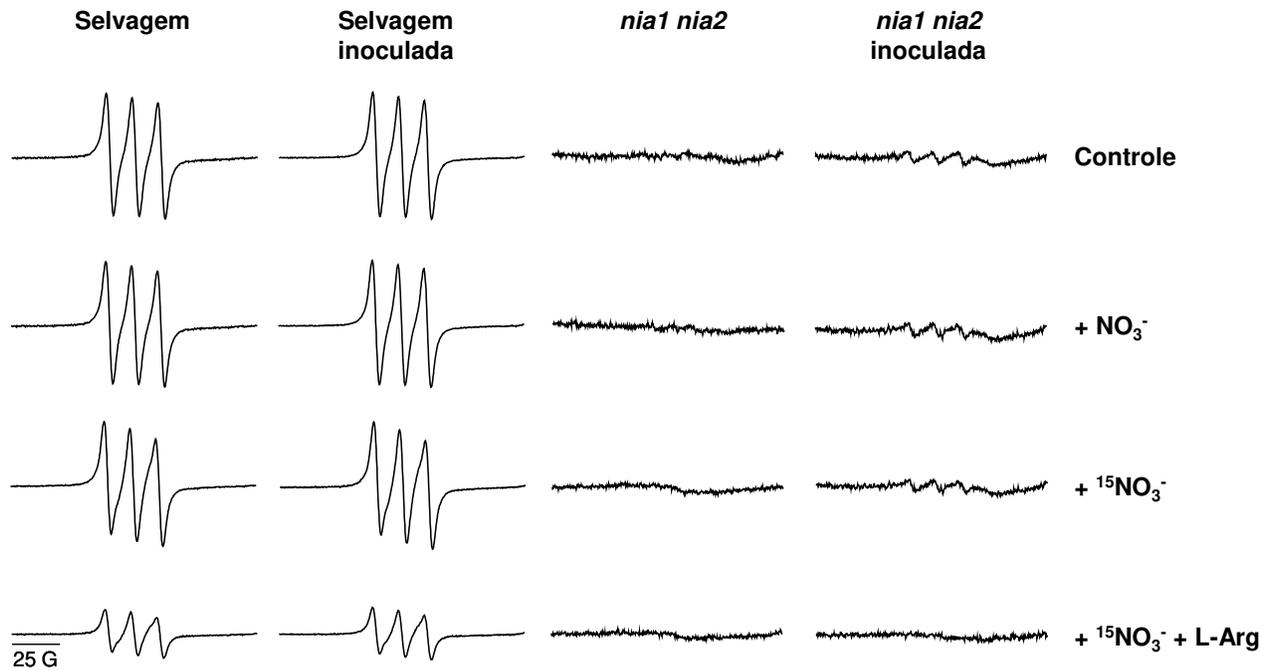
Estes resultados indicam que, em adição à atividade NOS, homogenatos de folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem possuem outra via de formação de  $\bullet NO$  mais eficiente. Tal formação utiliza uma fonte endógena de nitrogênio que provavelmente é escassa ou ausente em folhas de *A. thaliana* deficientes para NR, uma vez que nenhum sinal referente à formação de complexo  $(MGD)_2Fe(II)-NO$  foi detectado nos homogenatos de folhas destas plantas (Figura 5).

#### 4.4. Fontes potenciais de $\bullet$ NO detectável por EPR

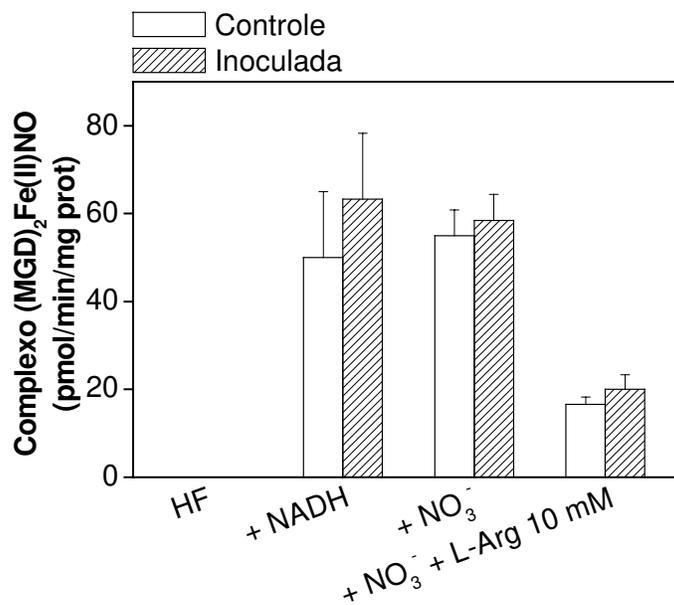
Como tem sido sugerido que a enzima NR é uma importante fonte de  $\bullet$ NO em plantas (Rockel et al., 2002; Lea et al., 2004; Vanin et al., 2004), a próxima etapa foi examinar a possibilidade de  $\text{NO}_3^-$  ser o principal substrato para a síntese de  $\bullet$ NO durante a interação *A. thaliana*-*P. syringae*. Assim, homogenatos de folhas de plantas selvagens, bem como de mutantes deficientes para NR foram incubados com tampão fosfato 100 mM contendo NADH 1 mM, um importante cofator para a atividade NR, o captador de spin e  $\text{NO}_3^-$  1 mM. Novamente, somente homogenatos de folhas de plantas selvagens mostraram claros espectros de EPR cujas intensidades não foram significativamente afetadas pela presença de  $\text{NO}_3^-$ , pela inoculação com Psm (Figura 7) ou pela luz (Apêndice, Tabela A2). A substituição de  $\text{NO}_3^-$  por  $^{15}\text{NO}_3^-$  praticamente não mudou o espectro de EPR ou sua intensidade, embora uma pequena distorção dos picos (Figura 7) indique alguma contribuição (menos de 10%) do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}^{15}\text{NO}$ . Como esperado, experimento-controle, realizado com suspensão aquosa de Psm revelou ausência de sinal de complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}^{14}\text{NO}$  ou  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}^{15}\text{NO}$  após incubação da bactéria com  $^{15}\text{NO}_3^-$  1 mM e  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}$  (Apêndice, Figura 1D).

A Figura 8 mostra que os níveis de  $\bullet$ NO detectado sob as condições acima foram na faixa de 50-63 pmol/min/mg ( $P < 0,05$ ; Teste  $t$ ) e não foram significativamente diferentes daqueles obtidos nos experimentos com L-arginina (Figura 6). Uma vez mais, incubações de homogenatos de folhas de plantas do tipo selvagem com  $\text{NO}_3^-$  1

mM e L-arginina 10 mM diminuíram os níveis detectáveis de  $\cdot\text{NO}$  tanto em plantas controle quanto naquelas inoculadas com Psm (Figuras 7 e 8).



**Figura 7.** Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas selvagens e mutantes deficientes para NR, incubados com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  e  $\text{NO}_3^-$ . Os espectros foram obtidos a partir de homogenatos de folhas controle e folhas inoculadas com Psm e acondicionadas no escuro por 6 h. Os espectros foram adquiridos após 1 h de incubação dos homogenatos com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  e tampão fosfato contendo NADH 1 mM somente (Controle) ou +  $\text{NO}_3^-$  1 mM (+  $\text{NO}_3^-$ ) ou +  $^{15}\text{NO}_3^-$  somente (+  $^{15}\text{NO}_3^-$ ) ou em associação com L-arginina 10 mM (+  $^{15}\text{NO}_3^-$  + L-Arg). Os espectros correspondem ao acúmulo de 4 “scans”. As condições instrumentais foram as mesmas descritas na legenda da Figura 5.

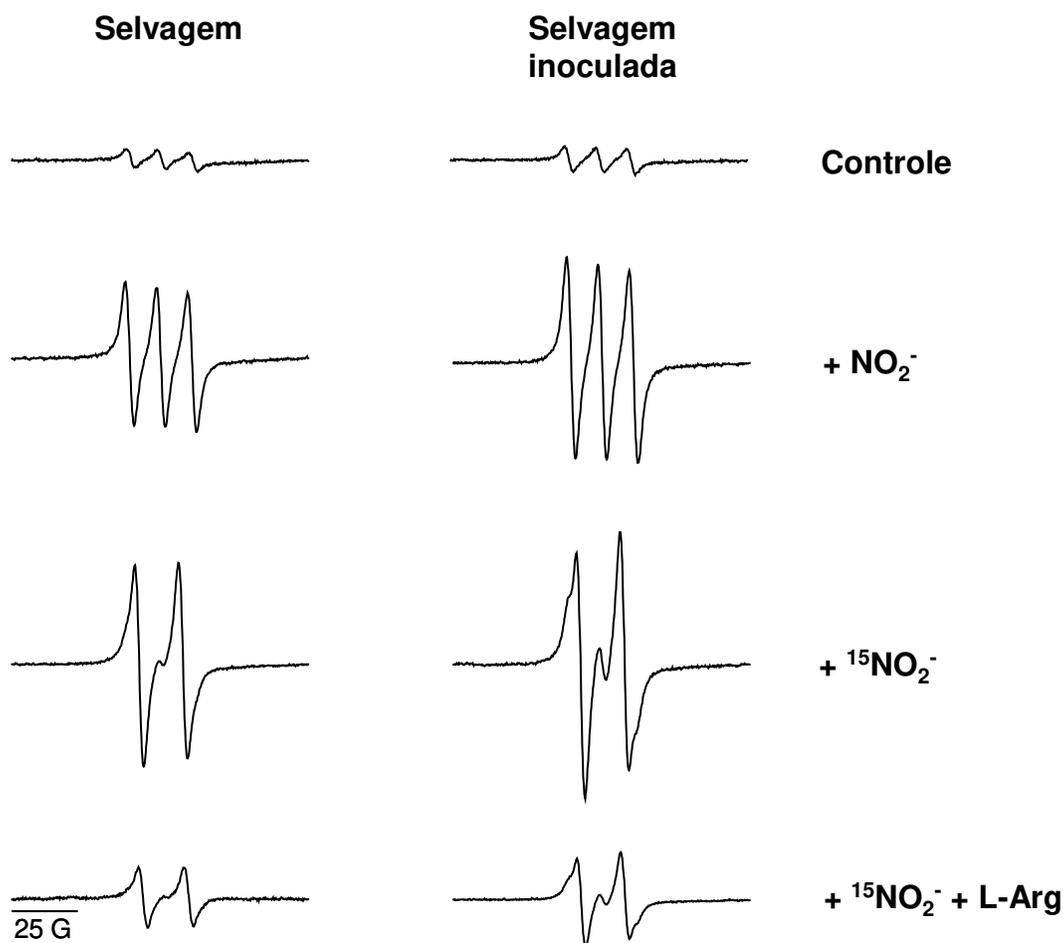


**Figura 8.** Produção de  $\bullet\text{NO}$ , quantificada por EPR, em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem em resposta a *P. syringae*. Os dados apresentados coletam os resultados obtidos nos experimentos representados na Figura 7. Os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  foram quantificados de maneira similar à descrita na legenda da Figura 6. Plantas controle e inoculadas com Psm foram mantidas no escuro por 6 h. Homogenatos de folhas (HF) foram preparados e incubados com o captador de spin e NADH 1 mM na presença (+  $\text{NO}_3^-$ ) ou ausência (+ NADH) de  $\text{NO}_3^-$  1 mM. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Estes resultados indicam que a principal fonte endógena de nitrogênio responsável pela produção de  $\bullet\text{NO}$  em folhas *A. thaliana* não é  $\text{NO}_3^-$ . Esta fonte é escassa ou praticamente ausente nas plantas mutantes. Novamente, a produção endógena de  $\bullet\text{NO}$  foi inibida por uma alta concentração de L-arginina.

Após excluir L-arginina e  $\text{NO}_3^-$  como as principais fontes de  $\bullet\text{NO}$  detectável por EPR em homogenatos de folhas de *A. thaliana*, a última possibilidade a testar foi o  $\text{NO}_2^-$ . Para tal proposta, homogenatos foram incubados com  $\text{NO}_2^-$  1 mM, NADH 1 mM e o captador de spin. Como mostrado nas Figuras 9 e 11,  $\text{NO}_2^-$  aumentou os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  em homogenatos de plantas selvagens de 50 para 117 e 139 pmol/min/mg) no controle e na inoculada, respectivamente, embora a diferença observada não tenha sido significativa ( $P < 0,05$ ; Teste *t*).

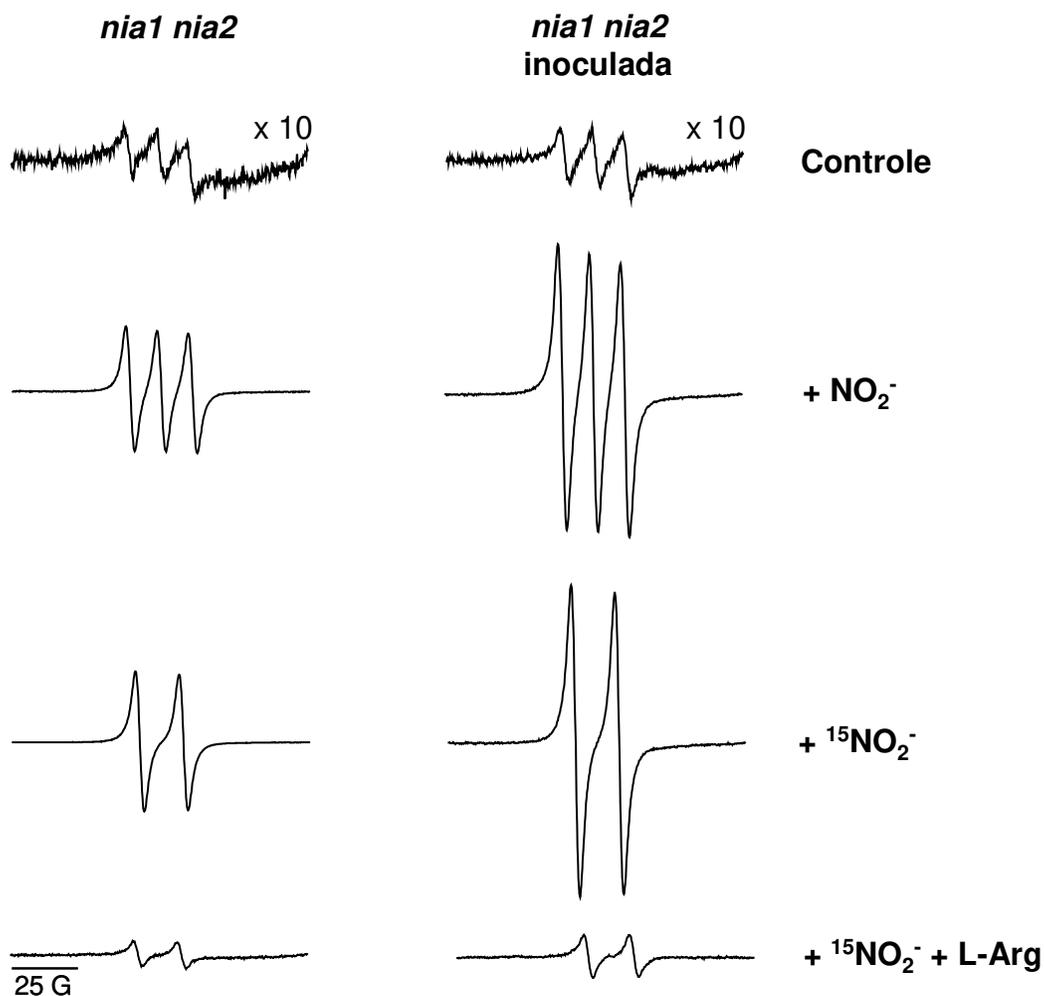
Confirmação de que  $\text{NO}_2^-$  é a principal fonte de  $\bullet\text{NO}$  foi obtida através da utilização de  $^{15}\text{NO}_2^-$ . Neste caso, o característico sinal de EPR de duas linhas correspondente ao complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}^{15}\text{NO}$  foi claramente detectado (Figura 9). Diferentemente do observado no experimento empregando L-arginina, a incubação dos homogenatos com  $\text{NO}_2^-$  1 mM e SOD 100 U /mL permitiu observar diferença significativa entre plantas selvagens controle e aquelas inoculadas com Psm (Figura 11). A formação do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  nestas plantas foi de 136,5 pmol/min/mg para o controle e 212,5 pmol/min/mg proteína para as inoculadas com Psm. Contribuições do sinal de três linhas referente ao complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}^{14}\text{NO}$  foi menor que 10% e provavelmente compreendeu a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  endógeno.



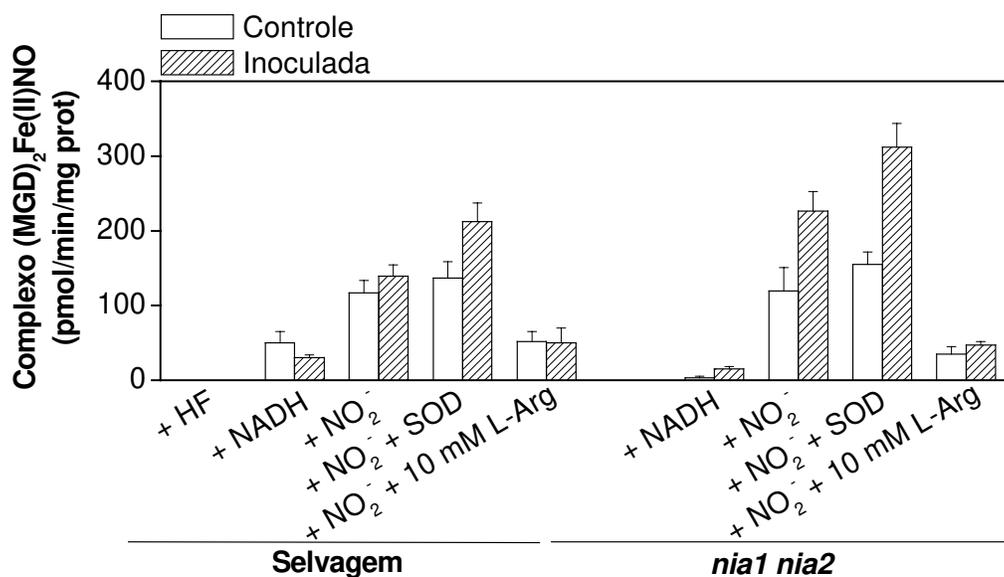
**Figura 9.** Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas do tipo selvagem incubados com complexo  $(MGD)_2Fe(II)$  e  $NO_2^-$ . Os espectros foram obtidos a partir de homogenatos de folhas controle e folhas inoculadas com Psm e acondicionadas no escuro por 6 h. Os espectros foram adquiridos após 1 h de incubação com complexo  $(MGD)_2Fe(II)$  e tampão fosfato contendo NADH 1 mM somente (Controle), ou +  $NO_2^-$  1 mM (+  $NO_2^-$ ) ou +  $^{15}NO_2^-$  somente (+  $^{15}NO_2^-$ ) ou em associação com L-arginina 10 mM (+  $^{15}NO_2^-$  + L-Arg). Os espectros correspondem ao acúmulo de 4 “scans”. Condições instrumentais foram as mesmas descritas na legenda da Figura 5.

A adição de L-arginina 10 mM marcadamente reduziu os níveis de  $\bullet\text{NO}$  detectados em plantas selvagens (controle ou inoculadas) (Figuras 9 e 11) enquanto que a luz não teve efeito significativo (Apêndice, Tabela A3).

Embora estes resultados obtidos com as plantas do tipo selvagem pudessem indicar que a redução de  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  tivesse sido catalisada pela enzima NR, como tem sido extensivamente proposto na literatura, isso não foi suportado pelos resultados obtidos com as plantas mutantes *nia1 nia2* (Figura 10). Tais plantas, que têm somente 0,5% da atividade NR de plantas do tipo selvagem (Wilkinson e Crawford, 1993), mostraram muito baixa produção de  $\bullet\text{NO}$  (em torno de 15 pmol/min/mg), mas produziram consideráveis níveis deste radical livre quando na presença de  $\text{NO}_2^-$  (119 pmol/min/mg) (Figura 11). Estes níveis quase dobraram após a inoculação das plantas com Psm (227 pmol/min/mg). Estes resultados indicaram que, na presença de  $\text{NO}_2^-$ , a inoculação de Psm intensificou a produção de  $\bullet\text{NO}$  nas plantas deficientes para NR. Para demonstrar inequivocamente que esta produção de  $\bullet\text{NO}$  se originou da redução do  $\text{NO}_2^-$ , experimentos utilizando  $\text{NO}_2^-$  marcado isotopicamente com  $^{15}\text{N}$  foram realizados. O espectro de duas linhas destas amostras confirmou que a produção de  $\bullet\text{NO}$  foi realmente derivada do  $\text{NO}_2^-$  (Figura 10) assim como para plantas selvagens (Figura 9). Os dados coletados a partir de diversos experimentos são apresentados na Figura 11 ( $P < 0,05$ ; Teste *t*). Assim como o observado para plantas selvagens, luz não teve qualquer efeito (Apêndice, Tabela A3) enquanto que alta concentração de L-arginina significativamente reduziu a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  (35 - 47 pmol/min/mg).



**Figura 10.** Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas mutantes deficientes para NR incubados com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}$  e  $\text{NO}_2^-$ . Os espectros foram obtidos a partir de homogenatos de folhas controle e folhas inoculadas com Psm e acondicionadas no escuro por 6 h. Os espectros foram adquiridos após 1 h de incubação com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}$  e tampão fosfato contendo NADH 1 mM somente (Controle), ou +  $\text{NO}_2^-$  1 mM (+  $\text{NO}_2^-$ ) ou +  $^{15}\text{NO}_2^-$  somente (+  $^{15}\text{NO}_2^-$ ) ou em associação com L-arginina 10 mM (+  $^{15}\text{NO}_2^- + \text{L-Arg}$ ). Os espectros correspondem ao acúmulo de 4 “scans”. Condições instrumentais foram as mesmas descritas na legenda da Figura 5.

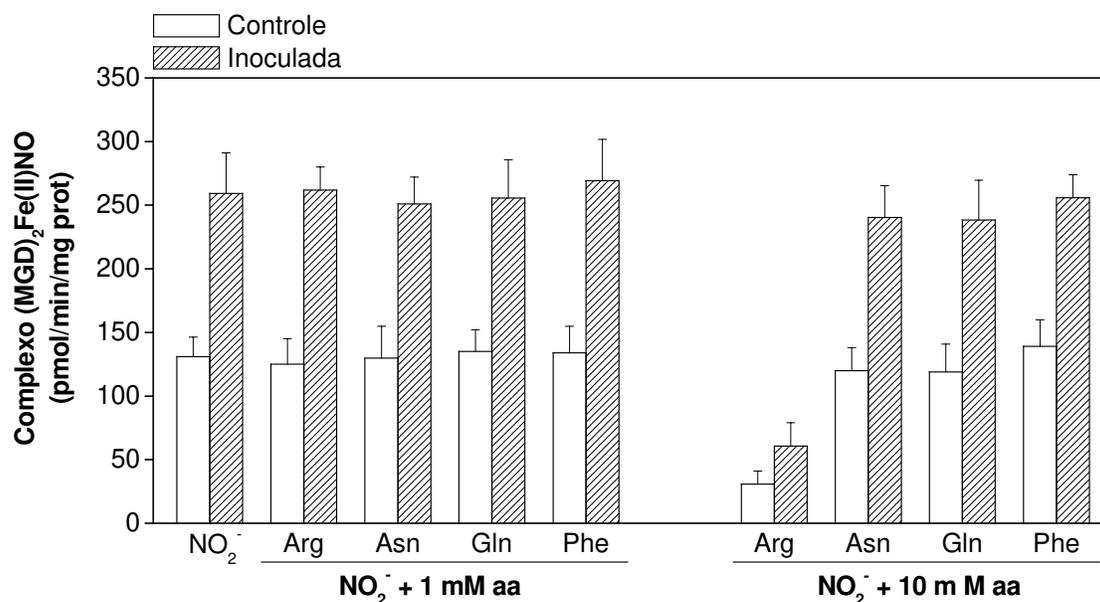


**Figura 11.** Produção de  $^{\bullet}\text{NO}$ , quantificada por EPR, em folhas de *A. thaliana* selvagem e em mutante deficiente para NR em resposta a *P. syringae*. Os dados apresentados coletam os resultados obtidos nos experimentos representados nas Figuras 9 e 10. Os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  foram quantificados de maneira similar à descrita na legenda da Figura 6. Plantas controle e inoculadas com Psm foram mantidas no escuro por 6 h. Homogenatos foliares (HF) foram preparados e incubados com o captador de spin e NADH 1 mM na presença ( $\text{NO}_2^-$ ) ou ausência (+ NADH) de  $\text{NO}_2^-$  1 mM. Quando indicado, foi utilizado SOD 100 U/mL. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

O efeito inibitório de L-arginina parece ser específico desde que outros aminoácidos tais como, L-asparagina, L-fenilalanina ou L-glutamina não tiveram qualquer efeito sobre a produção de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 12), independente da concentração testada (1 ou 10 mM). Foram testados L-asparagina e L-glutamina uma vez que estes aminoácidos podem gerar  $\text{NH}_4^+$  a partir do grupo R de suas cadeias laterais. Igualmente, o grupamento amino ligado ao  $\text{C}_\alpha$  da L-fenilalanina poderia gerar  $\text{NH}_4^+$  a partir da ação da enzima fenilalanina amônia-liase. Assim, o acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  no sistema poderia regular, por “feedback”, a atividade de enzimas como NR ou nitrito redutase por catalisarem a redução de  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NH}_4^+$  (Lea, 1997; Chang e Sorger, 1976).

Assim como nas plantas selvagens, a presença de SOD aumentou ainda mais o rendimento de  $\bullet\text{NO}$  em incubações de homogenatos de plantas mutantes com  $\text{NO}_2^-$  de 119 para 155 pmol/min/mg proteína (folhas controle) e de 227 para 312 pmol/min/mg (folhas inoculadas) (Figura 11).

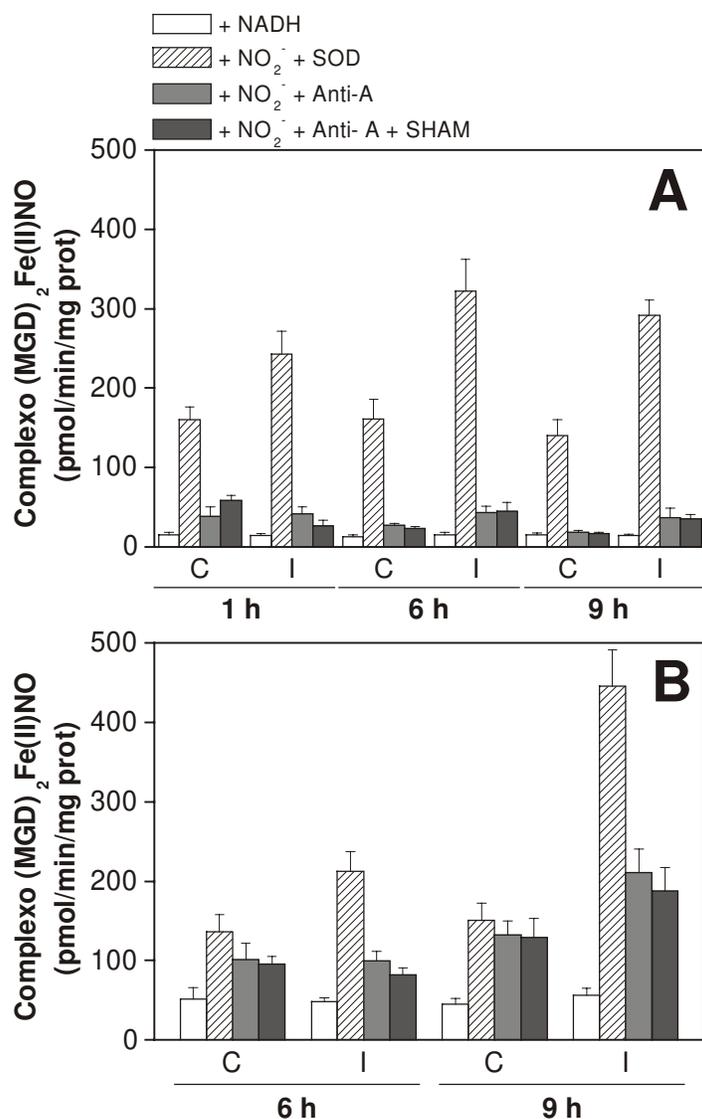
Com a finalidade de avaliar a produção de  $\bullet\text{NO}$  derivada de  $\text{NO}_2^-$  em função do tempo de interação planta-patógeno, plantas de *A. thaliana* deficientes para a enzima NR foram inoculadas por diferentes intervalos de tempo (1, 6 e 9 horas) e mantidas na ausência de luz, uma vez que este fator mostrou não afetar a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  (Apêndice, Tabelas A1-A3). Tais homogenatos foram incubados com  $^{15}\text{NO}_2^-$  1 mM, 100 U SOD/mL e o captador de spin. Adicionalmente, o efeito de antimicina-A (Anti-A 100  $\mu\text{M}$ ), um conhecido inibidor do complexo III da cadeia de transporte de elétrons foi avaliado desde que recentemente Tischner et al. (2004) reportaram evidências da participação da mitocôndria na produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  em algas.



**Figura 12.** Produção de  $\bullet\text{NO}$ , quantificada por EPR, em folhas de *A. thaliana* mutante deficiente para NR na presença de diferentes aminoácidos. Os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  foram quantificados de maneira similar à descrita na legenda da Figura 6. Plantas controle e inoculadas com Psm foram mantidas no escuro por 6 h. Homogenatos de folhas foram preparados e incubados com o captador de spin, NADH 1 mM e  $\text{NO}_2^-$  1 mM na presença de L-arginina (Arg) ou L-asparagina (Asp) ou L-glutamina (Gln) ou L-fenilalanina (Phe) nas concentrações indicadas. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Interessantemente, a habilidade de plantas mutantes produzirem uma quantidade aumentada de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  já foi observada após 1 h de inoculação das plantas (Figura 13). Assim, na presença de SOD, incubações de plantas mutantes com  $\text{NO}_2^-$  levou à produção de 160 e 243 pmol/min/mg no controle e em plantas inoculadas com Psm por 1 h, respectivamente. A adição de anti-A diminuiu tais níveis de complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  para 48,3 pmol/min/mg no controle e 34,2 pmol/min/mg em folhas inoculadas com Psm. Isso correspondeu a uma produção de  $\bullet\text{NO}$  dependente do transporte de elétrons da cadeia respiratória mitocondrial de 111,7 e 208,8 pmol/min/mg no controle e nas plantas mutantes inoculadas, respectivamente, indicando uma habilidade de redução de  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  aumentada de 97,1 pmol/min/mg proteína após 1 h de inoculação bacteriana. Esta diferença aumentou para 143 pmol  $\bullet\text{NO}$ /min/mg após 6 h de inoculação com Psm e começou a diminuir 9 h pós-inoculação (133 pmol/min/mg).

Em plantas do tipo selvagem, anti-A também diminuiu a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  (Figura 13). A produção de  $\bullet\text{NO}$  sensível a anti-A foi de 83,7 pmol/min/mg após 6 h de inoculação das plantas e aumentou para 225 pmol/min/mg após 9 h de interação planta-patógeno, contrastando a resposta de plantas mutantes, que neste período já apresentavam atividade mitocondrial redutora de  $\text{NO}_2^-$  diminuída. Estes resultados mostram que uma atividade mitocondrial pode participar na produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  por plantas de *A. thaliana* em resposta a inoculação com Psm.



**Figura 13.** Produção de  $\cdot\text{NO}$ , quantificada por EPR, em folhas de *A. thaliana* selvagem e mutante deficiente para NR em resposta a inoculação com *P. syringae* por diferentes períodos de tempo. Os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  foram quantificados de maneira similar à descrita na legenda da Figura 6. Plantas controle (C) ou inoculadas com Psm (I) foram mantidas no escuro durante os tempos indicados. Homogenatos de folhas foram incubados com o captador de spin, NADH 1 mM,  $\text{NO}_2^-$  1 mM e SOD 100 U/mL. Antimicina-A (Anti-A) e SHAM foram utilizados a 0,1 e 2 mM, respectivamente. **A**, plantas mutantes deficientes para NR; **B**, plantas selvagens. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

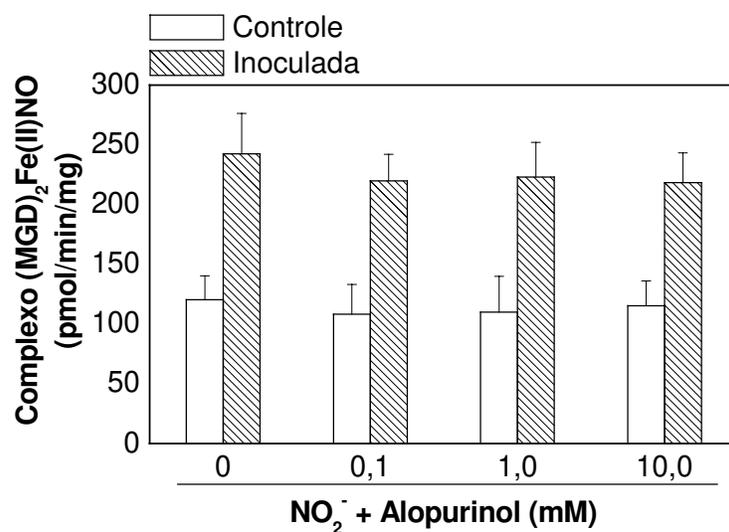
Diferentemente do que foi observado para plantas mutantes defectivas para NR, uma quantidade substancial de  $\bullet\text{NO}$  ainda foi produzida em homogenatos foliares de plantas selvagens na presença de anti-A. Por exemplo, a produção total de  $\bullet\text{NO}$  em homogenatos foliares de plantas selvagens foi de 151,3 e 445,5 pmol/min/mg no controle e em plantas inoculadas com Psm por 9 h, respectivamente, e diminuiu para 132,2 e 210,6 pmol/min/mg, na presença de anti-A.

Em adição aos principais complexos que constituem a cadeia respiratória de mitocôndrias de animais, as mitocôndrias de plantas são capazes de expressar vias alternativas para o transporte de elétrons, que inclui a oxidase alternativa (AOX), uma oxidase terminal diferente do complexo IV (citocromo c oxidase). Esta via para o transporte de elétrons mostrou ser capaz de reduzir  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  em algas deficientes na síntese de NR e NiR (Tischner et al., 2004). Assim, foi avaliado se a atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$  em plantas do tipo selvagem que foi resistente a anti-A poderia ser inibida por ácido salicilhidroxâmico (SHAM), um inibidor específico para AOX. A adição de SHAM na presença de anti-A não causou efeito na produção de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 13). Como esta atividade de síntese de  $\bullet\text{NO}$  resistente à inibição do transporte de elétrons pela cadeia respiratória da mitocôndria é praticamente observada somente em plantas do tipo selvagem, provavelmente tal atividade remanescente de produção de  $\bullet\text{NO}$  se deva à ação da NR sobre o  $\text{NO}_2^-$ .

Em plantas mutantes, a produção do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  em folhas-controle não variou muito com o tempo de acondicionamento no escuro (159,7 pmol/min/mg após 1 h, 160,8 pmol/min/mg após 6 h e 140,0 pmol/min/mg após 9 h). No entanto, a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  aumentou cerca de 33% (322,6

pmol/min/mg) 6 h após a inoculação de Psm nas plantas quando comparada àquela encontrada em plantas sob inoculação por 1 h (242,7 pmol/min/mg). Esta produção praticamente permaneceu constante por até 9 h sendo observado um decréscimo nos níveis de  $(MGD)_2Fe(II)NO$  em torno de 10 % neste período de inoculação (291,0 pmol/min/mg). Diferentemente da mutante *nia1 nia2*, homogenatos de folhas de plantas do tipo selvagem dobraram os níveis de  $\bullet NO$  após 9 h de inoculação (445,5 pmol/min/mg) em comparação às plantas inoculadas por 6 h (de 212,5 pmol/min/mg) (Figura 13).

Além da mitocôndria, xantina oxidase (XO), uma enzima envolvida no metabolismo de purinas também pode catalisar a conversão de  $NO_2^-$  a  $\bullet NO$  (Godber et al., 2000; Sauer and Frébort, 2003; Li et al., 2004). Para verificar a possibilidade de contribuição desta enzima na síntese de  $\bullet NO$  a partir de  $NO_2^-$  durante a interação *A. thaliana-P.syringae*, experimentos utilizando alopurinol, um inibidor específico para XO, foram realizados. Como pode ser observado na Figura 14, a utilização de alopurinol (0,1 a 10 mM) causou uma diminuição pouco significativa (< 10%) nos níveis do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$ . Este resultado indica que a enzima XO não tem uma contribuição relevante para a produção de  $\bullet NO$  a partir de  $NO_2^-$  sob as condições experimentais aqui descritas.



**Figura 14.** Efeito do alogpurinol na produção de  $\bullet\text{NO}$ , quantificada por EPR, em folhas de *A. thaliana* mutante deficiente para NR. Os níveis do complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  foram quantificados de maneira similar à descrita na legenda da Figura 6. Plantas controle e inoculadas com Psm foram mantidas no escuro por 6 h. Homogenatos de folhas foram preparados e incubados com o captador de spin, NADH 1 mM e  $\text{NO}_2^-$  1 mM na ausência ou presença de alogpurinol nas concentrações indicadas. Os valores mostrados representam a média  $\pm$  EPM de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

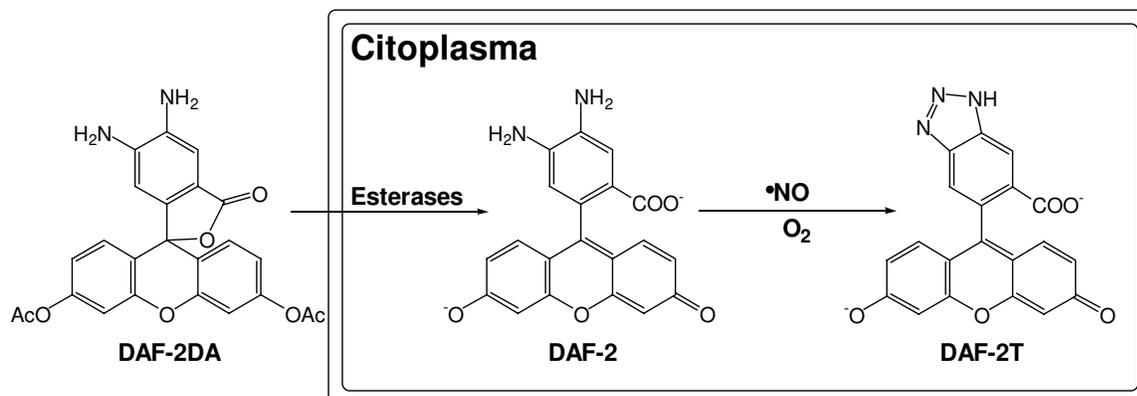
Uma importante possibilidade a excluir nas condições experimentais adotadas neste sistema é a produção do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  através da redução direta de  $NO_2^-$  pelo complexo  $(MGD)_2Fe(II)$  (Tsuchiya et al., 2000). Esta possibilidade foi examinada através da realização de experimentos-controle, incubando homogenatos de folhas de plantas selvagens e plantas mutantes, previamente fervidos por 8 min (controle ou inoculadas), na presença de  $NO_2^-$  e do captador de spin. Análise por EPR dessas incubações mostrou níveis de  $(MGD)_2Fe(II)^{15}NO$  menores que 25 pmol/min/mg proteína na presença de  $^{15}NO_2^-$  (Apêndice, Figura 1F) e ausência deste complexo em homogenatos incubados apenas com o captador de spin e NADH 1 mM (Apêndice, Figura 1A e 1B). Estes resultados indicam que menos de 20% do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  formado em homogenatos incubados com  $NO_2^-$  pode ser originado a partir da redução direta deste ânion pelo captador de spin  $(MGD)_2Fe(II)$ , sob as condições experimentais descritas. Adicionalmente, a incubação de suspensão aquosa de Psm com  $^{15}NO_2^-$  e  $(MGD)_2Fe(II)$  forneceu um resultado similar ( $21,7 \pm 3,1$  pmol  $^{15}NO$ /min/mg) àquele obtido para homogenatos fervidos mostrando que o  $\bullet NO$  gerado no meio de incubação é oriundo da planta e não da bactéria (Apêndice, Figura 1E).

Estes resultados fortemente indicam que a maioria do  $\bullet NO$  em folhas de *A. thaliana* é produzida por uma atividade redutora de  $NO_2^-$  diferente da atividade NR, embora haja uma maior contribuição desta enzima em plantas do tipo selvagem 9 h após inoculação com Psm. Relevantemente, esta atividade redutora de  $NO_2^-$  é aumentada após a inoculação das plantas com Psm indicando que tal atividade produtora de  $\bullet NO$  está envolvida na resposta de *A. thaliana* ao ataque de *P. syringae*. Interessantemente esta produção aumentada de  $\bullet NO$  em folhas de *A. thaliana* sob

inoculação com Psm é fortemente inibida pela presença de antimicina-A, sugerindo uma participação relevante da cadeia respiratória de mitocôndrias no processo de síntese deste radical livre sob as condições experimentais aqui relatadas.

#### **4.5. Produção de $\bullet$ NO detectada com DAF-2DA**

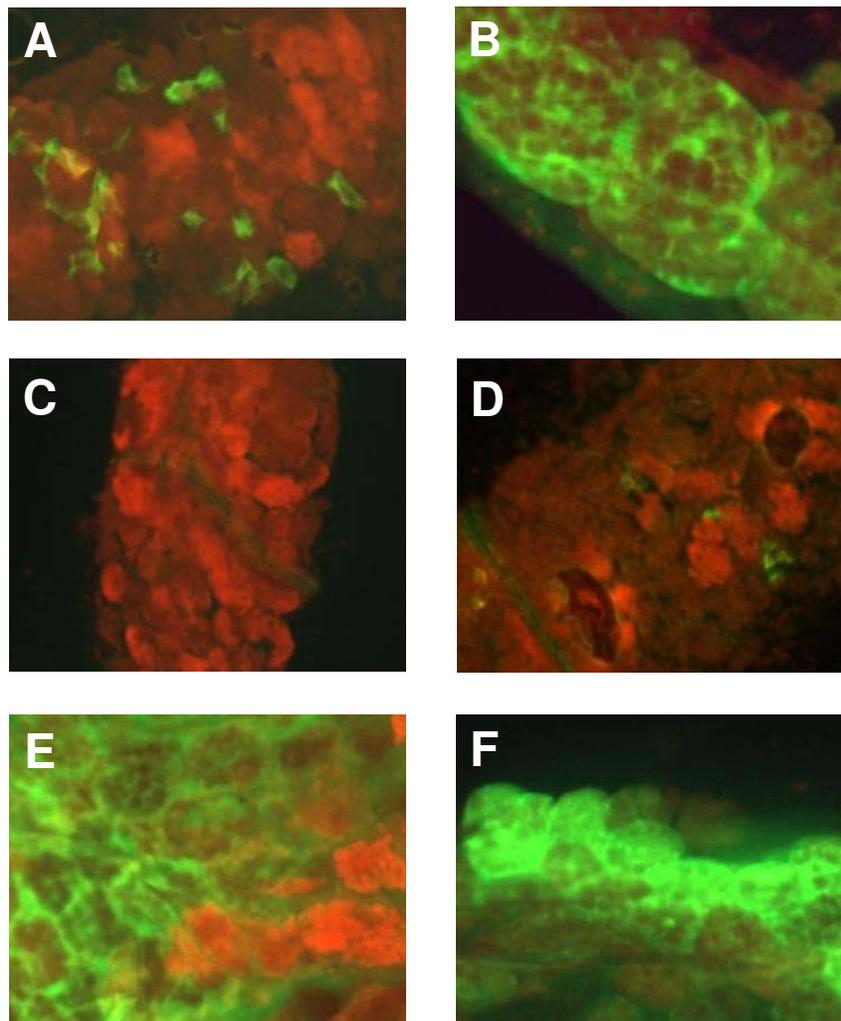
A produção de  $\bullet$ NO, bem como o efeito de L-arginina e  $\text{NO}_2^-$  sobre a síntese deste radical livre em *A. thaliana* foi avaliada *in vivo* empregando o marcador 4,5 diaminofluoresceína diacetato (DAF-2DA). O DAF-2DA é um composto que facilmente se difunde para dentro de células e tecidos onde esterases não-específicas hidrolisam os resíduos diacetato gerando o 4,5 diaminofluoresceína (DAF-2) que permanece confinado no espaço intracelular. O DAF-2 reage com o  $\bullet$ NO do meio na presença de  $\text{O}_2$  produzindo triazolofluoresceína (DAF-2T) (Tarpey et al., 2004), um composto que emite uma fluorescência verde esmeralda (Figura 15).



**Figura 15:** Representação esquemática das reações envolvendo o marcador DAF-2DA para a detecção de  $\bullet\text{NO}$  *in vivo* por microscopia de fluorescência.

Cortes finos obtidos a partir de folhas de ambos os genótipos, controle ou inoculadas por 6 h, foram incubados com DAF-2DA e visualizados por microscopia de fluorescência. Adicionalmente, folhas de plantas deficientes para NR (controle) foram infiltradas com L-arginina 1 mM ou  $\text{NO}_2^-$  1 mM por 3 h e incubadas com DAF-2DA. Folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem apresentaram uma produção basal de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 16A) que aumentou substancialmente a partir da inoculação destas plantas com Psm, como determinado pela intensidade de fluorescência verde (Figura 16B). Em contraste, plantas defectivas para NR não apresentaram qualquer sinal de fluorescência, mesmo aquelas inoculadas com Psm (Figura 16C e 16D). Contudo, quando folhas de plantas mutantes foram infiltradas com L-arginina 1 mM houve uma emissão de fluorescência indicando a síntese de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 16E). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos para a atividade NOS (Figura 1). Assim, L-arginina é convertida a L-citrulina com liberação de  $\bullet\text{NO}$  que é detectado utilizando DAF-2DA, mas não por EPR devido ao limite de detecção deste método

espectroscópico. Isso porque a atividade NOS não é alta o suficiente para gerar  $\bullet\text{NO}$  detectável por EPR. Ainda, a infiltração de  $\text{NO}_2^-$  em plantas mutantes promoveu uma emissão intensa de fluorescência indicando que tal substrato induz uma maior produção de  $\bullet\text{NO}$  (Figura 16F) que a L-arginina. Este resultado corrobora aqueles obtidos por EPR onde  $\text{NO}_2^-$  induz uma elevada produção de  $\bullet\text{NO}$  tanto em plantas selvagens quanto nas mutantes (Figura 11).

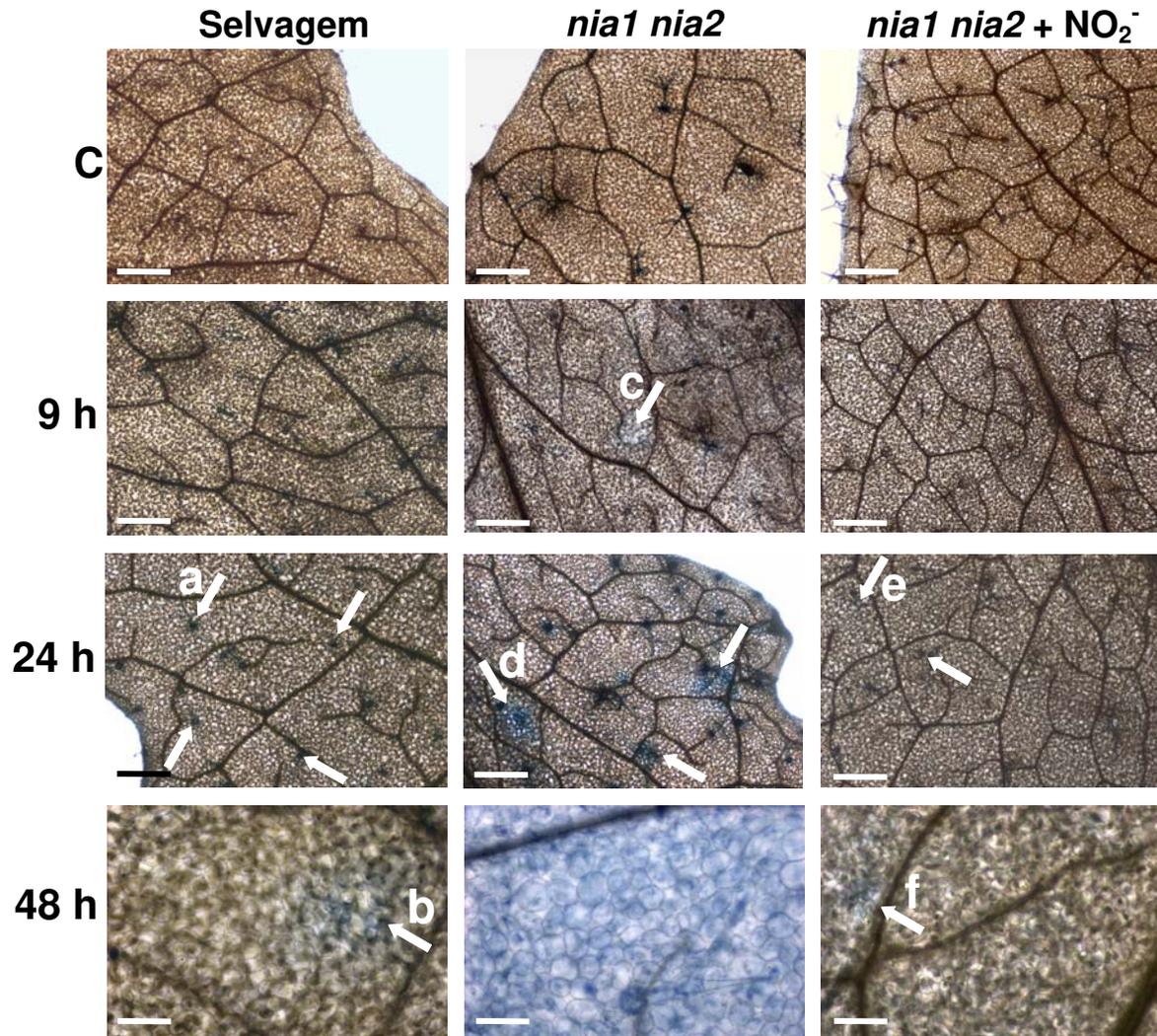


**Figura 16.** Produção *in vivo* de  $\cdot\text{NO}$  em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem e mutante deficiente para NR. Plantas controle e inoculadas com Psm foram mantidas no escuro por 6 h. Cortes finos a partir das folhas foram incubados com DAF-2DA 10  $\mu\text{M}$  e analisados ao microscópio de fluorescência. **A**, selvagem (controle); **B**, selvagem (inoculada); **C**, mutante (controle); **D**, mutante (inoculada); **E**, mutante (controle) infiltrada com L-arginina 1 mM e mantida no escuro por 3 h; **F**, mutante (controle) infiltrada com  $\text{NO}_2^-$  1 mM e mantida no escuro por 3 h. As imagens são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

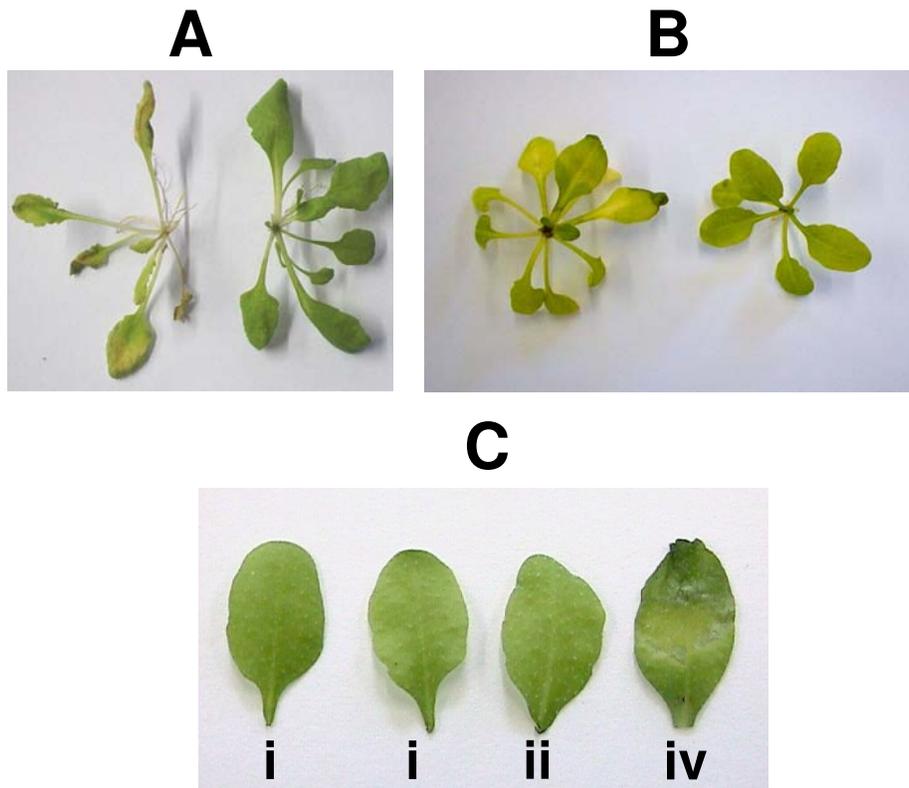
#### **4.6. Influência da enzima NR sobre a morte celular em *A. thaliana* durante sua interação com *P. syringae***

Para determinar se a deficiência nos genes *NIA1 NIA2* afeta a resposta de *A. thaliana* ao ataque de *P. syringae*, a progressão da morte celular seguindo a inoculação de Psm em folhas de plantas selvagens e mutantes defectivas para NR foi monitorado. Para tal, as plantas foram infiltradas com Psm e/ou com  $\text{NO}_2^-$  (quando indicado) e acondicionadas no escuro por diferentes períodos de tempo, após os quais as folhas foram coletadas e incubadas com o corante vital azul de tripan. Foram consideradas células mortas as que incorporaram o corante.

A Figura 17 mostra que plantas do tipo selvagem começaram apresentar pequenos pontos de morte celular somente 24 h após inoculação com Psm (setas “a”). Por outro lado, discreta morte celular foi visualizada após 9 h de inoculação das plantas deficientes para NR com Psm (seta “c”), e o percentual de células que incorporaram o corante azul de tripan aumentou consideravelmente com o tempo de exposição das plantas à bactéria (setas “d”). Quarenta e oito horas pós-inoculação, as plantas mutantes já apresentavam um grande número de células mortas que conferiram lesões vistas a olho nu (Figura 18A) enquanto que as lesões microscópicas localizadas visualizadas nas plantas selvagens não evoluíram mesmo 60 h após inoculação com Psm. Estes resultados mostraram que plantas defectivas para NR são incapazes de desenvolver a resposta de hipersensibilidade a Psm, em contraste às plantas do tipo selvagem.



**Figura 17.** Morte celular em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem e de mutante deficiente para NR inoculadas com *P. syringae*. Controle (C) e plantas inoculadas com Psm foram acondicionadas no escuro por diferentes períodos de tempo, como especificado. As folhas foram então coletadas e incubadas com o corante vital azul de tripan. Os controles se referem a folhas infiltradas com H<sub>2</sub>O por 60 h (duas primeiras colunas) ou com NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 50 μM em tampão fosfato (última coluna). As barras na última linha correspondem a 100 μm enquanto que as demais correspondem a 500 μm. As imagens são representativas de dois experimentos independentes realizados em triplicata.



**Figura 18.** Imagens de folhas de *A. thaliana* dos tipos selvagem e mutante deficiente para NR após 48 h de inoculação com *P. syringae*. Tecidos foliares foram infiltrados com Psm ou com Psm +  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  e acondicionados por 48 h na ausência de luz. **A**, imagem à esquerda refere-se à mutante inoculada com Psm e aquela à direita refere-se à selvagem inoculada com Psm; **B**, imagem à esquerda refere-se à mutante inoculada com Psm em tampão fosfato. Imagem à direita destaca uma planta mutante co-infiltrada com Psm e  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato; **C**, experimento-controle onde folhas de plantas mutantes foram infiltradas com tampão fosfato (i) ou com  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato (ii) ou com Psm +  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  em tampão fosfato (iii) ou com Psm em tampão fosfato (iv). Imagens mostram resultados representativos de dois experimentos independentes realizados em triplicata.

Contudo, quando plantas mutantes foram co-infiltradas com Psm e  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  (5 nmol  $\text{NO}_2^-/100 \mu\text{L}$ ), a morte celular foi prevenida (Figura 17). Somente após 48 h de exposição a Psm e  $\text{NO}_2^-$  estas plantas começaram a apresentar um pequeno número de células que incorporaram o corante vital (Figura 17, seta “e”). Plantas controle (selvagens ou mutantes) infiltradas com  $\text{H}_2\text{O}$  ou plantas mutantes deficientes para NR infiltradas com  $\text{NO}_2^-$  50  $\mu\text{M}$  somente, não apresentaram qualquer sintoma de morte celular (Figura 17, controle) visto nas plantas mutantes infiltradas com a bactéria. Assim, a concentração de  $\text{NO}_2^-$  empregada não foi tóxica às plantas (Figura 18B e 18C). Adicionalmente, a habilidade do  $\text{NO}_2^-$  em prevenir a morte celular em folhas de plantas deficientes para NR não é devido a uma ação bactericida direta, desde que a concentração utilizada nos experimentos (50  $\mu\text{M}$ ) não afetou o crescimento de *P. syringae* (Figura 19).

O conjunto destes resultados indica que *A. thaliana* mutante deficiente para NR não consegue se defender do ataque de Psm, diferentemente das plantas do tipo selvagem. Contudo, o fornecimento de  $\text{NO}_2^-$  às plantas mutantes é capaz de atenuar a disseminação de *P. syringae* nas folhas destas plantas.



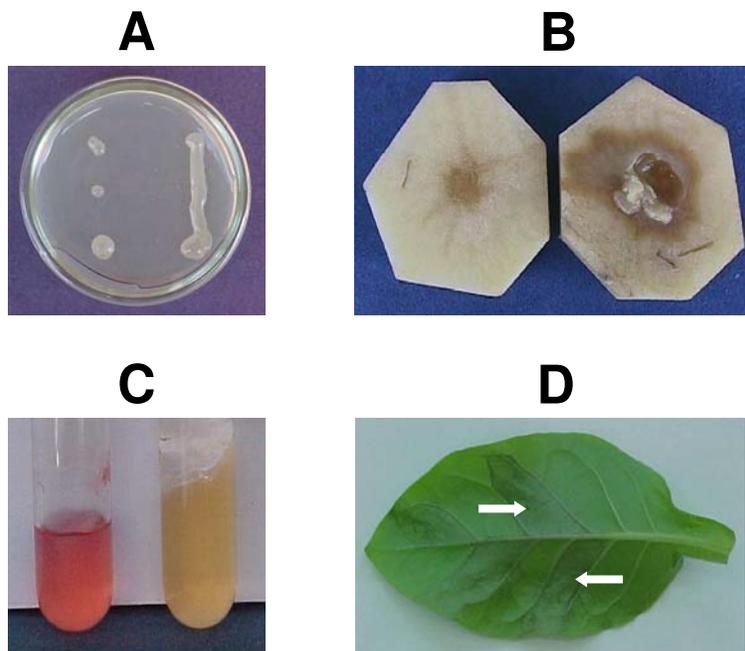
**Figura 19.** Efeito do  $\text{NO}_2^-$  sobre o crescimento da bactéria *P. syringae* pv. *maculicola*. Suspensão aquosa de Psm, utilizada nos ensaios de morte celular em folhas de *A. thaliana* foi incubada na ausência (i) ou na presença de  $\text{NO}_2^-$  25  $\mu\text{M}$  (ii), 50  $\mu\text{M}$  (iii) ou 100  $\mu\text{M}$  (iv) por 48 h. Com o auxílio de uma alça de platina, uma pequena alíquota de cada suspensão foi plaqueada em meio nutriente ágar e incubada por mais 48 h em condições de crescimento bacteriano.

#### 4.7. Identificação da cultura bacteriana

Cultura re-hidratada de *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* foi plaqueada em meio NA para o seu estabelecimento. Mesmo a bactéria fazendo parte de uma coleção onde se tem como critério o armazenamento de culturas sem contaminantes, testes de confirmação da espécie bacteriana (LOPAT) bem como de confirmação da classificação do patovar (testes bioquímicos) foram realizados já que tal cultura foi liofilizada em 1994.

A cultura bacteriana em teste apresentou resultado positivo para a produção de levano, caracterizado pelo desenvolvimento de colônias bacterianas mucóides em alto-relevo (Figura 20A). Este resultado indicou que a bactéria em questão expressa a enzima levano sucrose, capaz de clivar moléculas de sacarose, polimerizando as unidades de frutoses livres resultantes.

Resultado negativo foi observado no teste da oxidase que é usado para determinar a presença de citocromo *c* oxidase. No método utilizado, a enzima citocromo *c* oxidase, que catalisa a oxidação de citocromo *c*, promove a abstração de elétrons do reagente dicloreto de tetrametil-*p*-fenilenediamina, cujo produto de oxidação adquire coloração rósea (Mac Faddin, 1981). Este resultado indicou que a bactéria reativada não apresenta a enzima citocromo *c* oxidase presente na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial.



**Figura 20.** Resultado do teste LOPAT para a classificação da bactéria-teste. **A**, Resultado positivo (formação de colônias mucóides) para o teste de produção de levano; **B**, Resultado do teste de podridão em batata. Imagem à esquerda, resultado negativo para a bactéria em teste; Imagem à direita, controle positivo (*Erwinia chrysanthemi*); **C**, Resultado do teste de atividade arginina dihidrolase. Imagem à esquerda, controle positivo (*P. marginalis*). Imagem à direita, resultado negativo para a bactéria em teste; **D**, Resultado positivo para bactéria-teste na resposta de hipersensibilidade (RH) em folhas de fumo.

O teste da podridão em batata também apresentou resultado negativo. Não foi observado o aparecimento de podridão na região em que foi espalhada uma colônia da bactéria em estudo (Figura 20B). Como controle positivo, foi utilizada cultura de *Erwinia chrysanthemi*.

O teste da arginina dihidrolase permite identificar bactérias que metabolizam L-arginina através da enzima arginina dihidrolase (Lelliott et al., 1966). Resultado negativo, caracterizado pela ausência de alteração da coloração do meio (de amarela para vermelha), foi observado para a bactéria de interesse (Figura 20C). Como esta enzima atua na conversão de L-arginina a L-putrescina (uma diamina) com formação de L-citrulina como um intermediário, este resultado indicou que Psm não apresenta atividade arginina dihidrolase e assim não contribui para a produção de L-citrulina nos ensaios de medida de atividade NOS em folhas de *A. thaliana* inoculadas com esta bactéria.

Reação de hipersensibilidade (RH), caracterizada pelo desenvolvimento de lesão local do tecido vegetal que restringe o crescimento e proliferação do invasor, é originada numa interação incompatível planta-microrganismo (Lamb e Dixon, 1997). Quando folhas de fumo foram inoculadas com suspensão aquosa da bactéria de interesse, RH foi observada após 24 h de incubação das folhas à temperatura ambiente (Figura 20D).

Assim, os resultados obtidos no teste LOPAT (Levano, Oxidase, Podridão da batata, Arginina dihidrolase e reação de hipersensibilidade em Tabaco) possibilitaram determinar que a espécie da *Pseudomonas* em estudo é *syringae* (Lelliott et al., 1966).

Após a realização do teste LOPAT, ensaios bioquímicos foram conduzidos para se classificar a que patovar a *Pseudomonas syringae* estudada pertence. Os resultados dos testes bioquímicos são apresentados na Tabela I.

No teste de produção de pigmento fluorescente, foi observada a presença de colônias fluorescentes à luz UV decorrentes da síntese de fluoresceína pela bactéria em estudo quando cultivada em meio B de King.

Ausência de formação de bolhas, como um resultado da liberação de  $O_2$ , quando a bactéria interagiu com solução de  $H_2O_2$  indicou que o microrganismo de interesse não possui a enzima catalase que promove a conversão de  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$ .

A produção de 2-cetogluconato a partir de gluconato foi avaliada utilizando um meio específico para bactérias fluorescentes do gênero *Pseudomonas*. Nenhuma formação de precipitado marron-alaranjado foi observada quando reagente de Benedict foi adicionado ao meio, mostrando que a *P. syringae* estudada não apresenta este metabolismo.

No teste de hidrólise de macromoléculas, a bactéria em estudo não foi capaz de hidrolisar gelatina uma vez que, após o seu crescimento em meio contendo esta macromolécula (21 dias), não foi observada liquefação do sistema. No entanto, resultado positivo foi observado no teste da aesculina que consistiu na diminuição de fluorescência azul decorrente da presença desta macromolécula no meio de cultura. Diminuição da fluorescência foi caracterizada pela hidrólise ácida da aesculina, desencadeada pela bactéria em estudo. Glicose e esculetina foram geradas como produtos desta hidrólise, e esta última, reagindo com o sal de ferro presente no meio

causou o aparecimento de uma coloração marrom e conseqüente diminuição da fluorescência do meio.

Os testes com carboidratos foram realizados visando identificar quais são oxidados para a obtenção de energia tendo como produto final os seus correspondentes ácidos orgânicos. O produto de oxidação causa mudança na coloração do meio, de púrpura para amarela, devido ao aumento da acidez do mesmo.

Os testes com ácidos orgânicos foram realizados visando identificar quais são utilizados como fonte de energia e o produto deste metabolismo causa mudança na coloração do meio, de verde para azul, decorrente do aumento do pH do mesmo.

A capacidade para metabolizar  $\text{NO}_3^-$  foi avaliada através do crescimento da bactéria em meio de cultura contendo este ânion. Após 10 dias a  $28^\circ\text{C}$ , a adição à cultura bacteriana de reagente de Follet e Ratcliff, específico para a detecção de  $\text{NO}_2^-$ , não causou qualquer alteração na coloração deste meio, indicando ausência de  $\text{NO}_2^-$  (Figura 3B). A perda do acúmulo de  $\text{NO}_2^-$  no meio poderia indicar que o  $\text{NO}_3^-$  teria passado por processo de desnitrificação gerando  $^*\text{NO}_2$ ,  $^*\text{NO}$ ,  $\text{NH}_3$  ou  $\text{N}_2$  (Zobell, 1932). Para avaliar esta possibilidade, pequena quantidade de pó de zinco (ponta de espátula) foi adicionada ao meio já contendo o reagente de Follet e Ratcliff. Alteração na coloração do meio de amarela para marrom avermelhada foi observada, indicando que  $\text{NO}_3^-$  estava presente e foi, então, reduzido pelo zinco a  $\text{NO}_2^-$  (Stanier, 1966). Assim, a bactéria Psm não apresenta atividade nitrato redutase (NR) e nem desnitrifica  $\text{NO}_3^-$  a outros produtos o que poderia interferir nos resultados obtidos para folhas de *A. thaliana* inoculadas com a bactéria. A bactéria *Erwinia chrysanthemi* foi utilizada como controle positivo (Figura 3A).

**Tabela I:** Resultados dos testes bioquímicos realizados com Psm.

<b>Testes</b>	<b>IBSBF 1115</b>
Produção de pigmento fluorescente	+
Produção de catalase	-
Produção de 2-cetogluconato	-
Hidrólise de gelatina	-
Hidrólise de aesculina	+
Redução de nitrato a nitrito	-
Produção de ácido a partir de:	
adonitol, D (-) arabinose	-
eritritol, inulina, D (+) maltose	-
D (-) salicina, D (+) trealose	-
L (+) arabinose, D (+) celobiose	+
D-frutose, glicerol, m-inositol	+
lactose, D (-) manitol, sacarose	+
D (-) sorbitol	-
Utilização de sais de ácidos orgânicos:	
benzoato, oxalato	-
DL-lactato, L (+) tartarato	-
citrato, gluconato, glutarato	+
malonato, succinato, D (-) tartarato	+
Betaína	+

A inoculação da bactéria-teste em folhas de couve causou o surgimento de sintomas de doença (clorose nas folhas) ao longo de 30 dias de interação planta-bactéria. Este resultado (não apresentado) demonstra a ocorrência de uma interação compatível típica para couve-*Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* .

De uma maneira geral, os resultados dos testes bioquímicos permitiram classificar a cultura IBSBF 1115 como pertencente ao patovar *maculicola* de acordo com a classificação proposta por Bradbury (1986) e Lelliott et al. (1966).

## 5. DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados mostram que a inoculação de folhas de *A. thaliana* com a bactéria avirulenta *P.syringae* pv. *maculicola* desencadeou a síntese de  $\bullet$ NO na planta (Figuras 1, 5-11, 16) e que esta resposta foi importante para a prevenção da replicação e disseminação do patógeno (Figura 17). O monitoramento da síntese de  $\bullet$ NO *in vivo* utilizando DAF-2DA, a formação de L-[U- $^{14}$ C] citrulina a partir de L-[U- $^{14}$ C] arginina, bem como a formação de complexo (MGD) $_2$ Fe(II)NO a partir de substratos marcados com  $^{15}$ N permitiu demonstrar que nitrito é a principal fonte para a produção de  $\bullet$ NO durante esta interação planta-microrganismo embora a atividade NOS pareça desempenhar um papel regulatório.

A inoculação de Psm em folhas de *A. thaliana* aumentou a produção de L-citrulina a partir de L-arginina tanto em plantas do tipo selvagem quanto naquelas mutantes deficientes para NR (Figura 1) indicando a participação de uma enzima do tipo NOS, como previamente observado em outras interações planta-patógeno tais como fumo-vírus do mosaico do fumo (Durner et al., 1998) e soja-*Diaporthe phaseolorum* (Modolo et al., 2002). Embora a atividade NOS tenha aumentado nas plantas após inoculação com Psm (Figura 1), a mais proeminente fonte de  $\bullet$ NO sob estas condições não foi aquela derivada de atividade desta enzima. Análises por EPR mostraram que plantas do tipo selvagem tiveram uma produção endógena de  $\bullet$ NO na faixa de 50-57 pmol/min/mg proteína que não foi oriunda da L-arginina (Figuras 5 e 6). De fato, a produção de  $\bullet$ NO a partir de atividade NOS foi muito mais baixa (~12 pmol/min/mg (Figura 1) sendo difícil discriminá-la em experimentos por EPR (Giorgio et

al., 1998; Bonini et al., 1999; Linares et al., 2001) em função do limite de detecção desta técnica espectroscópica. No entanto, a utilização do marcador DAF-2DA possibilitou a detecção de  $\bullet\text{NO}$  (produção de DAF-2T) em plantas mutantes deficientes para NR após infiltração com solução de L-arginina 1 mM (Figura 16).

O  $\bullet\text{NO}$  detectável por EPR nas plantas selvagens, originado a partir de uma fonte endógena, também não foi derivado do  $\text{NO}_3^-$  (Figuras 7 e 8) o que está de acordo com Dordas e colaboradores (2004). Estes autores não detectaram produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_3^-$  em culturas de células de *Zea mays* sob condições aeróbicas, embora  $\bullet\text{NO}$  derivado de  $\text{NO}_3^-$  tenha sido produzido quando as culturas de células foram mantidas sob hipóxia.

Em contraste aos resultados obtidos com L-arginina (Figura 5) e  $\text{NO}_3^-$  (Figura 7), a presença de  $\text{NO}_2^-$  desencadeou um aumento substancial nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  detectável por EPR em homogenatos de folhas de plantas controle e inoculadas com Psm (Figuras 9-11). De início, esta conversão de  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  poderia ser atribuída à atividade NR, como tem sido proposto na literatura (Yamasaki and Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002; Vanin et al., 2004). Contudo, sob as condições experimentais aqui descritas, muito do  $\bullet\text{NO}$  produzido a partir de  $\text{NO}_2^-$  provavelmente não é oriundo de atividade NR, uma vez que plantas mutantes deficientes nos genes estruturais *NIA1* *NIA2* que codificam a NR produziram níveis de  $\bullet\text{NO}$  similares àqueles produzidos pelas plantas selvagens (Figura 11). Essa produção de  $\bullet\text{NO}$  derivada de  $\text{NO}_2^-$  não é influenciada pela luz (Apêndice, Tabela A3). A presença de antimicina-A nos homogenatos de plantas mutantes inibiu em 82% esta produção de  $\bullet\text{NO}$  derivada do  $\text{NO}_2^-$  e independente da NR (Figura 13), indicando que a cadeia de transporte de

elétrons da mitocôndria é requerida para esta atividade redutora de nitrito. Tal produção de  $\bullet\text{NO}$  derivada de  $\text{NO}_2^-$  e dependente da mitocôndria foi recentemente observada na alga unicelular *Chlorella sorokiniana* (Tischner et al., 2004). Além do mais, já que os níveis basais de  $\bullet\text{NO}$  endógeno em plantas de *A. thaliana* mutantes são desprezíveis, houve uma maior facilidade em determinar que a produção de  $\bullet\text{NO}$  derivada do  $\text{NO}_2^-$  foi mais pronunciada em plantas inoculadas com Psm por 6 h (227 pmol/min/mg) do que em folhas-controle (119 pmol/min/mg) (Figura 11). No entanto, diferença significativa entre plantas inoculadas e plantas-controle somente foi observada em plantas selvagens quando as incubações dos homogenatos de folhas com  $\text{NO}_2^-$  foram realizadas na presença de SOD (Figuras 11 e 13). A enzima SOD previne a reação do  $\bullet\text{NO}$  com  $\text{O}_2^-$  presente no meio (Beckman et al., 1990), cuja produção é aumentada durante interações incompatíveis planta-microrganismo (Lamb e Dixon, 1997). Assim, na presença de SOD, a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  aumentou para 212 pmol/min/mg em plantas selvagens inoculadas com Psm e para 136 pmol/min/mg em folhas controle. Em adição, a incubação de homogenatos de plantas mutantes com SOD tornou ainda mais evidente a diferença de produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  entre folhas inoculadas (312 pmol/min/mg) e folhas controle (155 pmol/min/mg) (Figuras 11 e 13B). Como SOD permitiu obter diferença significativa na síntese de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  todos os experimentos com homogenatos de folhas, utilizando antimicina-A (Anti-A) foram conduzidos na presença desta enzima. Os resultados obtidos com antimicina-A claramente estabelecem que a produção de  $\bullet\text{NO}$  derivada de  $\text{NO}_2^-$  e dependente de mitocôndria compreende uma importante resposta de defesa de *A. thaliana* contra *P. syringae*.

No entanto, foi demonstrada para outras espécies que a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir da atividade NR ocorre em tecidos onde a concentração de  $\text{NO}_2^-$  é alta (Morot-Gaudry-Talarnain et al., 2002; Rockel et al., 2002) e que plantas transgênicas expressando a enzima NR permanentemente ativada apresentam uma emissão de  $\bullet\text{NO}$  consideravelmente aumentada (Lea et al., 2004). De fato, o efeito inibitório da antimicina-A na síntese de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  foi de 65% em homogenatos foliares de plantas do tipo selvagem (Figura 13) enquanto que em plantas mutantes esta inibição foi mais acentuada (82%). Considerando que, dos 35% de  $\bullet\text{NO}$  formado que foram resistentes à antimicina-A, cerca de 10 a 20% podem ser oriundos da redução direta do  $\text{NO}_2^-$  pelo complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)}$ , como demonstrado nos experimentos realizados com homogenatos fervidos incubados com  $\text{NO}_2^-$  (produção de  $\sim 25$  pmol  $\bullet\text{NO}/\text{min}/\text{mg}$ ). Dessa maneira, a atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$  da enzima NR contribuiria com menos de 25% para produção total de  $\bullet\text{NO}$  na interação entre *A. thaliana* do tipo selvagem e *P. syringae*. Assim, embora a participação da mitocôndria seja bem mais expressiva, a atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  apresentada pela NR, também deve ser considerada na interação *A. thaliana-P. syringae*. A enzima NR mostrou mediar a síntese de  $\bullet\text{NO}$  induzida por ácido abscísico (ABA) em células guarda de *A. thaliana* utilizando  $\text{NO}_2^-$  como substrato (Desikan et al., 2002). Nitrito e ABA induziram o fechamento de estômato em plantas do tipo selvagem num processo dependente da concentração de  $\text{NO}_2^-$  enquanto que nenhum efeito da adição destes compostos foi observado em plantas mutantes *nia1 nia2*, deficientes na síntese de NR.

Embora a síntese de  $\bullet\text{NO}$  via redução de  $\text{NO}_2^-$  possa ocorrer por processos não enzimáticos (Klepper, 1990; Tsuchiya et al., 2000), esta rota foi significativamente

limitada sob as condições experimentais aqui adotadas. Homogenatos ativos de folhas de plantas de ambos os genótipos produziram níveis do complexo  $(MGD)_2Fe(II)NO$  10 vezes maiores (Figuras 11 e 13) que aqueles encontrados para homogenatos fervidos (25 pmol/min/mg).

Adicionalmente à atividade mitocondrial, outras enzimas poderiam estar envolvidas no processo de síntese de  $\bullet NO$  a partir de  $NO_2^-$ . Nitrito redutase (NiR) presente em cloroplastos reduz  $NO_2^-$  a  $NH_4^+$  usando ferredoxina como um doador de elétrons. Esta enzima contém um siroheme e um centro  $[4Fe-4S]$  como grupos prostéticos. Recentemente, evidência espectroscópica forneceu um estado intermediário em que um nitrosil-Fe(II) siroheme é formado durante o ciclo catalítico da enzima NiR, purificada a partir de cloroplastos de espinafre (Kuznetsova et al., 2004). Contudo, recentes relatos mostram que plantas de fumo contendo uma seqüência anti-senso para NiR (Morot-Gaudry-Talarmain et al., 2004), bem como a alga verde *Chlorella sorokiniana* (Tischner et al., 2004) acumulam  $NO_2^-$  e, portanto, emitem uma quantidade elevada de  $\bullet NO$ . Baseando-se nestas observações, parece pouco provável que NiR seja responsável por esta importante atividade produtora de  $\bullet NO$  em *A. thaliana* seguindo inoculação com Psm.

Em adição a NiR como uma possível fonte de  $\bullet NO$  via redução de  $NO_2^-$  é proposto que uma enzima ligada à membrana plasmática apresente tal atividade (Stöhr et al., 2001). Contudo, essa enzima foi identificada somente em tecidos de raízes de plantas de fumo não sendo justificável a sua ação na redução de  $NO_2^-$  detectada em folhas de *A. thaliana*. Outra possibilidade seria a enzima xantina oxidase (XO), embora a sua atividade nitrito redutase já tenha sido apenas demonstrada *in vitro* e com

enzimas de origem animal (Godber et al., 2000; Sauer and Frébort, 2003; Li et al., 2004). No entanto, o gene para XO foi recentemente identificado em *A. thaliana* e mostrou apresentar alta homologia (93%) com o de animal (Hesberg et al., 2004). Por isso, a relevância da XO na produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$  durante a interação *A. thaliana*-*P. syringae* foi considerada. Entretanto, alopurinol, um potente inibidor desta enzima, praticamente não teve efeito sobre a atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$  a  $\bullet\text{NO}$  tanto em plantas inoculadas com Psm quanto no grupo controle (Figura 14).

Sabendo-se que  $\text{NO}_2^-$  é a principal fonte de  $\bullet\text{NO}$  em *A. thaliana* durante sua interação com Psm e que a origem de  $\text{NO}_2^-$  depende da atividade NR a partir de redução de  $\text{NO}_3^-$ , é de se supor que plantas mutantes *nia1 nia2* sejam suscetíveis à bactéria Psm. De fato, uma análise da morte celular nas folhas de plantas de ambos os genótipos durante interação com Psm mostrou que mutantes deficientes para NR são suscetíveis à bactéria Psm, permitindo o espalhamento da bactéria nas folhas (Figura 17). Em contraste, pontos de morte celular correspondendo à resposta por hipersensibilidade (Figura 17, setas "a"), vistos em plantas do tipo selvagem após 24 h de interação não aumentaram em tamanho em tempos tardios de inoculação. A suscetibilidade de plantas deficientes na síntese de NR, contudo, foi abolida quando  $\text{NO}_2^-$  foi co-infiltrado com Psm (Figura 17). Estes resultados indicaram um papel relevante para a NR como a fonte de  $\text{NO}_2^-$  requerido para a defesa de *A. thaliana*. Ainda, a resistência de plantas do tipo selvagem provavelmente se deve à sua capacidade em sintetizar  $\text{NO}_2^-$  via atividade NR, bem como à sua habilidade de manter a NOS em máxima atividade por um período de tempo maior que as plantas mutantes (Figura 1). Portanto, um papel para a NOS na resposta de defesa de *A. thaliana* contra

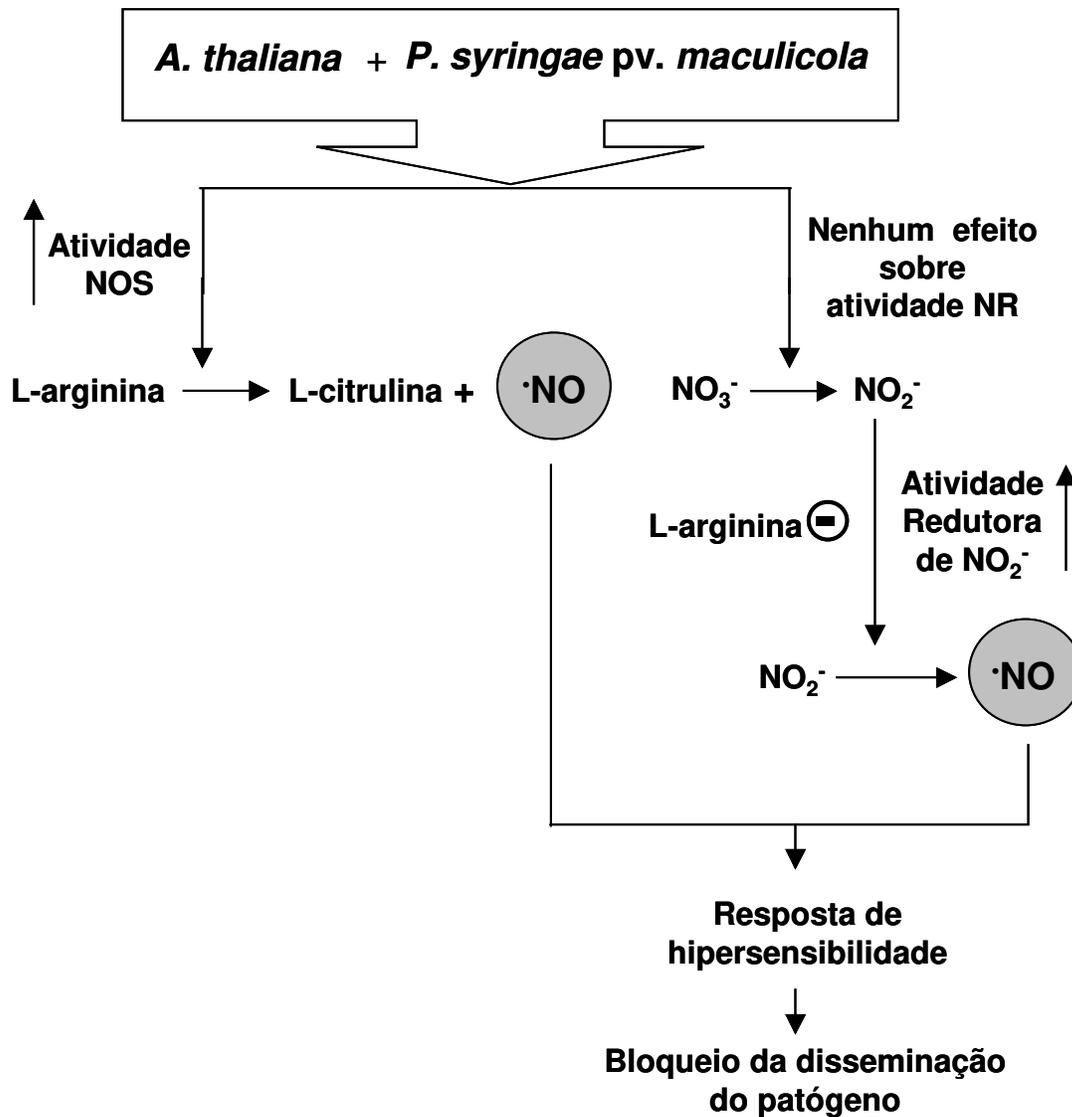
Psm não pode ser excluído. Esta conclusão está de acordo com observação que plantas de *A. thaliana* deficientes na síntese da enzima AtNOS1 são suscetíveis à *P. syringae* pv. *tomato* (Zeidler et al., 2004). No entanto, os resultados aqui apresentados mostram que a atividade NOS não é suficiente para garantir a resposta de defesa de *A. thaliana* contra *P. syringae* pv. *maculicola*, uma vez que plantas mutantes *nia1 nia2*, mesmo apresentando atividade conversora de L-arginina em L-citrulina (Figura 1) não conseguem conter a disseminação da bactéria nas folhas (Figura 17).

Igualmente interessante, os resultados aqui mostrados revelam que altas concentrações de L-arginina (10 mM) atenuaram os níveis de  $\bullet\text{NO}$  endógeno detectáveis por EPR em plantas selvagens (Figuras 7 e 8) bem como os níveis de  $\bullet\text{NO}$  oriundo do  $\text{NO}_2^-$  em ambos os genótipos (Figuras 9-11). Ainda, este efeito parece ser específico para L-arginina desde que outros aminoácidos mesmo na concentração de 10 mM não causaram redução nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  produzido via redução de  $\text{NO}_2^-$  (Figura 12). Assim, a L-arginina parece ter um efeito regulatório sobre a atividade enzimática responsável pela produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$ . Estudos prévios mostram que os níveis de aminoácidos, o produto final do processo de assimilação de  $\text{NO}_3^-$ , são fortemente reduzidos em plantas de tabaco transgênicas com baixa atividade NR (Hänsch et al., 2001). Estes relatos e o fato de que as plantas de *A. thaliana* deficientes na síntese de NR foram cultivadas na ausência de  $\text{NO}_3^-$  sugerem que estas mutantes provavelmente apresentam conteúdo reduzido de aminoácidos, incluindo L-arginina. Ainda, a produção *in situ* de  $\bullet\text{NO}$  por plantas mutantes deficientes para NR foi apenas visualizada após a infiltração das folhas com L-arginina 1 mM (Figura 16E). Os níveis reduzidos de L-arginina favoreceriam a alta produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$

quando plantas mutantes são inoculadas com Psm (Figuras 10 e 11). Em contraste, os elevados níveis de L-arginina em plantas de *A. thaliana* do tipo selvagem manteriam a atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$  em um estado inibido, o que explicaria o fato de a atividade NOS nestas plantas ser mantida por um período de tempo maior (até 9 h após inoculação) quando comparada às plantas mutantes (Figura 1). Realmente, os níveis de  $\bullet\text{NO}$  derivado do  $\text{NO}_2^-$  em plantas do tipo selvagem praticamente dobraram 9 h após a inoculação bacteriana quando comparado aos níveis obtidos para as plantas sob 6 h de interação com a bactéria (Figura 13). Já nas plantas mutantes, os níveis de  $\bullet\text{NO}$  derivado do  $\text{NO}_2^-$  começaram diminuir após 9 h de inoculação (Figura 13) e foram substancialmente menores (291,5 pmol/min/mg) que aqueles apresentados por plantas do tipo selvagem sob o mesmo período de inoculação com Psm (445,5 pmol/min/mg proteína). Provavelmente a diminuição nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  derivado de  $\text{NO}_2^-$  nas plantas mutantes após 9 h de inoculação se deve ao quadro de morte celular que estas plantas já começam apresentar neste período de tempo (Figura 17).

Medidas *in situ* da produção de  $\bullet\text{NO}$  permitiram mostrar que uma quantidade substancial deste radical livre é produzida em resposta à inoculação bacteriana em plantas do tipo selvagem, não sendo o caso para as plantas mutantes (Figura 16) porque elas provavelmente não possuem os substratos em quantidade suficiente para tal síntese, L-arginina e  $\text{NO}_2^-$ . A suplementação das folhas de plantas mutantes com estes substratos promove a produção de  $\bullet\text{NO}$  tanto *in vivo* (Figura 16) quanto *in vitro* (Figuras 1 e 4). Dessa forma, os baixos níveis endógenos destes substratos necessários à síntese de  $\bullet\text{NO}$  possivelmente explicam a suscetibilidade de *A. thaliana* mutante *nia1 nia2* à *P. syringae* (Figura 17).

Em conclusão, o conjunto de resultados obtidos no desenvolvimento desta pesquisa fortemente indica a existência de um mecanismo cooperativo entre, pelo menos três atividades enzimáticas para produzir  $\bullet\text{NO}$  em quantidade suficiente para que plantas de *A. thaliana* se defendam contra o ataque de *P. syringae* (Figura 21). Neste mecanismo, a inoculação de Psm em folhas de *A. thaliana* aumentaria a atividade NOS nas plantas e estimularia a conversão de L-Arginina em L-citrulina com concomitante formação de  $\bullet\text{NO}$ . Subseqüentemente, a redução dos níveis de L-arginina estimularia uma atividade redutora de  $\text{NO}_2^-$ , principalmente por uma via dependente da mitocôndria e menos extensivamente via atividade NR, resultando em uma substancial produção de  $\bullet\text{NO}$  pela planta. A enzima NR também seria responsável pelo fornecimento de  $\text{NO}_2^-$  para o sistema gerador de  $\bullet\text{NO}$  a partir de redução deste ânion. Como resultado, plantas de *A. thaliana* seriam capazes de prevenir a proliferação de *P. syringae* ao longo dos seus tecidos.



**Figura 21.** Possível mecanismo cooperativo para a produção de  $\cdot\text{NO}$  por óxido nítrico sintase (NOS), nitrato redutase (NR) e atividade mitocondrial redutora de nitrito em folhas de *A. thaliana* durante interação com *P. syringae* pv. *maculicola*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayers, S.H., Rupp, P., Johnson, W.T.** (1919). A study of the alkali-forming bacteria in milk. United States Department of Agriculture Bulletin, 782.
- Barroso, J.B., Corpas, F.J., Carreras, A., Sandalio, L.M., Valderrama, R., Palma, J.M., Lupiáñez, J.A., del Río, L.A.** (1999). Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *J. Biol. Chem.* **274**, 36729–36733.
- Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., Freeman, B.A.** (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite - implications for endothelial injury from nitric-oxide and superoxide. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Bethke, P.C., Badger, M.R., Jones, R.L.** (2004). Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**, 332-341.
- Bonini, M.G., Radi, R., Ferrer-Sueta, G., da-Costa Ferreira, A.M., Augusto, O.** (1999). Direct detection of the carbonate radical anion produced from peroxynitrite and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* **274**, 10802-1086.
- Boucher, J.L., Genet, A., Vadon, S., Delaforge, M., Henry, Y., Mansuy, D.** (1992). Cytochrome P450 catalyzes the oxidation of N<sup>w</sup>-hydroxy-L-arginine by NADPH and O<sub>2</sub> to nitric oxide and L-citrulline. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **187**, 880-886.
- Bradbury, J.F.** (1986). Guide to plant pathogenic bacteria. (Kew: CAB International), pp. 332.
- 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.

- Butt, Y., Lum, J., Lo, S.** (2003). Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. *Planta* **216**, 762-771.
- Chandok, M.R., Yetterberg, A.J., van Wijk, K.J., Klessig, D.F.** (2003). The pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* **113**, 469-482.
- Chang, H.C.P., Sorger, G.J.** (1976). Effect of ammonium ions on the induction of nitrite reductase in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.* **126**, 1002-1004.
- Clarke, A., Desikan, R., Hurst, R.D., Hancock, J.T., Neill, S.J.** (2000). NO way back: nitric oxide and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana* suspension cultures. *Plant J.* **24**, 667-677.
- Cooney, R.V., Harwood, P.J., Custer, L.J., Franke, A.A.** (1994). Light-mediated conversion of nitrogen-dioxide to nitric-oxide by carotenoids. *Environ. Health Perspectives* **102**, 460-462.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quirós, M., León, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R. Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gómez, M. and del Río, L.A.** (2004). Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiol.* **136**, 2722-2733.
- Cueto, M., Hernández-Perera, O., Martín, R., Bentura, M.L., Rodrigo, J., Lamas, S, Golvano, M.P.** (1996). Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Lett.* **398**, 159-164.
- Dangl, J.L., Dietrich, R.A., Richberg, M.H.** (1996). Death don't have no mercy: cell death programs in plant-microbe interactions. *Plant Cell* **8**, 1793-1807.

- Delledonne, M., Xia, Y.J., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998). Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**, 585-588.
- 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. Nat. Acad. Sci. USA* **98**, 13454-13459.
- Dembinski, E., Wisniewska, I., RaczynskaBojanowska, K.** (1996). The efficiency of protein synthesis in maize depends on the light regulation of the activities of the enzymes of nitrogen metabolism. *J. Plant Physiol.* **149**, 466-468.
- 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. Nat. Acad. Sci* **99**, 16314-16318.
- Dordas, C., Hasinoff, B.B., Rivoal, J., Hill, R.D.** (2004). Class-1 hemoglobins, nitrate and NO levels in anoxic maize cell-suspension cultures. *Planta* **219**, 66-72.
- Durner, J., Wendehenne, D., Klessig, D.F.** (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **95**, 10328-10333.
- Ferrer, M.A., Ros-Barceló, A.** (1999). Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by the xylem of *Zinnia elegans*. *Plant Cell Environ.* **22**, 891-897.
- Foissner, I., Wendehenne, D., Langebartels, C., Durner, J.** (2000). *In vivo* imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *Plant J.* **23**, 817-824.

- Garcia-Mata, C., Gay, R., Sokolovski, S., Hills, A., Lamattina, L., Blatt, M.R.** (2003). Nitric oxide regulates K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **100**, 11116-11121.
- Giorgio, S., Linares, E., Ischiropulos, H., Von Zuben, J., Yamada, A.T., Augusto, O.** (1998). *In vivo* formation of electron paramagnetic resonance-detectable nitric oxide and of nitrotyrosine is not impaired during murine leishmaniasis. *Infect. Immun.* **66**, 807-814.
- Godber, B.L.J., Doel, J.J., Sapkota, G.P., Blake, D.R., Stevens, C.R., Eisenthal, R., Harrison, R.** (2000). Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **275**, 7757-7763.
- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, A.C.N., Martins, I.S.** (1997). NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul.* **21**, 183-187.
- Graziano, M., Beligni, M.V., Lamattina, L.** (2002). Nitric oxide improves internal iron availability in plants. *Plant Physiol.* **130**, 1852-1859.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnock, J.S. Tannenbaum, S.R.** (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Guo, F-Q., Okamoto, M., Crawford, N.M.** (2003). Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**, 100-103.
- Grubisic, D., Konjevic, R.** (1992). Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Planta* **181**, 239-243.

- Hänsch, R., Fessel, D.G., Witt, C., Hesberg, C., Hoffmann, G., Walch-Liu, P., Engels, C., Kruse, J., Rennenberg, H., Kaiser, W.M., Mendel, R-R.** (2001). Tobacco plants that lack expression of functional nitrate reductase in roots show changes in growth rates and metabolite accumulation. *J. Exp. Bot.* **52**, 1251-1258.
- He, Y.K., Tang, R-H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L.F., Yang, Z-G., Chen, L-G., Guo, F-Q, Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M., Pei, Z.M.** (2004). Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**, 1968-1971.
- Hesberg, C., Hänsch, R., Mendel, R-R., Bittner, F.** (2004). Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**, 13547-13554.
- Hu, X.Y., Neill, S.J., Cai, W.M., Tang, Z.C.** (2003). Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Functional Plant Biol.* **30**, 901-907.
- Huang, H., 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.
- Huang, J.S., Knopp, J.A.** (1998). Involvement of nitric oxide in *Ralstonia solanacearum*-induced hypersensitive reaction in tobacco. In *Bacterial Wilt Disease: Molecular and Ecological Aspects*, P.H. Prior, C. Allen, J.G. Elphinstone, eds (Berlin: Springer Verlag), pp. 218-224.

- Huang, S., Kerschbaum, H.H., Engel, E., Hermann, A.** (1997). Biochemical characterization and histochemical localization of nitric oxide synthase in the nervous system of the snail, *Helix pomatia*. *J. Neurochem.* **69**, 2516-2528.
- Keeley, J.E., Fotheringham, C.J.** (1997). Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* **276**, 1248-1250.
- King, E.O., Ward, M.K., Raney, D.E.** (1954). Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clinical Med.* **44**, 301-307.
- Klement, Z.** (1963). Rapid detection of pathogenicity of phytopathogenic pseudomonads. *Nature* **199**, 299-300.
- Klement, Z., Rudolph, K., Sands, D.C.** (1990). *Methods in Phytopatology*. (Budapest: Akadémiai Kiadó and Nyomda Vállalat), pp. 97-100.
- Klepper, L.** (1990). Comparison between NO<sub>x</sub> evolution mechanisms of wild type and *NR1* mutant soybean leaves. *Plant Physiol.* **93**, 26-32.
- Klessig, D.F., Durner, J., Noad, R.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **97**, 8849-8855.
- Klessig, D.F., Ytterberg, A.J., van Wijk, K.J.** (2004). Retraction: pathogen-inducible nitric oxide synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell*, **119**, 445.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., and Nagano, T.** (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* **70**, 2446–2453.

- Komarov, A.M., Lai, C.S.** (1995). Detection of nitric-oxide production in mice by spin-trapping electron-paramagnetic-resonance spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1272**, 29-36.
- Kovacs, N.** (1956). Identification of *Pseudomonas pyocynea* by the oxidase reaction, *Nature*, **178**, 703.
- Kuznetsova, S., Knaff, D.B., Hirasawa, M., Lagoutte, B., Sétif, P.** (2004). Mechanism of spinach chloroplast ferredoxin-dependent nitrite reductase: spectroscopic evidence for intermediate states. *Biochem.* **43**, 510-517.
- Lam, E., Kato, N., Lawton, M.** (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* **411**, 848-853.
- Lamb, C., Dixon, R.A.** (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 251-275.
- Lamotte, O., Gould, K., Lecourieux, D., Sequeira-Legrand, A., Lebrun-Garcia, A., Durner, J., Pugin, A., Wendehenne, D.** (2004). Analysis of nitric oxide signaling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. *Plant Physiol.* **135**, 516-529.
- Lea, P.J.** (1997). Primary nitrogen metabolism. In *Plant Biochemistry*, P.M. Dey, J.B. Harborne eds (San Diego: Academic Press), pp. 273-306.
- Lea, P.J, Robinson, S.A., Stewart, G.R.** (1990). Intermediary nitrogen metabolism. In *The Biochemistry of Plants*, B.J. Mifflin, P.J. Lea, eds (New York: Academic Press), pp. 121-158.

- Lea, U.S., ten Hoopen, F., Provan, F., Kaiser, W.M., Meyer, C., Lillo, C.** (2004). Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in high nitrite excretion and NO emission from leaf and root tissue. *Planta* **219**, 59-65.
- Lelliott, R.A., Billing, E., Hayward, A.C.** (1966). A determinative scheme for the fluorescent plant pathogenic pseudomonads. *J. Appl. Bacteriol.* **29**, 470-489.
- Lelliott, R.A., Stead, D.E.** (1987). Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In *Methods in Plant Pathology*, R.A. Lelliott, D.E. Stead, eds (Oxford: Blackwell Scientific Publications), pp. 186-216.
- Leshem, Y.Y., Haramaty, E.J.** (1996). The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn. foliage. *J. Plant Physiol.* **148**, 258-263.
- Leshem, Y.Y., Wills, R.B.H., Ku, V.V.V.** (1998). Evidence for function of the free radical gas nitric oxide (NO) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* **36**, 825-833.
- Levine, M.** (1954). *An introduction to laboratory technique in bacteriology.* (New York: Mcmillan Co), pp. 68-79.
- Li, H.T., Samouilov, A., Liu, X.P., Zweier, J.L.** (2004). Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J. Biol. Chem.* **279**, 16939-16946.
- Linares, E., Giorgio, S., Mortara, R.A., Santos, C.X.C., Yamada, A.T., Augusto, O.** (2001). Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. *Free Rad. Biol. Med.* **30**, 1234-1242.

- Magalhaes, J.R., Monte, D.C, Durzan, D.** (2000). Nitric oxide and ethylene emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **6**, 117-127.
- McDowell, J.J., Dangi, J.L.** (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 79-82.
- Mac Faddin, J.F.** (1981). *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 2nd ed. (Baltimore: Waverly Press, Inc.), pp. 249-259.
- McFarland, J.** (1907). The nephelometer: an instrument for estimating the numbers of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *J. Am. Med. Assoc.* **49**, 1176.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R., Salgado, I.** (2002). Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum* f. sp. *meridionalis*. *Plant Physiol.* **130**, 1288-1297.
- Morant, M. Baky, S., Møllery, B.L., Werck-Reichhart, D.** (2003). Plant cytochromes P450: tools for pharmacology, plant protection and phytoremediation *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 151-162.
- Morot-Gaudry-Talarmain, Y., Rockel, P., Moureaux, T., Quilleré, 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.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473-497.
- Murgia, I., Delledonne, M., Soave, C.** (2002). Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **30**, 521-528.

- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., Hancock, J.T.** (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol.* **128**, 13-16.
- Ninnemann, H., Maier, J.** (1996). Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* **64**, 393-398.
- Noritake, T., Kawakita, K., Doke, N.** (1996). Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. *Plant Cell Physiol.* **37**, 113-116.
- Orozco-Cárdenas, M.L., Ryan, C.A.** (2002). Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. *Plant Physiol.* **130**, 487-493.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L., Lamattina, L.** (2003). Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol.* **132**, 1241-1248.
- Pedroso, M.C., Magalhaes, J.R., Durzan, D.** (2000) Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. *Plant Sci.* **157**, 173-180.
- Rate, D.N., Cuenca, J.V., Bowman, G.R., Guttman, D.S., Greenberg, J.T.** (1999). 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**, 1695-1708.
- Rees, D.D., Cunha, F.Q., Assreuy, J., Herman, A.G., Moncada, S.** (1995). Sequential induction of nitric-oxide synthase by *corynebacterium-parvum* in different organs of the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* **114**, 689-693.

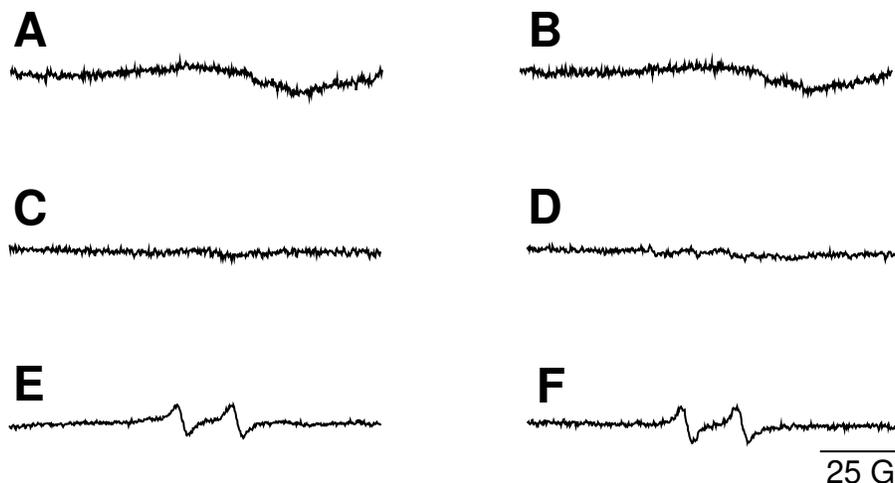
- Ribeiro, E.A., Cunha, F.Q., Tamashiro, M.S.C., Martins, I.S.** (1999). Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.* **445**, 283-286.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., Kaiser, W.M.** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **53**, 103-110.
- Romero-Puertas, M.C., Delledonne, M.** (2003). Nitric oxide signaling in plant-pathogen interactions. *IUBMB Life* **55**, 579-583.
- Sauer, P., Frébort, I.** (2003). Molybdenum cofactor-containing oxidoreductase family in plants. *Biol. Plant.* **46**, 481-490.
- 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.
- Sakihama, Y., Murakami, S., Yamasaki, H.** (2003). Involvement of nitric oxide in the mechanism for stomatal opening in *Vicia faba* leaves. *Biol. Plant.* **46**, 117-119.
- Scherer, G.F.E., Holk, A.** (2000). NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betalaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. *Plant Growth Regul.* **32**, 345-350.
- Sen, S., Cheema, I.R.** (1995). Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. *Biochem. Arch.* **11**, 221-227.
- Stanier, R.Y., Palleroni, N.J., Doudoroff, M.** (1966). The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159-271.

- Stöhr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R., Rockel, P.** (2001). A plasma membrane - bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**, 835-841.
- Stuehr, D.J.** (1997). Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 339-359.
- Su, W., Huber, S.C., Crawford, N.M.** (1996). Identification *in vitro* of a post-translational regulatory site in the hinge 1 region of Arabidopsis nitrate reductase. *Plant Cell* **8**, 519-527.
- Takahashi, S., Yamasaki, H.** (2002). Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. *FEBS Lett.* **51**, 145-148.
- Tarpey, M.M., Wink, D.A., Grisham, M.B.** (2004). Methods for detection of reactive metabolites of oxygen and nitrogen: *in vitro* and *in vivo* considerations. *Am. J. Physiol. - Regul. Integrative and Comparative Physiol.* **286**, R431-R444.
- Tayeh, M.A., Marletta, M.A.** (1989). Macrophage oxidation of L-arginine on nitric oxide, nitrite and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654-19658.
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Thornley, M.J.** (1960). The differentiation of *Pseudomonas* from other gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 37-52.
- 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.

- Tsuchiya, K., Yoshizumi, M., Houchi, H., Mason, R.P.** (2000). Nitric oxide-forming reaction between the iron-*N*-methyl-D-glucamine dithiocarbamate complex and nitrite source. *J. Biol. Chem.* **275**, 1551-1556.
- Tun, N.N., Holk, A., Scherer, G.F.E.** (2001). Rapid increase of NO release in plant cell cultures induced by cytokinin. *FEBS Letters*, **509**, 174-176.
- Vanin, A.F., Huisman, A., Van Faassen, E.E.** (2002). Iron dithiocarbamate as spin trap for nitric oxide detection: pitfalls and successes. *Methods in Enzymol.* **359**, 27-42 2002.
- Vanin, A.F. Liu X., Samouilov A., Stukan R.A., Zweier J.L.** (2000). Redox properties of iron-dithiocarbamates and their nitrosyl derivatives: implications for their use as traps of nitric oxide in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta* **1474**, 365-377.
- Vanin, A.F., Svistunenko, D.A., Mikoyan, V.D., Serezhenkov, V.A., Fryer, M.J., Baker, N.R., Cooper, C.E.** (2004). Endogenous superoxide production and the nitrite/nitrate ratio control the concentration of bioavailable free nitric oxide in leaves. *J. Biol. Chem.* **279**, 24100-24107.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., Durner, J.** (2001). Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**, 177-183.
- 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 characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol. Gen. Genetics* **239**, 289-297.

- 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.
- 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. USA*, **101**, 15811-15816.
- Zobell, C.E.** (1932). Factors influencing the reduction of nitrates and nitrites by bacteria in semisolid media. *J. Bacteriol.* **24**, 273-281.
- 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.

# APÊNDICE



**Figura 1.** Representação dos espectros de EPR de homogenatos de folhas de *A. thaliana* ou suspensão aquosa de *P. syringae* incubados com L-[ $^{15}\text{N}_2$ -guanidineimino] arginina,  $^{15}\text{NO}_3^-$  ou  $^{15}\text{NO}_2^-$ . Plantas selvagens e mutantes *nia1 nia2* ou ainda suspensão de Psm ( $10^8$  UFC/mL) foram mantidos por 6 h na ausência de luz. Homogenatos foliares e a suspensão de Psm foram incubados por 1 h de acordo com os tratamentos a seguir relatados e então analisados por EPR segundo as condições instrumentais descritas na legenda da Figura 5. **A**, homogenato fervido (selvagem-controle) incubado com  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$ ; **B**, homogenato fervido (selvagem inoculada) incubado com  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$ ; **C**, Psm incubada com L- $^{15}\text{N}$ -arginina 1 mM,  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  e todos os cofatores para a NOS de mamíferos; **D**, Psm incubada com  $^{15}\text{NO}_3^-$  1 mM,  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  e NADH 1 mM; **E**, Psm incubada  $^{15}\text{NO}_2^-$  1 mM,  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  e NADH 1 mM; **F**, homogenato fervido (mutante inoculada) incubada com  $^{15}\text{NO}_2^-$  1 mM,  $(\text{MGD})_2\text{Fe}(\text{II})$  e NADH 1 mM. Perfil espectral similar foi obtido em amostras pré-acondicionadas na presença de luz.

**Tabela A1.** Efeito da L-arginina e luz na produção de  $\cdot\text{NO}$  em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem em resposta a *P. syringae*. Homogenatos de folhas foram extraídos de tecidos-controle ou inoculados com Psm por 6 h na presença ou ausência de luz. Os homogenatos foram incubados com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  e L-arginina e analisados por EPR.

<b>pmol de complexo <math>(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}/\text{min}/\text{mg}</math> proteína</b>		
<b>Tratamento</b>	<b>Escuro</b>	<b>Luz</b>
Controle	51,6 ± 6,6	50,0 ± 1,6
Controle + L-arginina 1 mM	52,6 ± 5,0	50,8 ± 5,0
Controle + L-arginina 10 mM	32,5 ± 7,0	35,2 ± 5,9
Controle + L-arginina 1 mM + SOD 100 U/mL	55,0 ± 6,0	50,0 ± 1,7
Inoculada	53,3 ± 3,3	53,3 ± 3,3
Inoculada + L-arginina 1 mM	55,0 ± 5,0	52,6 ± 3,3
Inoculada + L-arginina 10 mM	31,5 ± 6,0	29,1 ± 3,9
Inoculada + L-arginina 1 mM+ SOD 100 U/mL	50,0 ± 6,5	50,0 ± 3,7

**Tabela A2.** Efeito de  $\text{NO}_3^-$  e luz na produção de  $^*\text{NO}$  em folhas de *A. thaliana* do tipo selvagem em resposta a *P. syringae*. Homogenatos de folhas foram extraídos de tecidos-controle ou inoculados com Psm por 6 h na presença ou ausência de luz. Os homogenatos foram incubados com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  e  $\text{NO}_3^-$  e analisados por EPR.

pmol de complexo $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$ /min/mg proteína		
Tratamento	Escuro	Luz
Controle	$50,0 \pm 15,1$	$50,1 \pm 18,1$
Controle + $\text{NO}_3^-$ 1 mM	$55,1 \pm 5,8$	$58,3 \pm 13,3$
Controle + $\text{NO}_3^-$ 1 mM + L-arg 10 mM	$16,6 \pm 1,7$	$20,0 \pm 1,7$
Inoculada	$63,3 \pm 15,0$	$45,0 \pm 6,7$
Inoculada + $\text{NO}_3^-$ 1 mM	$58,4 \pm 6,0$	$48,5 \pm 10,9$
Inoculada + $\text{NO}_3^-$ 1 mM + L-arg 10 mM	$20,0 \pm 3,3$	$20,0 \pm 6,7$

**Tabela A3.** Efeito de  $\text{NO}_2^-$  e luz na produção de  $\bullet\text{NO}$  em folhas de *A. thaliana* em resposta a *P. syringae*. Homogenatos de folhas de plantas do tipo selvagem e de mutantes *nia1 nia2* foram extraídos de tecidos-controle ou inoculados com Psm por 6 h na presença ou ausência de luz. Os homogenatos foram incubados com complexo  $(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}$  e  $\text{NO}_2^-$  e analisados por EPR.

<b>pmol de complexo <math>(\text{MGD})_2\text{Fe(II)NO}</math>/min/mg proteína</b>			
<b>Tratamento</b>		<b>Escuro</b>	<b>Luz</b>
<b>Selvagem</b>	Controle	50,0 ± 15,0	58,0 ± 12,0
	Controle + $\text{NO}_2^-$ 1 mM	116,7 ± 0,6	155,8 ± 38,3
	Controle + $\text{NO}_2^-$ 1 mM+ L-arg 10 mM	51,7 ± 13,3	61,6 ± 10,0
	Inoculada	30,1 ± 4,0	43,3 ± 5,1
	Inoculada + $\text{NO}_2^-$ 1 mM	139,2 ± 15,1	137,6 ± 31,6
	Inoculada + $\text{NO}_2^-$ 1 mM+ L-arg 10 mM	50,0 ± 20,1	41,0 ± 0,5
<b>Mutante <i>nia1 nia2</i></b>	Controle	3,3 ± 1,7	13,3 ± 1,7
	Controle + $\text{NO}_2^-$ 1 mM	119,2 ± 31,6	132,5 ± 19,2
	Controle + $\text{NO}_2^-$ 1 mM+ SOD 100 U/mL	155,0 ± 16,7	176,7 ± 23,3
	Controle + $\text{NO}_2^-$ 1 mM + L-arg 10 mM	35,0 ± 10,0	90,0 ± 10,8
	Inoculada	15,0 ± 3,3	38,9 ± 9,2
	Inoculada + $\text{NO}_2^-$ 1 mM	226,5 ± 25,9	261,7 ± 16,6
	Inoculada + $\text{NO}_2^-$ 1 mM + SOD 100 U/mL	311,7 ± 32,0	366,7 ± 16,7
	Inoculada + $\text{NO}_2^-$ + L-arg 10 mM	46,7 ± 4,9	65,0 ± 10,1

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b>	Atividade NOS induzida em folhas de <i>A. thaliana</i> selvagem e mutante deficiente para NR, inoculadas com <i>P. syringae</i> .....	24
<b>Figura 2.</b>	Atividade NR em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> em função do tempo.....	26
<b>Figura 3.</b>	Análise qualitativa da atividade redutora de nitrato na bactéria-teste.....	27
<b>Figura 4.</b>	Atividade NR em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem inoculadas com Psm por diferentes períodos de tempo.....	28
<b>Figura 5.</b>	Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas selvagens e mutantes deficientes para NR, incubados com complexo (MGD) <sub>2</sub> Fe(II) e L-arginina.....	30
<b>Figura 6.</b>	Produção de <sup>•</sup> NO, quantificada por EPR, em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem em resposta a <i>P. syringae</i> .....	31
<b>Figura 7.</b>	Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas selvagens e mutantes deficientes para NR, incubados com complexo (MGD) <sub>2</sub> Fe(II) e NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> .....	35
<b>Figura 8.</b>	Produção de <sup>•</sup> NO, quantificada por EPR, em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem em resposta a <i>P. syringae</i> .....	36
<b>Figura 9.</b>	Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas do tipo selvagem incubados com complexo (MGD) <sub>2</sub> Fe(II) e NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	38
<b>Figura 10.</b>	Espectros representativos de EPR de homogenatos de plantas mutantes deficientes para NR incubados com complexo (MGD) <sub>2</sub> Fe(II)	

	e NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	40
<b>Figura 11.</b>	Produção de •NO, quantificada por EPR, em folhas de <i>A. thaliana</i> selvagem e em mutante deficiente para NR em resposta a <i>P. syringae</i> .....	41
<b>Figura 12.</b>	Produção de •NO, quantificada por EPR, em folhas de <i>A. thaliana</i> mutante deficiente para NR na presença de diferentes aminoácidos.....	43
<b>Figura 13.</b>	Produção de •NO, quantificada por EPR, em folhas de <i>A. thaliana</i> selvagem e mutante deficiente para NR em resposta a inoculação com <i>P. syringae</i> por diferentes períodos de tempo.....	45
<b>Figura 14.</b>	Efeito do alopurinol na produção de •NO, quantificada por EPR, em folhas de <i>A. thaliana</i> mutante deficiente para NR.....	48
<b>Figura 15.</b>	Representação esquemática das reações envolvendo o marcador DAF-2DA para a detecção de •NO <i>in vivo</i> por microscopia de fluorescência.....	51
<b>Figura 16.</b>	Produção <i>in vivo</i> de •NO em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem e mutante deficiente para NR.....	53
<b>Figura 17.</b>	Morte celular em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem e de mutante deficiente para NR inoculadas com <i>P. syringae</i> .....	55
<b>Figura 18.</b>	Imagens de folhas de <i>A. thaliana</i> dos tipos selvagem e mutante deficiente para NR após 48 h de inoculação com <i>P. syringae</i> .....	56
<b>Figura 19.</b>	Efeito do NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> sobre o crescimento da bactéria <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> .....	58
<b>Figura 20.</b>	Resultado do teste LOPAT para a classificação da bactéria-teste.....	60

<b>Figura 21.</b>	Possível mecanismo cooperativo para a produção de $\bullet\text{NO}$ por óxido nítrico sintase (NOS), nitrato redutase (NR) e atividade mitocondrial redutora de nitrito em folhas de <i>A. thaliana</i> durante interação com <i>P. syringae</i> pv. <i>maculicola</i> .....	75
-------------------	---	----

<b>Tabela I.</b>	Resultados dos testes bioquímicos realizados com Psm.....	64
------------------	---	----

## APÊNDICE

<b>Figura 1.</b>	Representação dos espectros de EPR de homogenatos de folhas de <i>A. thaliana</i> ou suspensão aquosa de <i>P. syringae</i> incubados com L- $^{15}\text{N}_2$ -guanidineimino] arginina, $^{15}\text{NO}_3^-$ ou $^{15}\text{NO}_2^-$ .....	91
------------------	--	----

<b>Tabela A1.</b>	Efeito da L-arginina e luz na produção de $\bullet\text{NO}$ em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem em resposta a <i>P. syringae</i> .....	92
-------------------	--	----

<b>Tabela A2.</b>	Efeito de $\text{NO}_3^-$ e luz na produção de $\bullet\text{NO}$ em folhas de <i>A. thaliana</i> do tipo selvagem em resposta a <i>P. syringae</i> .....	93
-------------------	---	----

<b>Tabela A3.</b>	Efeito de $\text{NO}_2^-$ e luz na produção de $\bullet\text{NO}$ em folhas de <i>A. thaliana</i> em resposta a <i>P. syringae</i> .....	94
-------------------	--	----

## LISTA DE PUBLICAÇÕES

### Artigos

**Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Pinto-Maglio, C.A.F., Magalhaes, J.R.,**

**Salgado, I.** Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae* (submetido).

**Gondim, F.J., Modolo, L.V., Salgado, I.** (2005). nNOS is heterogenously distributed in equine myofibers and higher expressed in endurance trained horses. *Can. J. Vet. Res.* (no prelo).

**de Fátima, A., Baptistella, L.H.B., Pilli, R.A., Modolo, L.V.** (2005). Ácidos siálicos – da compreensão do seu envolvimento em processos biológicos ao desenvolvimento de fármacos contra o agente etiológico da gripe. *Química Nova* (no prelo).

**Scuro, L.S, Simioni, P.U, Gabriel, D.L., Saviani, E.E, Modolo, L.V., Tamashiro, W.M.S.C., Salgado, I.** (2004). Suppression of nitric oxide production in mouse macrophages by soybean flavonoids accumulated in response to nitruprusside and fungal elicitation. *BMC Biochem.* **5**, 5.

**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 Physiol.* **130**, 1288-1297.

**Salgado, I., Modolo, L.V., Ribeiro, J.N., Magalhaes, J.R., Tamashiro, W.M.S.C.** (2002). Parallels between plants and animals in the production and molecular targets of nitric oxide. *Physiol. Mol. Biol. Plants* **8**, 185-191.

### Capítulos de livro

**Salgado, I., Saviani, E.E., Modolo, L.V., Braga, M.R.** (2004). Nitric oxide signaling in plant defence responses to pathogen attack. In *Advances in Plant Physiology*, A. Hemantaranjan, Ed. (Jodhpur: Scientific Publishers), 7, pp.121-141.

**Salgado, I., Modolo, L.V., Magalhaes, J.R., Tamashiro, W.M.S.C., Saviani, E.E.** (2004). Production of nitric oxide in plants by nitric oxide synthase enzymes. In *Nitrogen Nutrition & Sustainable Plant Productivity*, R.P. Singh, N. Shankar and P.K. Jaiwal, Eds (Houston: Studium Press, LLC) (no prelo).

**Salgado, I., Magalhaes, J.R., Saviani, E.E., Modolo, L.V.** (2004). Nitric oxide signal transduction in plant programmed cell death. In *Nitric Oxide Signaling in Higher Plants*, J.R. Magalhaes, R.P. Singh, Eds (Houston: The Science Tech. Publisher. LCC.) (no prelo).

### Apresentações de Simpósio e Palestra

Apresentação da conferência “**Sources of nitric oxide during plant-pathogen interaction**” no simpósio “Nitric oxide functions in plant metabolism and defense” realizado durante a XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, Águas de Lindóia, 2004.

Apresentação da palestra “**Fontes de óxido nítrico durante a interação planta-patógeno**” na Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica de São Paulo dentro da programação de Seminários Gerais, setembro/2004.

Apresentação do trabalho “**Production of nitric oxide from nitrate reductase in *Arabidopsis thaliana* leaves response to *Pseudomonas syringae* infection**” na sessão de Comunicação Livre durante a XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG, 2004.

### Apresentações em Congressos

**Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Magalhaes, J.R., Salgado, I. (2004).**

Enzymatic nitric oxide production from nitrite by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. 11th Annual Meeting of the Society for Free Radical Biology and Medicine, Virgin Island, USA.

**Modolo, L.V., Augusto, O., Salgado, I.** (2004). Production of nitric oxide from nitrate reductase in *Arabidopsis thaliana* leaves response to *Pseudomonas syringae* infection. XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

**Modolo, L.V., Almeida, I.M.G., Rodrigues Neto, J., Magalhaes, J.R., Augusto, O., Salgado, I.** (2003). Nitric oxide synthesis in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with *Pseudomonas syringae*. In Plant Biology, Honolulu, Hawaii, USA.

**Modolo, L.V., Almeida, I.M.G., Rodrigues Neto, J., Salgado, I.** (2002). *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* induces nitric oxide synthase activity in *Arabidopsis thaliana* leaves. In XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Caxambu, MG.

# ***CURRICULUM VITAE***

## **Formação**

2001 - 2004 **Doutorado em Biologia Funcional e Molecular**

**Área:** Bioquímica

**Título da dissertação:** Produção de óxido nítrico pela óxido nítrico sintase, nitrato redutase e uma atividade mitocondrial redutora de nitrito na resposta de defesa de *Arabidopsis thaliana* à *Pseudomonas syringae*

**Instituição:** Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

1999 - 2001 **Mestrado em Biologia Funcional e Molecular**

**Área:** Bioquímica

**Título da tese:** Produção de flavonóides e atividade óxido nítrico sintase na resposta de defesa de soja ao agente causador do cancro da haste

**Instituição:** Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

1995 - 1999 **Bacharelado em Química**

**Instituição:** Universidade Federal de Viçosa (UFV)