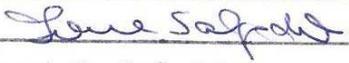


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA



PLINIO RODRIGUES DOS SANTOS FILHO

**CORRELAÇÃO ENTRE METABOLISMO DE NITROGÊNIO, SÍNTESE DE
FENILPROPANÓIDES E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM *Arabidopsis thaliana***

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
PLINIO RODRIGUES DOS SANTOS FILHO

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas (Unicamp) para obtenção
do Título de Doutor em Biologia
Funcional e Molecular na área de
Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

Campinas

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Sa59c Santos Filho, Plinio Rodrigues dos, 1982-
Correlação entre metabolismo de nitrogênio, síntese de
fenilpropanóides e produção de óxido nítrico em
Arabidopsis thaliana / Plinio Rodrigues dos Santos Filho. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

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

1. Fenilpropanóides. 2. Óxido nítrico. 3.
Arabidopsis thaliana. 4. Nitrogênio - Metabolismo. I.
Salgado, Ione, 1953-. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Correlation between nitrogen metabolism, synthesis of
phenylpropanoids and production of nitric oxide in *Arabidopsis thaliana*

Palavras-chave em Inglês:

Phenylpropanoids

Nitric oxide

Arabidopsis thaliana

Nitrogen - Metabolism

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Doutor em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Ione Salgado [Orientador]

Maria Angela Machado de Carvalho

Eny Iochevet Segal Floh

Celso Eduardo Benedetti

Marcelo Menossi Teixeira

Data da defesa: 15-02-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Data da defesa: 15 de fevereiro de 2012

Banca examinadora:

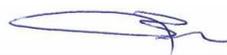
Prof(a). Dr(a). Ione Salgado (Orientadora)



Prof(a). Dr(a). Maria Angela Machado de Carvalho



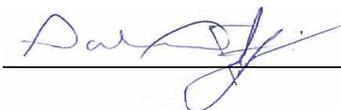
Prof(a). Dr(a). Eny lochevet Segal Floh



Prof(a). Dr(a). Celso Eduardo Benedetti



Prof(a). Dr(a). Marcelo Menossi Teixeira



Prof(a). Dr(a). Márcia Regina Braga

Prof(a). Dr(a). Ladaslav Sodek

Prof(a). Dr(a). Cláudio Crysostomo Werneck

Respostas apressadas são perigosas. Antes delas, queira as questões. Elas são muito mais interessantes. Ando acreditando que há mais sabedoria em saber lidar com as questões do que necessariamente saber respondê-las. Conviver com elas requer simplicidade

(Padre Fábio José de Melo Silva)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, fonte de toda graça.

Agradeço a oportunidade de desenvolver um trabalho científico, podendo experimentar a eficácia do raciocínio lógico, ao mesmo tempo em que se lida com expectativas e frustrações. É o racional que perfaz o emocional.

Agradeço à Profa Dra. Ione Salgado pela indispensável orientação. Meu reconhecimento e admiração por tão nobre e árdua atividade.

Agradeço minha família e minha noiva, que são as pessoas mais importantes na minha vida.

Agradeço ao Pablo, que me ajudou em diferentes momentos ao longo de minha estadia em Campinas.

Agradeço a todos do laboratório de bioquímica de plantas, sem distinção, porque foram importantes nesse período, mesmo aqueles que não estão mais presentes no dia a dia do laboratório.

Agradeço aos professores Paulo Mazzafera, Adriana Mercadante e Ladaslav Sodek que permitiram a utilização do UPLC-MS, LC-MS e CG-MS respectivamente.

Agradeço à Pós-doutoranda Alexandra Sawaya pelo auxílio na utilização do UPLC/MS.

Agradeço aos professores Cláudio Werneck, Celso Benedetti e Ladaslav Sodek por terem participado de minha qualificação.

Agradeço aos professores Maria Angela Machado de Carvalho, Eny Iochet Segal Floh, Celso Eduardo Benedetti e Marcelo Menossi Teixeira por terem participado de minha banca de defesa.

Agradeço às agências de fomento. Capes pela Bolsa, Fapesp e CNPq pelos auxílios ao Laboratório de Bioquímica de Plantas.

Por fim, agradeço a inúmeros amigos e colegas que contribuíram de alguma forma.

A todos aqui lembrados, ainda que não nominalmente, minha total gratidão.

RESUMO

A nitrato redutase (NR) corresponde ao primeiro passo na assimilação do nitrato em plantas. Recentemente, essa enzima tem sido também relacionada à síntese de óxido nítrico (NO). Entre várias ações sinalizadoras para as plantas, o NO promove o acúmulo de fenilpropanóides pela ativação da expressão de enzimas iniciais dessa via. Contudo, uma correlação entre metabolismo de nitrogênio, emissão de NO e acúmulo de fenilpropanóides não foi estabelecida. Por isso, neste trabalho foi analisado o efeito do suprimento de nitrato e da deficiência na NR sobre a síntese de aminoácidos, a emissão de NO e o metabolismo de fenilpropanóides em diferentes tecidos de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante duplo deficiente para a NR (*nia1 nia2*). Análises cromatográficas mostraram que a mutante é deficiente na síntese de sinapoil malato (SM), fenilpropanóide predominante nas folhas, resultando no acúmulo de seu precursor sinapoil glicose (SG) e derivados de kaempferol. Essa deficiência não foi causada pela baixa assimilação do nitrato, já que a recuperação do conteúdo de aminoácidos na mutante não alterou seu perfil metabólico. Porém, a maior disponibilidade de nitrato aumentou a atividade da NR, a emissão de NO e os níveis de SM e diminuiu os níveis de SG, nos dois genótipos. O cultivo *in vitro* da mutante na presença de malato afetou a produção de SM de maneira dose-dependente, enquanto substâncias doadoras de NO causaram apenas um pequeno aumento em SG. Porém, a combinação malato/doador de NO promoveu a recuperação de SM ao nível da selvagem. Esse efeito sinérgico do NO com o malato também ocorreu quando as folhas da mutante foram infiltradas com esses compostos. Além disso, a atividade da enzima sinapoil glicose:malato sinapoil transferase (SMT) foi menor na mutante e a adição de NO aumentou a síntese de SM. Ainda, as folhas da mutante foram incapazes de acumular antocianinas sinapoiladas ao nível da selvagem quando submetidas a um estresse luminoso. Nos botões florais apenas derivados de kaempferol e quercetina foram identificados e não houve diferença entre selvagem e mutante. Nas raízes não foram identificados fenilpropanóides, provavelmente porque esses compostos só são acumulados nesse órgão na presença de luz. Em relação ao acúmulo de aminoácidos,

as folhas do mutante apresentaram níveis reduzidos de todos os aminoácidos parecendo atuar como fonte desses compostos para os botões florais, que não apresentaram nenhuma diferença em relação à selvagem. A glutamina recuperou os níveis de aminoácidos nas folhas, mas não causou diferença nos botões florais. Nas raízes, não houve diferença no conteúdo de aminoácidos entre selvagem e mutante, quando cultivadas no solo, mas *in vitro*, a mutante foi deficiente, provavelmente pela limitação de nutrientes nessa condição. Esses resultados indicam que o metabolismo dos ésteres de ácido sinápico nas folhas, controlado por aciltransferases dependentes de sinapoil glicose, está comprometido no mutante *nia1 nia2* e sugere um potencial papel sinalizador para o NO na ativação dessas aciltransferases. Ainda, o efeito da deficiência na NR nos níveis de aminoácidos parece alterar as relações de fonte e dreno na planta e a folha foi o órgão mais afetado.

ABSTRACT

The nitrate reductase (NR) is the first step in nitrate assimilation in plants. Recently, this enzyme has also been related to the synthesis of nitric oxide (NO). Among various signaling actions for plants, NO promotes the accumulation of phenylpropanoids by activating the expression of the initial enzymes of this pathway. However, a correlation between nitrogen metabolism, NO emission and accumulation of phenylpropanoids has not been established. Therefore, this work analyzed the effect of nitrate supply and NR deficiency on the synthesis of amino acids, emission of NO and phenylpropanoid metabolism in different tissues of wild type and NR double-deficient (*nia1 nia2*) *Arabidopsis thaliana* plants. Chromatographic analysis showed that the mutant is deficient in the synthesis of sinapoylmalate (SM), the major phenylpropanoid in the leaves, resulting in accumulation of its precursor sinapoylglucose (SG) and kaempferol derivatives. This deficiency was not caused by the low nitrate assimilation, since the recovery of the amino acid content in the mutant did not change its metabolic profile. In contrast, an increased supply of nitrate enhanced NR activity and NO production, and increased SM and decreased SG levels in both genotypes. The *in vitro* cultivation of mutant in the presence of malate affected the production of SM in a dose-dependent manner, whereas NO donors caused only a slight increase in SG. However, the combination of malate/NO donor promoted the recovery of SM at the level of wild type plants. The synergistic effect of NO with malate in the recovery of SM also occurred when the mutant leaves were infiltrated with these compounds. Furthermore, sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase (SMT) activity was reduced in the mutant, and the addition of NO increased SM synthesis. Additionally, mutant leaves were unable to accumulate sinapoylated anthocyanins at the level of wild type when exposed to light stress. In the flower buds just kaempferol and quercetin derivatives were identified and there was no difference between wild type and mutant. In the roots, phenylpropanoids were not identified, probably because these compounds are accumulated in this organ only in the presence of light. Regarding the accumulation of amino acids, the mutant leaves showed reduced levels of all amino acids and appeared to act as a source of these compounds to the flower buds that showed no difference from the wild plant.

Glutamine recovered the amino acid levels in leaves, but caused no difference in flower buds. In the roots, there was no difference in the amino acid content between wild type and mutant, when grown in soil, but *in vitro*, the mutant was deficient, probably due to nutrient limitation in this condition. These results indicate that hydroxycinnamate ester metabolism in leaves, controlled by the sinapoylglucose-dependent sinapoyltransferases, is compromised in *nia1 nia2* mutant and suggests a potential signaling role for NO in the activation of these acyltransferases. Additionally, the effect of NR deficiency in the levels of amino acids appears to alter the relationship of source and sink in the plant and the leaf is the most affected organ.

LISTA DE FIGURAS E ORGANOGRAMA

Figura 1:	Representação esquemática da assimilação de nitrogênio nas raízes e folhas das plantas.	2
Figura 2:	Modelo de controle da taxa de absorção de nitrogênio durante rápido crescimento vegetativo (a) e enchimento de grãos (b).	5
Figura 3:	Representação esquemática da ação sinalizadora do NO em plantas.	7
Figura 4:	Mecanismos potenciais da sinalização do NO.	9
Figura 5:	Possíveis vias de geração do NO em plantas.	13
Figura 6:	Via biossintética de fenilpropanóides em <i>Arabidopsis thaliana</i> .	15
Figura 7:	Esquema da formação de ésteres de ácido sinápico em <i>Arabidopsis thaliana</i> dependente de aciltransferases específicas.	19
Figura 8:	Via dos flavonóides em <i>Arabidopsis thaliana</i> evidenciando algumas mutações.	23
Organograma 1:	Resumo geral dos experimentos realizados	33
Figura 9:	Atividade <i>in vivo</i> da NR em folhas, raízes e botões florais de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> .	35
Figura 10:	Efeito do estresse de luz sobre a atividade NR nas folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> .	37
Figura 11:	Nível endógeno de nitrato em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem (WT) e mutante (<i>nia1 nia2</i>)	39

- cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato ($+NO_3^-$).
- Figura 12:** Conteúdo de aminoácidos individuais em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato ($+NO_3^-$) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 43
- Figura 13:** Conteúdo total de aminoácidos em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato ($+NO_3^-$) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 43
- Figura 14:** Conteúdo de aminoácidos individuais em raízes de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato ($+NO_3^-$) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 47
- Figura 15:** Conteúdo total de aminoácidos em raízes de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato ($+NO_3^-$) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 47
- Figura 16:** Conteúdo de aminoácidos em botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) com alto nitrato (12,5 mM; $+NO_3^-$) e mutante *nia1 nia2* com baixo nitrato (2,5mM) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 49
- Figura 17:** : Emissão de NO em folhas *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com 51

- baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln).
- Figura 18:** Perfil cromatográfico de ésteres de ácido sinápico e flavonóis glicosídeos em extratos metanólicos de folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa. 55
- Figura 19:** Perfil cromatográfico de antocianinas em extratos metanólicos de folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a 90 μmol fótons m⁻² s⁻¹ de intensidade luminosa e, em seguida, transferidas para luz contínua por 7 dias a 120 μmol fótons m⁻²s⁻¹. 55
- Figura 20:** Perfil cromatográfico de flavonóis glicosídeos em extratos metanólicos de botões florais de *Arabidopsis thaliana* do genótipo selvagem (WT). 56
- Figura 21:** Fenilpropanóides acumulados em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 58
- Figura 22:** Fenilpropanóides acumulados em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas *in vitro* na presença de malato e doador de NO. 61
- Figura 23:** Efeito da infiltração de malato e NO no conteúdo dos ésteres de ácido sinápico em folhas de *Arabidopsis thaliana*. 63

- Figura 24:** Antocianinas acumuladas em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) mantidas sob estresse luminoso. 66
- Figura 25:** Fenilpropanóides acumulados em folhas *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) mantidas sob estresse luminoso. 66
- Figura 26:** Flavonóis glicosídeos acumulados em botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) com alto nitrato (12,5 mM; +NO₃⁻) e mutante *nia1 nia2* com baixo nitrato (2,5 mM) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). 68
- Figura 27:** Atividade da enzima SMT em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* na presença dos substratos sinapoil glicose e malato catalisando a formação de sinapoil malato. 70
- Figura 28:** Ácidos orgânicos acumulados em folhas de *A. thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻). 72

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Ésteres de ácido sinápico e flavonóis glicosídeos identificados em extratos metanólicos de folhas e botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem e do mutante *nia1 nia2* cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. 53
- Tabela 2:** Antocianinas identificadas em extratos metanólicos de folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e do mutante *nia1 nia2* crescidas sob fotoperíodo de 12 horas a $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por três semanas e, em seguida, transferidas para luz contínua por 7 dias a $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. 54

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Metabolismo de nitrogênio em plantas	1
1.2	Importância do NO para os vegetais	6
1.3	Formação do NO nas plantas	10
1.4	Fenilpropanóides	14
2	OBJETIVO	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1	Material vegetal e condições de cultivo	25
3.2	Medida <i>in vivo</i> da atividade nitrato redutase	26
3.3	Determinação do conteúdo endógeno de nitrato	26
3.4	Quantificação da produção de NO por fluorimetria	27
3.5	Extração de aminoácidos	27
3.6	Processo cromatográfico para identificar o conteúdo de aminoácidos	28
3.7	Extração dos metabólitos secundários	28
3.8	Processo cromatográfico para análise da produção de fenilpropanóides	29
3.9	Identificação dos fenilpropanóides por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS ⁿ) e UPLC-MS	29
3.10	Análise da produção de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas	30
3.11	Determinação da atividade da SMT	31
3.12	Organograma dos experimentos realizados	32

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Atividade da nitrato redutase	34
4.1.1	Efeito do estresse de luz na atividade NR	36
4.2	Determinação do conteúdo de nitrato endógeno	38
4.3	Determinação do nível de aminoácidos	40
4.4	Emissão de NO	50
4.5	Análise da produção de fenilpropanóides	52
4.5.1	Compostos identificados e perfil cromatográfico das plantas	52
4.5.2	Perfil metabólico das folhas: Ésteres de ácido sinápico, flavonóis glicosídeos e efeito do NO	57
4.5.3	Efeito do estresse de luz sobre o perfil metabólico das folhas: Acúmulo de antocianinas	64
4.5.4	Perfil metabólico dos Botões florais: Flavonóis glicosídeos	67
4.6	Atividade da SMT	69
4.7	Análise da produção de ácidos orgânicos nas folhas	71
5	DISCUSSÃO GERAL	73
5.1	Efeito da mutação na NR sobre o metabolismo de fenilpropanóides nas folhas: NO e aciltransferases	73
5.2	Efeito da deficiência na NR sobre o metabolismo de aminoácidos nos diferentes órgãos e acúmulo de flavonóides no botão floral: Relações de fonte e dreno	81
6	CONCLUSÕES	89
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo de nitrogênio em plantas

O nitrogênio é um nutriente essencial para as plantas e está envolvido na síntese de nucleotídeos, aminoácidos e proteínas. Entretanto, somente algumas espécies são capazes de usar o nitrogênio atmosférico devido a interações específicas com microorganismos (Gordon et al., 2001). Dessa forma, o nitrogênio é fornecido às plantas normalmente na forma de nitrato e amônia no solo sendo o nitrato a forma predominante (Raun e Johnson, 1999; Crawford e Forde, 2002). Inicialmente, durante a formação da biomassa, ocorre a absorção e assimilação do nitrogênio em aminoácidos e outros compostos nitrogenados. Durante a fase vegetativa, folhas jovens e raízes tornam-se drenos para o nitrogênio inorgânico absorvido e para a síntese e armazenamento dos aminoácidos oriundos dessa assimilação. Posteriormente, na fase reprodutiva, o requerimento de compostos nitrogenados aumenta nos órgãos florais. Nesse ponto, as folhas tornam-se fontes de aminoácidos para esses órgãos (Kant e Rothstein, 2011).

Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram diferentes sistemas para adaptar-se a formas heterogêneas de nitrogênio presentes no solo. Estudos com diferentes espécies de plantas levaram à conclusão de que existem dois tipos de sistemas transportadores para nitrato e amônia (Crawford e Glass, 1998; Crawford e Forde, 2002): sistemas de transporte com alta afinidade (HATS, high affinity transport system), que atuam no transporte de nitrogênio presente em concentrações da ordem de micromolar, e o sistema de transporte de baixa afinidade (LATS, low affinity transport system), que se torna efetivo em concentrações de nitrogênio acima de 1mM (Wang et al., 1993; Crawford e Glass, 1998). Uma vez dentro da célula, o nitrato poderá ter diferentes destinos: (1) ser transportado para a parte aérea para, posteriormente ser assimilado, (2) ser armazenado no vacúolo e (3) ser reduzido a nitrito e amônia pelas enzimas nitrato redutase (NR) e nitrito redutase (NiR), respectivamente. A amônia derivada do nitrato ou diretamente absorvida será, então, assimilada em aminoácidos

pela glutamina sintetase (GS) e pela glutamato sintase (GOGAT) (Crawford e Forde, 2002) (Figura1).

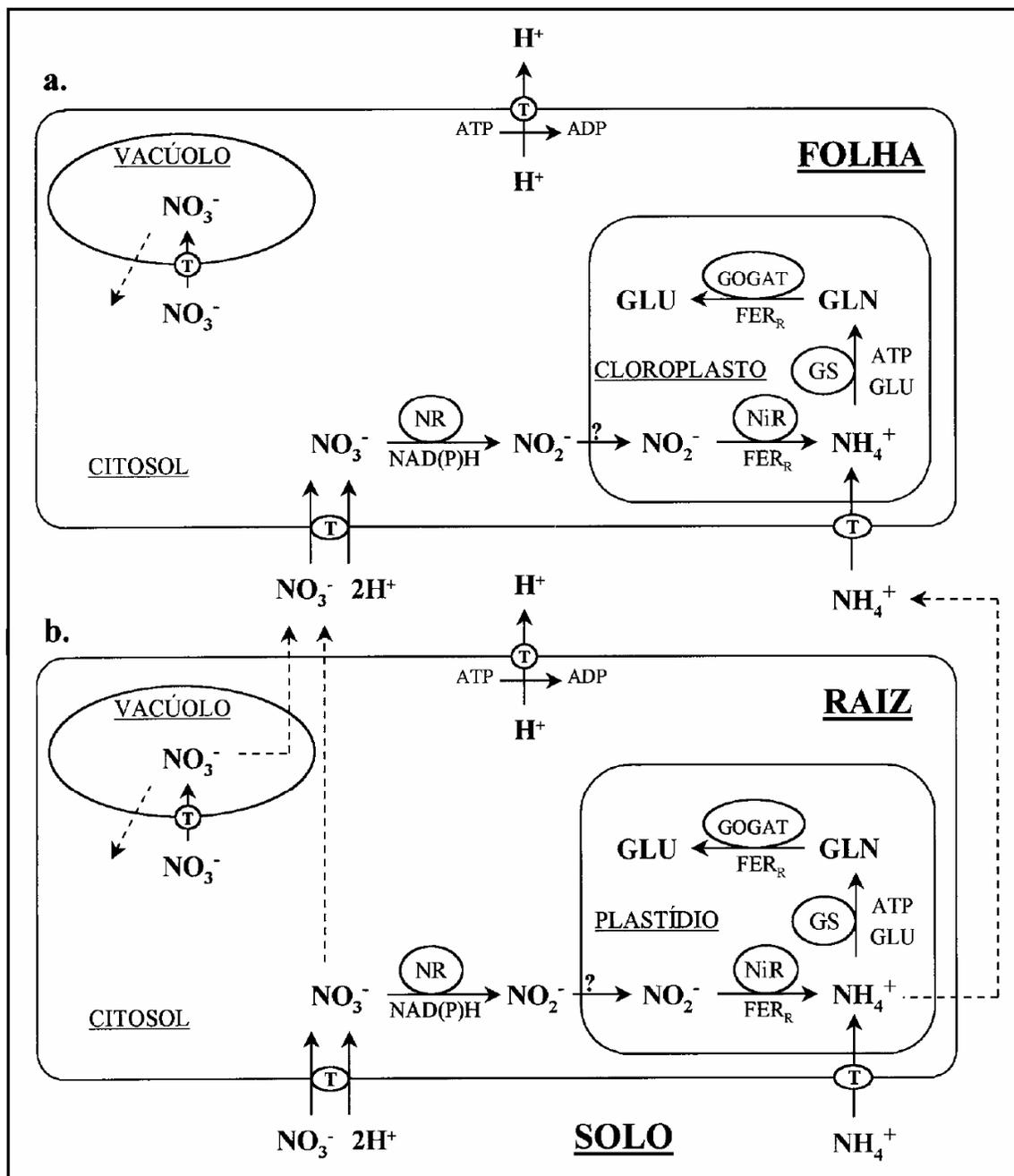


Figura 1: Representação esquemática da assimilação de nitrogênio nas raízes e folhas das plantas. (NO_3^- : nitrato; NO_2^- : nitrito; NH_4^+ : amônio; GLN: glutamina; GLU: glutamato; NR: nitrato redutase; NiR: nitrito redutase; GS: glutamina sintetase; GOGAT: glutamato sintase; T: transportador). Adaptado de Bredemeier e Mundstock, 2000.

O nitrato está presente em diferentes órgãos da planta, porém em concentrações variáveis. Sendo assim, sua mobilização é importante e ocorre por diferentes rotas (Dechorgnat et al., 2011). O nitrogênio inorgânico precisa ser transportado na forma de nitrato porque a amônia é tóxica e precisa logo ser assimilada. Além disso, grandes quantidades de nitrato podem ser armazenadas no vacúolo onde ajudam a manter o equilíbrio osmótico. Ainda, este íon pode ser mobilizado quando a planta está em condições desfavoráveis (Rossato et al., 2001). Em estudo recente foi demonstrado que uma linhagem de *Arabidopsis* com maior capacidade de armazenar o nitrato se adaptou melhor à limitação de nitrogênio (Richard-Molard et al., 2008).

Em um primeiro momento, a mobilização do nitrato acontece via xilema com destino à parte aérea (Herdel et al., 2001). Já nas folhas, o pecíolo apresenta grandes concentrações de nitrato e desponta como importante órgão para garantir sua distribuição (Raab e Terry, 1995). Entre diferentes folhas e para os órgãos reprodutivos o transporte do nitrato é mediado pelo floema (Fan et al., 2009) (Figura 2).

Dependendo da espécie, como em colza, a absorção de nitrato diminui ou até mesmo é interrompida durante a fase reprodutiva (Malagoli et al., 2004). Em *Arabidopsis* cultivada em condições não limitantes de nitrogênio (10 mM), a absorção de nitrato (HATS + LATS) diminui na fase reprodutiva em relação à vegetativa, embora continue ocorrendo (Masclaux-Daubresse et al., 2010). Assim, a remobilização torna-se importante para o completo desenvolvimento da planta, uma vez que o nitrato está relacionado, por exemplo, à quebra de dormência da semente em *Arabidopsis* (Alboresi et al., 2005) e à melhora da produtividade de grãos protéicos em milho e cevada, provavelmente associado ao acúmulo de grandes quantidades de nitrato nas folhas durante a fase vegetativa e posterior remobilização para o enchimento dos grãos (Hirel et al., 2001; Mickelson et al., 2003).

A eficiência da utilização do nitrogênio considera aspectos da absorção e metabolização desse elemento. Dessa forma, a rede de transportadores, redutases e transaminases envolvidas responde a sinais internos e ambientais em nível transcricional e pós transcricional que a conectam ao restante do metabolismo da planta (Krouk et al., 2010; Gojon et al., 2009; Stitt et al., 2002; Crawford e Forde 2002; Kaiser

et al., 1999). A luz é um fator ambiental crucial por constituir um importante ativador enzimático, por exemplo, da NR, NiR e GOGAT.

A assimilação do nitrato também é afetada pelo ritmo circadiano (Gutierrez et al., 2008) e ainda o próprio nitrato pode atuar como sinalizador. A presença do nitrato rapidamente induz modificações na expressão gênica, bem como, sua privação também causa modificações transcricionais (Wang et al., 2003; Scheible et al., 2004; Bi et al., 2007). Algumas dessas respostas transcricionais estão bem relacionadas ao nível protéico (Prinsi et al., 2009). A absorção de nitrato diminui se o conteúdo interno desse elemento na planta estiver alto (Gansel et al., 2001). Ao contrário, em plantas mantidas sob estresse de nitrogênio há indução de genes para os transportadores de nitrato NRT2.1, NAR2 e NRT1.1 e para as enzimas NR e GS quando o fornecimento de nitrato é normalizado (Nazo et al., 2003; Vidmar et al., 2000).

Altos níveis de aminoácidos também inibem a absorção de nitrato, sendo que a glutamina mostrou-se como o mais efetivo (Miller et al., 2008). Além disso, o nitrato tem efeito sobre a morfologia da planta interferindo na arquitetura da raiz, senescência e florescimento (Stitt et al., 2002; Stitt, 1999). Outro mecanismo regulatório importante é a fosforilação. A NR pode ser reversivelmente fosforilada em resposta a anóxia e escuridão o que a torna susceptível a ligação de proteínas 14-3-3 tornando-a inativa (Kaiser e Huber, 2001; Lillo et al., 2004). Já o transportador CHL1, quando fosforilado, apresenta alta afinidade pelo nitrato e, quando desfosforilado, apresenta baixa afinidade (Liu e Tsay, 2003).

Dada a complexidade, abrangência e importância do nitrogênio para as plantas faz-se necessário conhecer os mecanismos de absorção, assimilação e remobilização desse elemento durante o ciclo de vida da planta de maneira a promover o que muitos autores chamam de uso eficiente do nitrogênio ou NUE (nitrogen use efficiency).

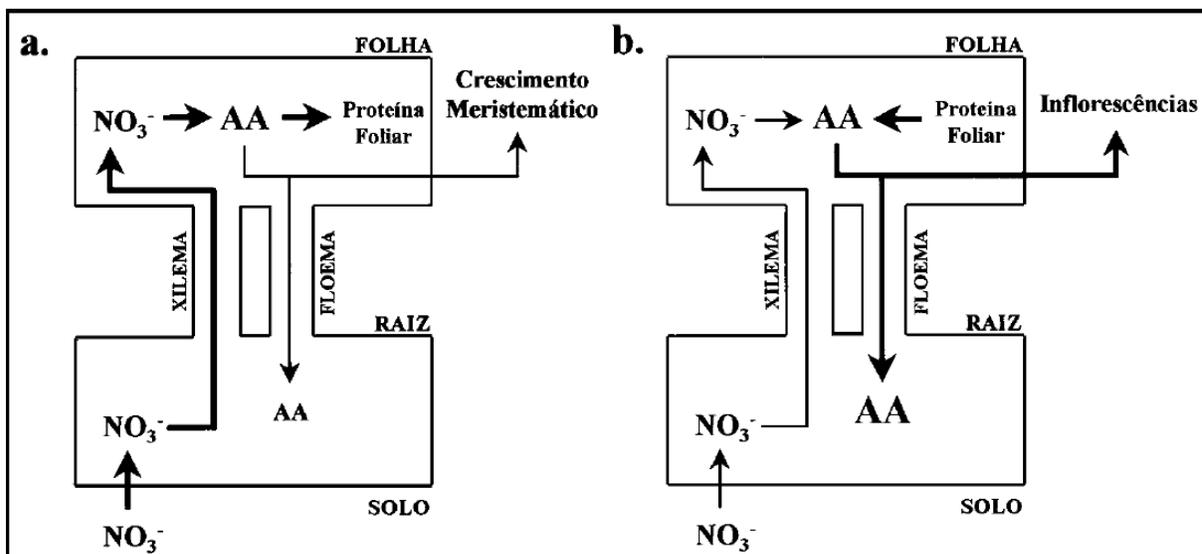


Figura 2: Modelo de controle da taxa de absorção de nitrogênio durante rápido crescimento vegetativo (a) e enchimento de grãos (b). Durante o crescimento vegetativo (a), o nitrogênio é rapidamente absorvido pelas raízes e transportado para as folhas. Nas folhas, a redução do nitrato produz aminoácidos (AA), os quais são incorporados à proteína foliar e também exportados para as raízes. Na fase reprodutiva (b), ocorre a remobilização do N foliar e a exportação de aminoácidos é alta, tanto para as inflorescências como para as raízes. Conseqüentemente, o floema fica enriquecido com AA, o que inibe a absorção e a redução de nitrato nas raízes. Adaptado de Imsande e Touraine, 1994 apud Bredemeier e Mundstock, 2000.

1.2 Importância do NO para os vegetais

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que possui múltiplas funções em plantas. A habilidade de vegetais produzirem NO foi inicialmente observada em soja tratada com herbicidas (Klepper, 1979). Entretanto, somente depois que muitas atividades do NO foram verificadas em mamíferos que sua importância como molécula sinalizadora passou a ser considerada em plantas. Na verdade o NO influencia muitos processos metabólicos e de desenvolvimento nas plantas, incluindo germinação da semente, crescimento das raízes, movimento dos estômatos, lignificação da parede celular, florescimento, crescimento do tubo polínico, senescência e embriogênese (Lamattina et al., 2003; Del Rio et al., 2004; Salgado et al., 2006; Santa-Catarina et al., 2007).

As plantas respondem ao estresse biótico e abiótico através de mecanismos de defesa complexos. Entre esses mecanismos a sinalização por NO merece destaque. Muitas respostas de defesa são estimuladas por NO e os níveis desse radical aumentam em condições de estresse, como ataque por patógenos (Modolo et al., 2005) (Figura 3).

Recentes estudos farmacológicos indicam que este radical desempenha um importante papel na resistência das plantas a doenças. A liberação de NO por doadores químicos aumenta a susceptibilidade à morte celular provocada por H₂O₂ em culturas de células em suspensão de soja (*Glycine max*). Por outro lado, inibidores da síntese de NO são capazes de bloquear a resposta induzida por *Pseudomonas syringae* avirulenta em cultura de células de soja e em *Arabidopsis* (Delledonne et al., 2001). Na verdade, uma das primeiras evidências de que o NO atua como mediador na resposta de defesa contra patógenos foi a observação de que ele é capaz de ativar a expressão dos genes de duas enzimas chave da via dos fenilpropanóides, a fenilalanina amônia liase (PAL) e a chalcona sintase (CHS) (Delledonne et al., 1998). Consistente com esses resultados, o NO foi capaz de estimular o acúmulo fenilpropanóides como parte do mecanismo de defesa de plantas de soja contra o patógeno causador da doença do cancro do caule (Modolo et al., 2002). O estímulo à biossíntese de flavonóides e antocianinas também foi relacionado a produção de NO em plantas de *Arabidopsis* expostas ao UV-B

(Mackerness et al., 2001; Tossi et al., 2011). Foi proposto que a produção de NO aumenta após a exposição ao UV-B causando um aumento na expressão dos fatores de transcrição HY5, MYB12 e ZmP, que atuam na regulação da via dos fenilpropanóides em *Arabidopsis* e milho (Tossi et al., 2011).

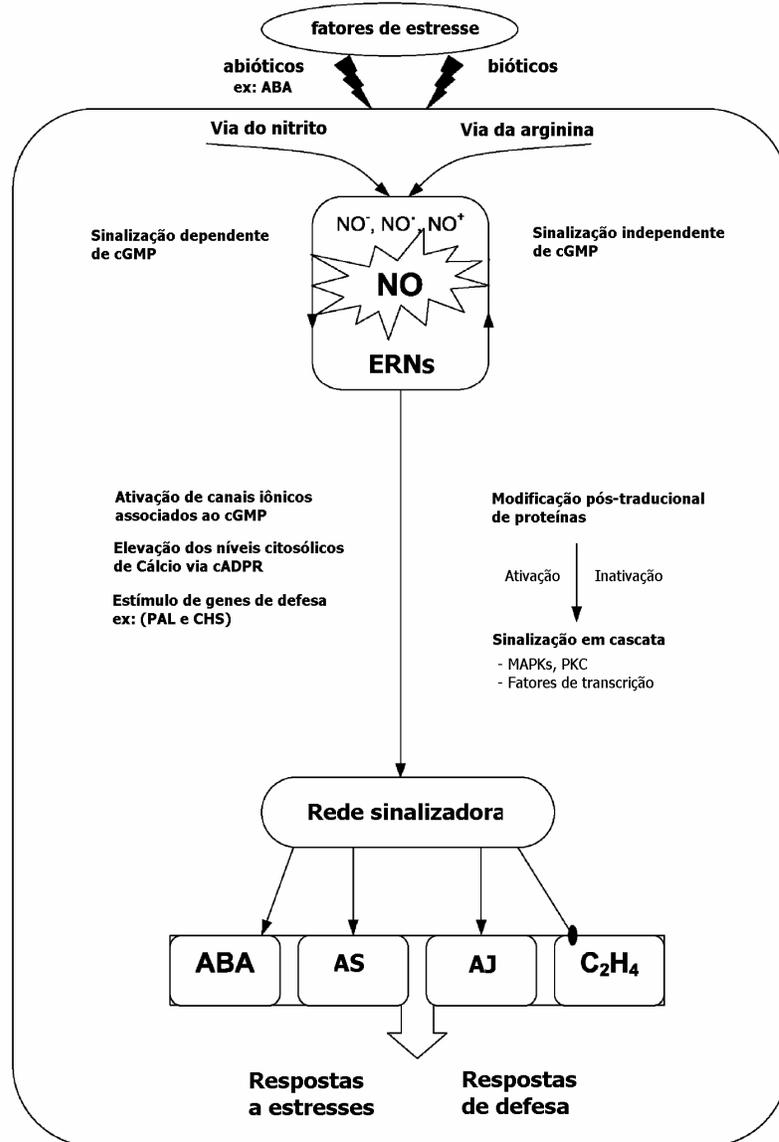


Figura 3: Representação esquemática da ação sinalizadora do NO em plantas. ABA, ácido abscísico; cADPR, ADP Ribose cíclico; CHS, chalcona sintase; cGMP, GMP cíclico; C₂H₄, etileno; AJ, ácido jasmônico; MAPK, proteína quinase ativada por mitógeno; PAL, fenilalanina amônia liase; ERNs, espécies reativas de nitrogênio; AS, ácido salicílico. Adaptado de Arasimowicz e Wieczorek, 2007.

Além de atuar em nível transcricional, o NO está também relacionado à sinalização em processos redox e modificação pós traducional de proteínas. Por ser um radical, o NO altera a homeostase redox das células reagindo com espécies reativas derivadas do oxigênio como o ânion superóxido, gerando peroxinitrito e outros derivados que podem causar modificações protéicas como a S-nitrosilação em resíduos de cisteína e a nitração de tirosinas (Corpas et al., 2008). O NO pode também reagir com resíduos de Fe-S e grupamentos heme que estão presentes em um grande número de proteínas (Neill et al., 2008) (Figura 4). Em plantas, evidências têm sido demonstradas a respeito do papel sinalizador do NO através da S-nitrosilação. Muitas proteínas tornaram-se nitrosiladas quando extratos de culturas celulares de *Arabidopsis* foram tratados com S-nitrosoglutathione (GSNO) e o conteúdo de proteínas contendo resíduos SNO foi avaliado (Lindermayr et al., 2005).

Por tudo isso, atualmente o NO é considerado um efetor multifuncional em plantas. Muitos trabalhos têm avaliado essa importância pelo uso de doadores ou sequestrantes de NO, bem como, por meio de sondas fluorescentes e marcadores fotométricos (Bethke et al., 2006; Shi et al., 2007; Seligman et al., 2008; Tewari et al., 2009). Entretanto, os mecanismos, a localização subcelular de sua formação e as vias de sinalização afetadas pelo NO ainda requerem maiores esclarecimentos.

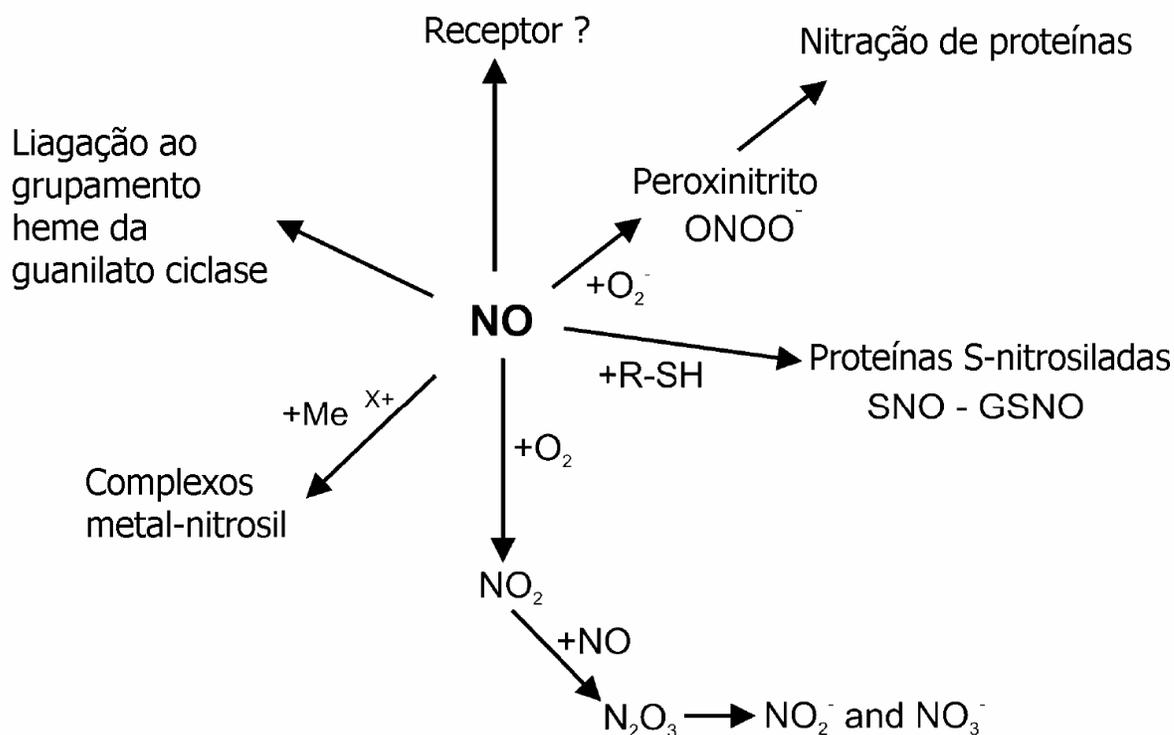


Figura 4: Mecanismos potenciais da sinalização do NO. O NO pode atuar como sinalizador através de mecanismos que diferem dependendo do tipo celular, localização intracelular, microambiente bioquímico e estímulos ambientais. O NO pode se ligar ao grupamento heme de proteínas como a guanilato ciclase e com metais para formar complexos metal-nitrosil. Pode também reagir com grupos SH de tióis de baixo peso molecular como a glutathiona para formar S-nitrosoglutationa (GSNO), bem como nitrosilar proteínas diretamente ou via GSNO para formar proteínas S-nitrosiladas. A S-nitrosilação induz modificações conformacionais e é reversível. Ainda, o NO pode reagir com o ânion superóxido para formar peroxinitrito que pode nitrar proteínas em resíduos de tirosina. Adaptado de Neill et al. (2008).

1.3 Formação do NO nas plantas

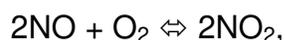
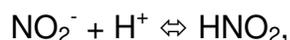
Em células de mamíferos a formação primária de NO é catalisada pela família das óxido nítrico sintases (NOS), composta por três isoformas homólogas que catalisam a formação de NO e L-citrulina a partir de L-arginina (Tayeh e Marletta, 1989), por meio de uma reação que utiliza oxigênio e NADPH como co-substratos e tetraidrobiopterina, calmodulina, FAD e FMN como cofatores (Stuehr, 1997). A NOS tem sido encontrada em vários compartimentos subcelulares, como retículo endoplasmático, mitocôndria e citosol. Esta compartimentalização é um dos aspectos importantes para a sua especificidade (Barouch et al., 2002).

Curiosamente, muitos tecidos de plantas produzem L-citrulina a partir da L-arginina por um processo que é dependente dos cofatores da NOS de mamíferos e sensível a seus inibidores (Durner et al., 1998; Barroso et al., 1999; Modolo et al., 2002). Foi também observado que anticorpos produzidos contra a NOS de mamíferos se ligam a proteínas citossólicas e nucleares da extremidade de raízes de milho (Ribeiro et al., 1999) e a peroxissomos e cloroplastos de folhas de ervilhas (Barroso et al., 1999; Corpas et al., 2001). Apesar disso, nenhum gene ou proteína homólogos à NOS de mamíferos foi encontrado em plantas, particularmente em *Arabidopsis thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative 2000).

Diante de toda essa controvérsia, Guo et al. (2003) afirmaram ter identificado um suposto gene em *Arabidopsis thaliana*, denominado então *AtNOS1*, que codificaria uma proteína que converte a L-arginina em L-citrulina e NO. Essa atividade seria estimulada por NADPH, Ca^{2+} e calmodulina, semelhante a NOS presente nos animais, sem, contudo, apresentar homologia às isoformas de mamíferos. Foi demonstrado que o *AtNOS1* está presente na mitocôndria (Guo e Crawford, 2005) e sua atividade explicaria parte dos efeitos atribuídos ao NO em plantas. Assim, aparentemente havia sido encontrada uma proteína responsável pela síntese de NO em plantas. No entanto, a produção de NO nas plantas não poderia ser restringida a atividade da NOS, uma vez que seus inibidores não afetam certos eventos mediados pelo NO (Neill et al., 2003). Porém, a ação da *AtNOS1* como uma NOS propriamente dita tem sido seriamente questionada, já que, diferentes pesquisadores não conseguiram reproduzir os

resultados obtidos por Guo et al., (2003) (Zemojtel et al., 2006). Outros testes para detectar NO a partir dessa enzima também falharam (Crawford et al., 2006b). Por isso, embora a AtNOS1 não seja, de fato, uma NOS, acredita-se que ela esteja envolvida na síntese ou acúmulo de NO. Assim, foi proposto que esse gene fosse renomeado para *AtNOA1*, primeiro gene descrito relacionado ao NO, que não seria assim confundido com a NOS presente nos animais, mantendo a controvérsia sobre a existência ou não de uma enzima que catalisa a síntese de NO em plantas (Crawford et al., 2006a e b).

Atualmente acredita-se que muitas são as possíveis vias de produção de NO em vegetais, como mostrado na Figura 5, tendo o nitrito despontado como uma fonte potencial de NO em plantas nas quais a existência de um sistema especializado para assimilação de nitrogênio reforça a importância dessa via. A produção de NO a partir de nitrito pode ocorrer através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. O íon nitrito (NO_2^-) existe em equilíbrio com seu conjugado ácido nitroso (HNO_2 , pK_a 3,1-3,5). Em virtude desse equilíbrio uma pequena quantidade de HNO_2 pode estar presente em condições fisiológicas de pH. O HNO_2 espontaneamente produz trióxido de dinitrogênio (N_2O_3). Dessa forma, o NO pode ser gerado pela decomposição do HNO_2 como segue (Yamasaki et al., 1999):



Como a produção espontânea de NO a partir do nitrito em condições de pH neutro é baixa (Miles et al., 1996), muitos trabalhos utilizam o pH ácido para favorecer a formação do HNO_2 . Assim, se torna mais fácil a detecção do NO produzido a partir da redução do nitrito (Yamasaki et al., 1999; Takahama et al., 2002). Esse processo tem permitido que se avalie a ação de agentes redutores na indução da produção de NO a partir de nitrito e uma classe de compostos que desperta grande interesse são os fenólicos, tais como os flavonóides, que têm sido freqüentemente associados à produção NO em meio ácido por potencializarem a redução do nitrito (Gago et al., 2007; Rocha et al., 2009; Takahama et al., 2002). Embora esses dados demonstrem a produção de NO a partir de nitrito significativamente aumentada em pHs bastante

ácidos ($\leq 2,0$), não se pode descartar que em determinadas condições ligeiramente ácidas de pH esse mecanismo se torne importante na fisiologia da planta, onde, a presença de compostos fenólicos seria relevante nesse processo. Com isso teria-se um mecanismo não enzimático em potencial para geração de NO em plantas.

Mecanismos enzimáticos potenciais para a redução do nitrito em plantas incluem a participação da nitrito: NO redutase ligada à membrana plasmática (NI-NOR) (Stöhr et al., 2001), a nitrito redutase (NiR) (Kuznetsova et al., 2004) e a nitrato redutase (Klepper, 1990; Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel, et al., 2002).

A nitrato redutase (NR), conforme mencionado no subitem 1.1, é uma enzima chave para assimilação do nitrato em plantas, uma vez que ela catalisa a redução do nitrato a nitrito, que é posteriormente reduzido a amônia pela nitrito redutase. Além disso, resultados obtidos em testes *in vitro* e *in vivo* indicam que esta enzima pode reduzir nitrito a NO (Dean e Harper, 1986; Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002; Kaiser et al., 2002). A geração de NO a partir da NR foi verificada em muitas espécies, como girassol, espinafre, milho (Rockel et al., 2002), pepino, alga verde e trigo (Xu e Zhao, 2003). Entretanto, a produção de NO a partir de nitrito pode ocorrer também por um processo dependente da mitocôndria, como foi mostrado por Modolo et al., 2005, 2006) na interação planta-patógeno. Experimentos de ressonância paramagnética de elétrons utilizando L-arginina marcada revelaram que a produção de NO durante a interação planta-patógeno a partir da atividade da NOS é muito baixa e, ainda que, um mutante natural, duplo-deficiente para NR (*nia1 nia2*) apresenta uma produção de NO bastante reduzida, quando comparado com os níveis da planta selvagem (Modolo et al., 2005).

Uma vez que a NR é uma importante fonte de NO em plantas (Rockel et al., 2002) foi levantada a hipótese de o nitrato ser a principal fonte de NO durante a interação *Arabidopsis thaliana* - *Pseudomonas syringae*. Contudo, dados de ressonância paramagnética de elétrons utilizando nitrato marcado e NADPH (cofator da NR) não revelaram diferença significativa em relação a L-arginina marcada indicando que o NO de produção endógena detectável na planta selvagem não era derivado do nitrato. Já na presença de nitrito marcado, a inoculação da bactéria causou um substancial aumento na produção do NO detectável, tanto na planta selvagem quanto na mutante.

Dessa forma, o fator limitante para a produção de NO nas plantas mutantes era o nitrito, uma vez que, a falta da NR não permitia a redução do nitrato a nitrito. Conseqüentemente, o nitrito endógeno não pôde ser detectado no mutante de *Arabidopsis* duplo-deficiente para NR (Modolo et al., 2005). O genoma de *Arabidopsis* apresenta dois genes para a NR, *NIA1* e *NIA2*, que apresentam 83,5% de homologia na sua seqüência de aminoácidos. Verificou-se também que o mutante *nia1 nia2* apresenta níveis reduzidos de aminoácidos, especialmente L-arginina e, ainda, perde a capacidade de resposta à inoculação de *P. syringae*, uma resposta claramente observada na planta selvagem (Modolo et al., 2006). Uma vez que o NO é essencial para a indução de genes associados à defesa, a incapacidade do mutante em desenvolver uma resposta de defesa imediata pode refletir sua incapacidade em produzir rapidamente este radical pela falta de substratos para sua síntese (Modolo et al., 2006).

Estes achados revelaram uma conexão entre o metabolismo primário de nitrogênio e a resistência da planta à doença. É importante salientar que a falta da assimilação do nitrato em mutantes deficientes na NR deve afetar não apenas a síntese de aminoácidos, mas também de outros compostos produzidos a partir deles.

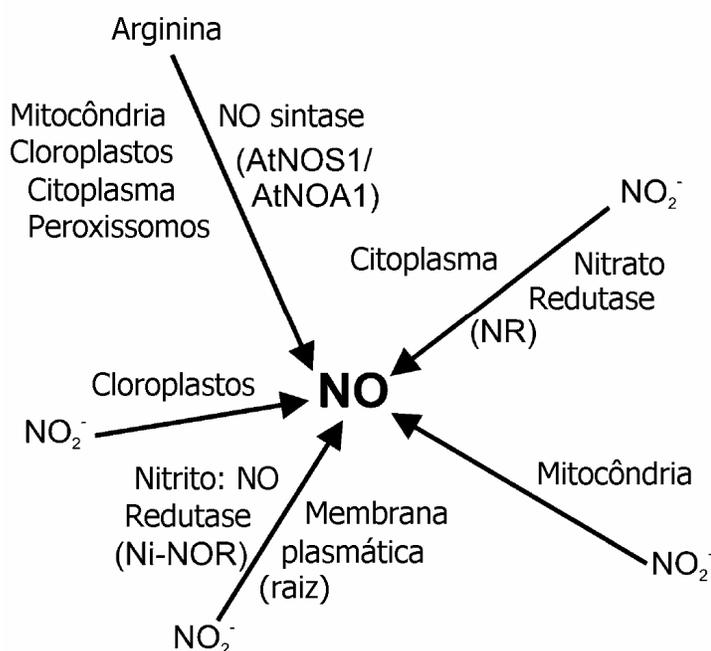


Figura 5: Possíveis vias de geração do NO em plantas. Adaptado de Neill et al. (2008).

1.4. Fenilpropanóides

A maior fonte de compostos fenólicos em plantas é a via dos fenilpropanóides, derivada da fenilalanina (Figura 6). Esta via possui uma grande variedade de diferentes compostos como, derivados do ácido hidroxicinâmico, ligninas, lignanas, flavonóides e antocianinas, sendo muitos encontrados em *Arabidopsis thaliana* (Lewis e Yamamoto, 1990). Compostos oriundos dessa via estão envolvidos em múltiplos aspectos da resposta da planta frente a estresses bióticos e abióticos (Dixon e Paiva, 1995).

A primeira enzima da via dos fenilpropanóides é a fenilalanina amônia liase (PAL), que converte a fenilalanina em ácido cinâmico, que pela ação de hidrolases e transferases dará origem a centenas de outros compostos (Vogt, 2010; Hoffmann et al., 2003).

Em *Arabidopsis* e outras brassicáceas os principais derivados da via dos fenilpropanóides são os ésteres de ácido sinápico (Bouchereau et al., 1991). O grande passo metabólico na direção dos ésteres de ácido sinápico acontece no p-cumaril-CoA. Este composto está na junção da via que leva à síntese de flavonóides ou fenilpropanóides propriamente ditos. O p-cumaril-CoA é o substrato comum de duas enzimas: chalcona sintase (CHS), que catalisa a formação do esqueleto dos flavonóides pela condensação do p-cumaril-CoA com três moléculas de malonil-CoA e da hidróxi cinamoil-CoA shikimato/quinato hidroxicinamoil transferase (HCT), que leva à síntese do p-cumaroil shikimato (Hoffmann et al., 2003). Após a ação da HCT ocorre, na sequência, a 3-hidroxilação do p-cumaril shikimato. Em seguida, ocorre a 3-O-metilação do cafeoil-CoA, a 5-hidroxilação do coniferaldeído e a subsequente 5-O-metilação do 5-hidróxi-coniferaldeído. A oxidação do sinapaldeído resultante leva finalmente aos ésteres de ácido sinápico (Schoch et al., 2001; Nair et al., 2002; Franke et al., 2002; Humphreys et al., 1999; Osakabe et al., 1999).

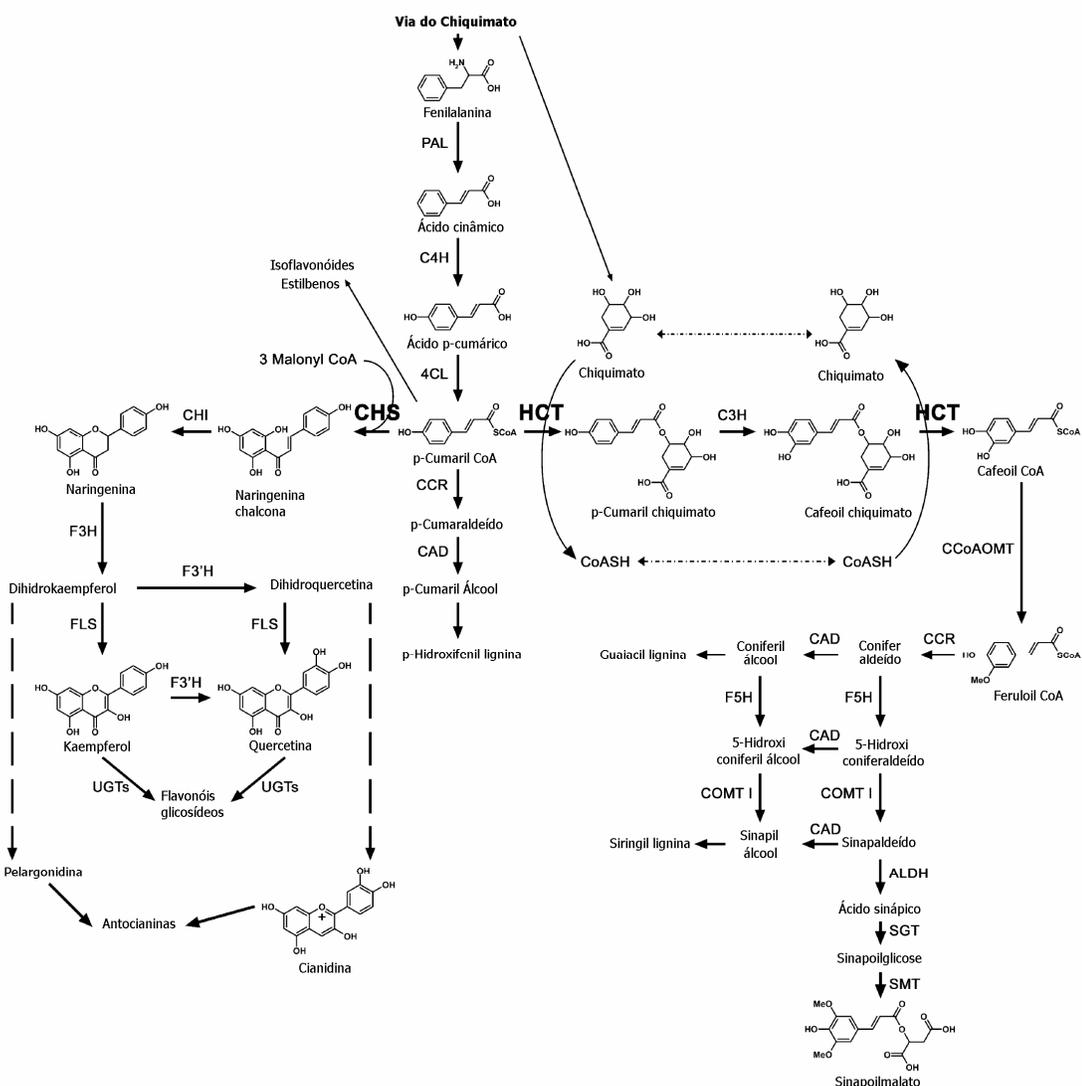


Figura 6: Via biossintética de fenilpropanóides em *Arabidopsis thaliana*. CHS, chalcona sintase; HCT hidroxicinamoil-CoA shikimato/quinase hidroxicinamoil transferase; ALDH, aldeído desidrogenase; C3H, C3-hidroxilase (CYP98A3); C4H, C4- hidroxilase (CYP73A5); F5H, ferulato 5-hydroxylase (CYP84A1); CAD, cinamil álcool desidrogenase; CCoAOMT, cafeoil-CoA O-metiltransferase; CCR, cinamoil-CoA redutase; CHI, chalcona isomerase; 4CL, 4-cumaroil-CoA ligase; COMT I, ácido cafeico O-metiltransferase de classe I; F3H, flavanona 3-hidroxilase; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilase (CYP75B1); FLS, flavonol sintase; PAL, fenilalanina amônia liase; SGT, sinapato UDP-glucose sinapoiltransferase; SMT, 1-O-sinapoil glicose:malato sinapoiltransferase; UGTs, UDP glicosiltransferases de açúcares. Adaptado de Besseau et al. (2007).

Nas brassicáceas o ácido sinápico é esterificado, via sinapoil glicose (1-O-sinapoyl- β -glucose), a diferentes compostos como o sinapoil colina e o sinapoil malato (Figura 7). Sementes de muitas espécies dessa família de plantas acumulam grandes quantidades de sinapoil colina como composto fenólico predominante, que serve como forma de armazenamento de colina e ácido sinápico para germinação (Ruegger et al., 1999). Nas plantas jovens o ácido sinápico liberado é reesterificado via sinapoil glicose a sinapoil malato, que se acumula majoritariamente nas folhas e têm importante papel na proteção contra raios UV (Milkowski e Strack, 2010; Milkowski et al., 2004; Sheahan, 1996).

O papel do sinapoil glicose como doador de sinapoil despertou o interesse nas aciltransferases que dependem de ésteres de 1-O-glicose como grupamento acil a ser doado (Stehle et al., 2009; Wang e Ellis, 1998; Steffens, 2000). Exemplos de aciltransferases dependentes de glicose estão presentes em tomate (Li e Steffens, 2000), *Arabidopsis* (Lehfeldt et al., 2000; Shirley et al., 2001) e *Brassica napus* (Milkowski et al., 2004). Essas proteínas são homólogas a proteases do tipo serina carbóxi peptidases (SCP) e, por isso, foram denominadas serina carbóxi peptidases like (SCPL) (Steffens, 2000). O genoma de *Arabidopsis* codifica 51 SCPLs das quais 19 são aciltransferases dependentes de ésteres de glicose e por isso foram agrupadas em um clado separado (Clado 1A de proteínas SCPL) (Fraser et al., 2005). Quatro enzimas do clado 1A estão bem caracterizadas: SMT, 1-O-sinapoil- β -glicose:L-malato sinapoiltransferase (Lehfeldt et al., 2000); SCT, 1-O-sinapoil- β -glicose:colina sinapoiltransferase (Shirley et al., 2001); SAT, 1-O-sinapoil- β -glicose:antocianina sinapoiltransferase e SST, 1-O-sinapoil- β -glicose:1-O-sinapoil- β -glicose sinapoiltransferase (Fraser et al., 2007), que transferem o grupo sinapoil respectivamente para grupos hidroxil do L-malato, colina, xilulose de uma antocianina e para a glicose de um 1-O-sinapoil- β -glicose (Figura 7).

Os genes para as proteínas SMT (At2g22990) e SCT (At5g09640) foram primeiro identificados usando o mutante *sng* que acumula sinapoil glicose. O mutante *sng1* acumula sinapoil glicose ao invés do sinapoil malato nas folhas e o *sng2* acumula sinapoil glicose ao invés de sinapoil colina nas sementes (Lorenzen et al., 1996; Lehfeldt et al., 2000). Posteriormente, pela deleção de outros genes para SCPLs

flanqueando o *sng1*, foi possível identificar os genes para as proteínas SAT (At2g23000) e SST (At2g23010). Ainda, foi demonstrado que a SMT pode catalisar a formação do 1,2-disinapoyl-glicose, embora esta claramente não seja sua função primária (Fraser et al., 2007).

Os genes At2g22990, At2g23000, At2g23010 e ainda o AT2g22980, também de uma SCPL, estão agrupados em um Cluster no cromossomo 2. Dados moleculares indicam que a evolução dessas SCPLs está relacionada à duplicação de um gene ancestral codificando uma SCPL hidrolítica. Houve, então, uma mudança de hidrolase para aciltransferase seguido de uma especificidade de substratos e produtos. Isso ilustra como a duplicação gênica pode contribuir para a diversidade metabólica nas plantas (Fraser et al., 2007; Milkowski e Strack, 2010).

Genes do metabolismo secundário agrupados em um cromossomo freqüentemente codificam proteínas similares no papel metabólico, mas com especificidade de substratos ou atividade catalítica e papéis biológicos distintos (Frey et al., 1997; Hamberger e Hahlbrock, 2004), embora possam apresentar alguma sobreposição de atividade como no caso da SMT e SST.

O cluster presente no cromossomo dois é um dos sete clusters encontrados em *Arabidopsis* para genes de proteínas SCPL, sendo que os três maiores codificam proteínas SCPL do clado 1A.

As proteínas SCPL compartilham duas características estruturais importantes para a atividade catalítica: o dobramento α/β hidrolase e a tríade catalítica formada por serina, histidina e aspartato. Além disso, estudos sugerem que os seis resíduos de Cisteína presentes em quase todas as SCPLs de *Arabidopsis* são importantes para manter a estrutura terciária das enzimas funcionais (Fraser et al., 2005).

Esse alto nível de conservação evolutiva estende-se aos resíduos que reconhecem o doador do grupamento acil, 1-O-sinapoyl- β -glicose, sendo que a principal diversificação se encontra nos resíduos de reconhecimento do aceptor do grupamento acil (Stehle et al., 2008). Como exemplo tem-se os resíduos que possivelmente desempenham o papel de reconhecimento do L-malato na SMT que não são totalmente conservados na SAT e na SST, nem mesmo na aciltransferase codificada pelo AT2g22980 (Stehle et al., 2006; Fraser et al., 2007). Estas regiões parecem ser os

alvos para modificações estruturais evolutivas que levem à diversidade funcional sem que se perca a identidade química.

Compostos sinapoilados são comumente encontrados em análises metabolômicas em plantas. Assim, SCPLs com outras funções, como a “sinapilação” de flavonóides glicosídeos e antocianinas em outras Brassicáceas podem ocorrer (Baumert et al., 2005; Honda et al., 2005). Essa abundância e diversidade tornam os ésteres de ácido sinápico uma classe interessante para a compreensão da bioquímica da planta. As antocianinas, por exemplo, podem variar muito no padrão de acilação. O grupamento acil ajuda a estabilizar as antocianinas e também afeta os padrões de absorvância causando alterações de cores (Honda et al., 2005).

O papel das SCPLs na acilação das antocianinas mostra que elas podem ser importantes também na sobrevivência e adaptação da planta no ambiente. Antocianinas sinapoiladas já foram encontradas em outras Brassicáceas como repolho (*Brassica capitata*) (Wu e Prior, 2005) e mostarda branca (*Sinapis Alba*) (Takeda et al., 1988). Estes compostos também ocorrem em algumas orquídeas (Tatsuzawa et al., 2004) e na cenoura (*Daucus carota*) (Gläßgen et al., 1998).

O papel biológico de muitas SCPLs ainda não está esclarecido. Contudo, essa classe de enzimas tem ganhado importância em processos de desenvolvimento vegetal por estarem relacionadas à síntese de compostos associados à resposta da planta a diferentes estresses.

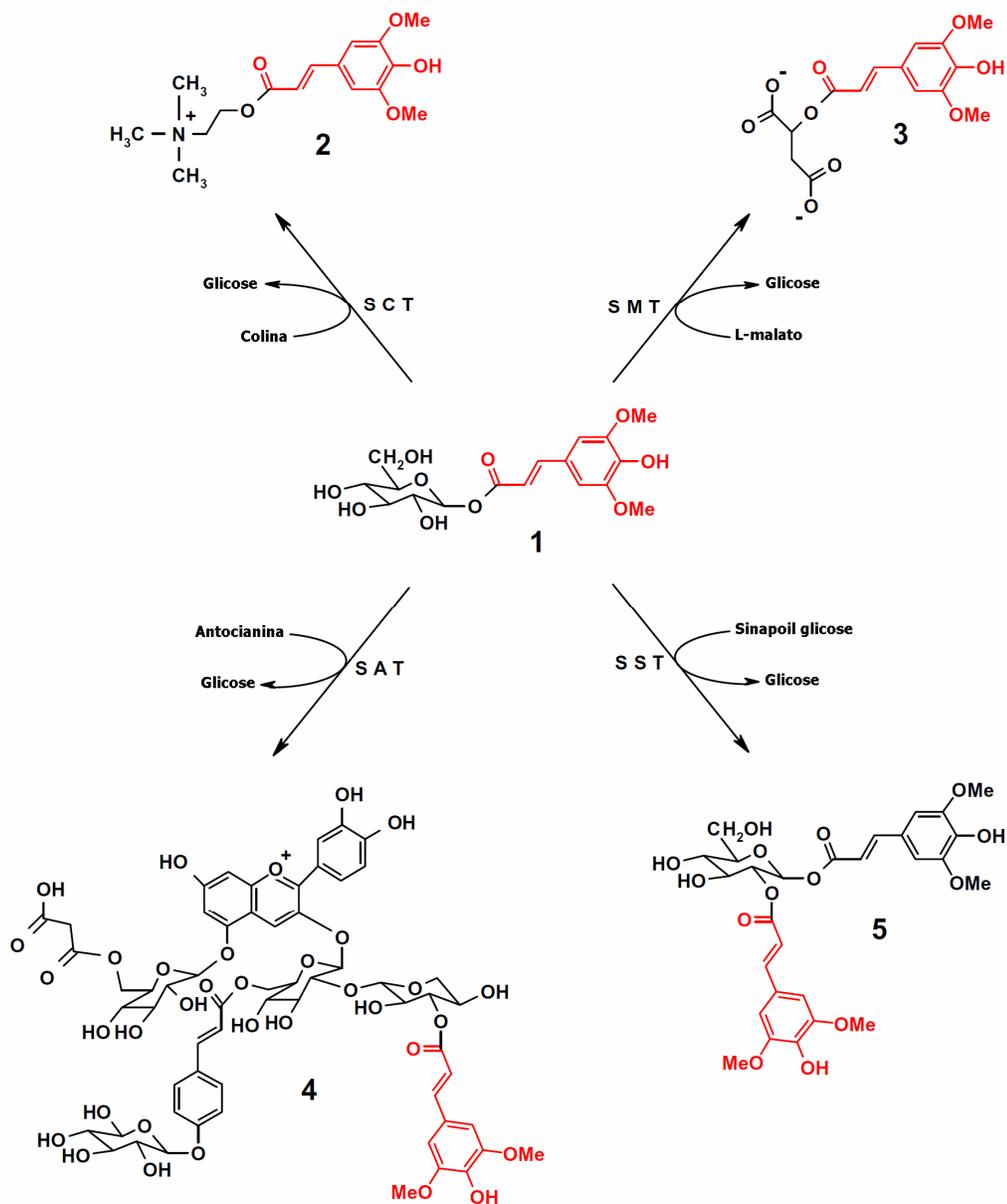


Figura 7: Esquema da formação de ésteres de ácido sinápico em *Arabidopsis* dependente de aciltransferases específicas. **SMT**, 1-O-sinapoyl- β -glicose:L-malato sinapoyltransferase; **SCT**, 1-O-sinapoyl- β -glicose:colina sinapoyltransferase; **SAT**, 1-O-sinapoyl- β -glicose:antocianina sinapoyltransferase; **SST**, 1-O-sinapoyl- β -glicose:1-O-sinapoyl- β -glicose sinapoyltransferase. **1**, 1-O-sinapoyl- β -glicose; **2**, sinapoylcolina; **3**, sinapoyl-L-malato; **4**, 3-O-[6-O-(4-O- β -D-glicopiranosil-4-cumaroil)-2-O-(2-O-sinapoyl- β -D-xilopiranosil)- β -D-glicopiranosil]-5-O-(6-O-malonil- β -D-glicopiranosil) cianidina; **5**, 1,2-di-O-sinapoyl- β -glicose. Adaptado de Stehle et al. (2009).

O outro grande passo na via dos fenilpropanóides, como mencionado acima, é a síntese de flavonóides (Figura 6). O padrão de flavonóides em *Arabidopsis* é simples e consiste de derivados de kaempferol, quercetina e isohamnetina além de antocianinas e proantocianidinas (Matsuda et al., 2009, 2010; Stracke et al., 2009; Veit e Pauli, 1999).

A biossíntese dos flavonóides (Figura 8) se inicia pela condensação do 4-cumaril e malonil-CoA para formar naringenina chalcona, que será convertida na flavanona naringenina pela ação das enzimas chalcona sintase (CHS) e chalcona isomerase (CHI) respectivamente. A naringenina será hidroxilada pela 3 β -hidroxilase para formar os diidroflavonóis.

O kaempferol e a quercetina são sintetizados a partir dos diidroflavonóis aparentemente pela mesma enzima, flavonol sintase. Antes de serem acumulados, os flavonóis serão glicosilados por varias glicosil-transferases. Os diidroflavonóis também podem ser reduzidos pela diidroflavonol redutase (DFR) para formar proantocianidinas e antocianinas (Martens e Forkmann, 1999; Martens et al., 2001; Stracke et al., 2009; Olsen et al., 2009; Martens et al., 2010). A ativação da via dos flavonóides está relacionada a muitos fatores ambientais e do desenvolvimento da planta e é variável de acordo com o tecido (Olsen et al., 2009).

Os flavonóides fazem parte de uma classe de compostos fenólicos amplamente distribuídos no reino vegetal com uma vasta gama de funções biológicas. Eles podem participar como sinalizadores moleculares na reprodução sexual, na embriogênese somática, proteger a planta de patógenos, além da radiação UV e podem ser acumulados em órgãos como raízes (Winkel-Shirley, 2002; Treutter, 2005) e botões florais (Matsuda et al., 2009). Os genes que codificam os flavonóides são regulados durante o desenvolvimento (Winkel-Shirley, 2002), pela luz (Wade et al., 2001) e estudos mais recentes demonstraram que o óxido nítrico (NO) pode ativar a transcrição de genes iniciais da via dos fenilpropanóides (Delledonne et al., 1998, 2001) levando ao estímulo na síntese de flavonóides, como demonstrado em cotilédones de soja (Modolo et al., 2002). Estão também relacionados ao metabolismo e transporte da auxina (Besseau et al., 2007).

As antocianinas são pigmentos que conferem diferentes colorações aos tecidos de plantas (Davies et al., 2003). A tonalidade da coloração depende, entre outras coisas,

do padrão de hidroxilação e glicosilação, bem como, da co-pigmentação com outros flavonóides. Em flores, frutos e tegumentos da semente as antocianinas são essenciais para atrair os polinizadores e dispersores das sementes (Reddy et al., 2007; Winkel-Shirley, 2001). Esses compostos estão presentes também em folhas, caules e raízes. A caracterização das antocianinas, em parte, é facilitada pela fácil distinção dos fenótipos associados à alteração de cor (Winkel-Shirley et al., 1995).

A biossíntese de flavonóis e antocianinas em *Arabidopsis* é controlada por fatores de transcrição. A grande família de fatores de transcrição do tipo MYB está amplamente relacionada ao metabolismo secundário de *Arabidopsis*. Por exemplo, os fatores AtMYB11/PFG1, AtMYB12/PFG1 e AtMYB111/PFG3 controlam a biossíntese de flavonóis em todos os tecidos. Os fatores AtMYB75/PAP1, AtMYB90/PAP2, AtMYB113 e AtMYB114 controlam a biossíntese de antocianinas em tecidos vegetativos e o AtMYB123/TT2 controla a síntese de proantocianidinas na testa da semente (Stracke et al., 2007; Gonzalez et al., 2008; Lepiniec et al., 2006; Gonzalez et al., 2009). Estas funções são bastante conservadas entre diferentes angiospermas. Os fatores de transcrição MYB estão freqüentemente associados ao basic helix-loop-helix (BHLH) e ao WD 40 (Koes et al., 2005).

Análises metabolômicas em *Arabidopsis thaliana* têm demonstrado que diferentes tecidos apresentam um perfil metabólico altamente distinto e característico (Matsuda et al., 2010, 2009; Yonekura-Sakakibara et al., 2007, 2008; Bottcher et al., 2008; Grienenberger et al., 2009). Botões florais acumulam especialmente grande quantidade flavonóis glicosídeos, ao passo que nas folhas, o sinapil malato é o composto majoritário, mas também ocorrem flavonóis, particularmente derivados de kaempferol. As raízes de *Arabidopsis thaliana* parecem não sintetizar flavonóides, mas estes são acumulados em raízes de plantas que crescem em condições normais, mas não no escuro completo (estioladas) (Lepiniec et al., 2006; Buer et al., 2007). Hemm et al. (2004) mostraram que raízes de *Arabidopsis thaliana* cultivadas sob luz acumularam flavonóides e grandes quantidades de coniferina e siringina, compostos até então não identificados nessa planta.

Os flavonóides podem se acumular em compartimentos celulares diferentes dos quais são sintetizados. As antocianidinas, flavonóis glicosilados e proantocianidinas são

seqüestrados, principalmente no vacúolo, e flavonóis metilados, na parede celular. Podem também ser secretados para o ambiente e translocados na planta (Peer et al., 2001; Grotewold, 2004; Buer et al., 2007).

Apesar do perfil metabólico característico nos tecidos, a síntese de compostos fenólicos pode ser induzida por diferentes estresses bióticos e abióticos (Weaver e Herrmann, 1997). A luz parece ser um pré-requisito para a síntese de flavonóides, porém outros fatores como privação de nutrientes, especialmente nitrogênio e fósforo, parecem influenciar de maneira significativa a síntese de flavonóides (Peng et al., 2008; Lillo et al., 2008; Scheible et al., 2004; Müller et al., 2007).

Muitos trabalhos têm demonstrado que flavonóides específicos, como as antocianinas, têm sua síntese aumentada quando as plantas são expostas a estresses luminosos, de temperatura ou privação de nutrientes (Zeng et al., 2010; Peng et al., 2008; Olsen et al., 2009). Atuando como uma espécie de “protetor solar” as antocianinas protegem as folhas, especialmente as senescentes, bem como o aparato fotossintético, facilitando a recuperação de nutrientes a partir das folhas mais velhas (Smillie e Hetherington, 1999; Hoch et al., 2003).

Muitos estudos genéticos e bioquímicos têm ajudado a compreender melhor a enzimologia da via de biossíntese dos fenólicos, os loci estruturais e regulatórios e papéis específicos de produtos finais. Em parte, isso se deve ao fato de que mutações em genes que codificam esses compostos não são letais e em alguns casos fornecem fenótipos facilmente distinguíveis (Winkel-Shirley et al., 1995; Bessau et al., 2007). Em *Arabidopsis*, existem vários mutantes para enzimas participantes da rota de biossíntese desses compostos que contribuíram enormemente para o conhecimento que se tem hoje a respeito dessa via (Broun, 2005). Um exemplo é o fenótipo *transparent testa (tt)*, que afeta a coloração da casca da semente em *Arabidopsis thaliana* e é resultado de defeito em algum ponto da via de biossíntese dos flavonóides (Figura 8) e têm sido muito empregado em estudos para a compreensão da função dos flavonóides nesta espécie (Koornneef et al., 1982; Koornneef, 1990; Winkel-Shirley et al., 1995).

Os mutantes *tt* têm possibilitado, por exemplo, a compreensão do papel dos flavonóides no transporte de auxina e nas características de crescimento da planta (Buer e Muday, 2004; Saslowsky et al., 2000). A biossíntese de flavonóides foi

restaurada em mutantes *tt4*, deficientes para a enzima CHS, quando tratados com naringenina, um precursor dos flavonóides, resultando em uma distribuição normal da auxina (Murphy et al., 2000). Diversas alterações estruturais foram descobertas em mutantes *tt* em comparação com o selvagem. Essas diferenças incluem aumento da densidade de raízes laterais nos mutantes *tt5*, *tt6* e *tt10*, diminuição da densidade de raízes laterais no *tt4* quando cultivados em ágar inclinado e um longo hipocótilo no *tt6* (Buer e Djordjevic, 2009).

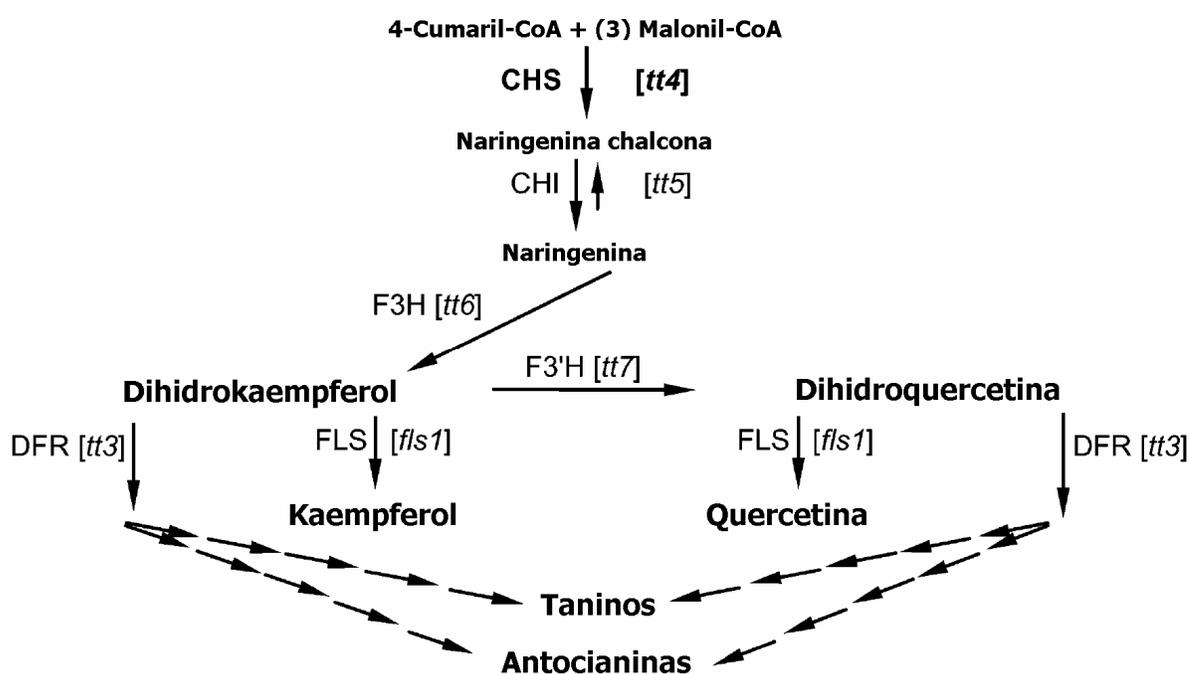


Figura 8: Via dos flavonóides em *Arabidopsis* evidenciando algumas mutações. As mutações *tt1*, *tt2*, *tt8* e *ttg* estão em genes regulatórios envolvidos em vários pontos da via. As demais mutações estão em pontos específicos da via. Adaptado de Buer e Muday (2004).

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar como a produção de fenilpropanóides se correlaciona com o metabolismo primário de nitrogênio e a emissão de óxido nítrico (NO) na planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Sendo esta uma via bastante ampla, com diferentes produtos finais, procurou-se comparar a produção desses compostos na planta selvagem com aquela de um mutante natural (*nia1 nia2*) duplo-deficiente para a nitrato redutase (NR), que apresenta produção reduzida de NO, bem como reduzidos níveis de aminoácidos nas folhas. Para que o objetivo proposto pudesse ser alcançado, as seguintes abordagens foram feitas:

- (1) Determinar a atividade da NR em folhas, raízes e botões florais na planta selvagem e no mutante *nia1 nia2*.
- (2) Avaliar o efeito da deficiência na NR sobre o nível de aminoácidos nas folhas, raízes e botões florais.
- (3) Avaliar o efeito da deficiência na NR sobre a emissão de NO nas folhas.
- (4) Avaliar o efeito da deficiência na NR sobre a síntese de fenilpropanóides nas folhas e botões florais.
- (5) Avaliar o efeito da elevação dos níveis de aminoácidos e NO sobre a síntese de fenilpropanóides nas folhas.
- (6) Avaliar o efeito da deficiência na NR sobre a indução da síntese de antocianinas nas folhas, por meio de estresse luminoso.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e condições de cultivo

Arabidopsis thaliana L. ecotipo Columbia-0 e plantas da mesma linhagem apresentando uma mutação espontânea para os genes estruturais *NIA1* *NIA2* que codificam a enzima nitrato redutase (NR), que as tornam deficientes na assimilação de nitrato foram utilizadas. As sementes foram esterilizadas superficialmente e as plantas cultivadas em vasos com substrato/vermiculita (1:1) sendo regadas três vezes por semana com uma solução nutritiva composta por 5 mM KH_2PO_4 , 2.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 mM MgSO_4 , 0.5 mM CaCl_2 e micronutrientes como descrito por (Wilkinson e Crawford, 1993). A concentração de nitrogênio no meio foi variável: considerou-se baixo nitrato a concentração de 2.5 mM NH_4NO_3 + 10 mM de KCL; e alto nitrato a concentração de 2.5 mM NH_4NO_3 + 10 mM KNO_3 . As plantas também foram cultivadas *in vitro* com meio acrescido de phytigel 2,8% e sacarose 1%. Em alguns tratamentos foi acrescentada glutamina (10 mM) nos meios de cultura para irrigação do mutante *nia1 nia2* ou no meio *in vitro* de acordo com Oliveira et al. (2009). Ainda, em alguns tratamentos foi adicionado malato e os doadores de NO 2,2'-(Hidroxinitrosohidrazino)bis-etanamino (NOC-18), com meia-vida de 3400 minutos e 3-(Aminopropil)-1-hidroxi-2-oxo-triazeno (NOC-5) com meia-vida de 93 minutos (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) no meio de cultura das plantas cultivadas *in vitro* de acordo com as concentrações especificadas nas legendas das figuras.

As plantas foram mantidas em câmaras de crescimento com intensidade de luz de $90 \mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sob umidade de 100%, 22 °C e fotoperíodo de 12 horas. Para indução da síntese de antocianinas as plantas, após três semanas de cultivo, foram transferidas para luz contínua a $120 \mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por 7 dias antes da coleta. Todos os experimentos foram realizados com plantas de quatro a cinco semanas de idade. Os botões florais foram coletados na fase 11 do desenvolvimento de acordo com Smyth et al. (1990).

3.2 Medida *in vivo* da atividade nitrato redutase

A medida *in vivo* da atividade da nitrato redutase foi feita de acordo com Reed et al. (1980), com modificações adaptadas por Majerowicz (2003). O método consiste na infiltração de uma solução de nitrato no tecido e medida do nitrito produzido e difundido para o exterior do tecido. Folhas, raízes e botões florais de *Arabidopsis thaliana* de ambos os genótipos (selvagem e *nia1 nia2*) foram coletados e pesados em quantidade suficiente para 100 mg. As folhas e raízes foram cortadas e colocadas em seringas com 15 mm de diâmetro e 60 mm de altura contendo a solução de infiltração na proporção de 1:20 (m/v). Os botões foram colocados diretamente na seringa sem serem cortados, uma vez que, são bastante pequenos. Como meio de reação foi utilizado Tampão fosfato 0,1M pH 7,5 contendo 1% de n-propanol e 12,5 mM de nitrato de potássio KNO₃. O êmbolo foi introduzido na seringa para manter os tecidos submersos. A seringa foi colocada sob vácuo por aproximadamente 1 min, a seguir o vácuo foi rapidamente liberado e o processo foi repetido mais duas vezes. Imediatamente após a aplicação do vácuo foi retirada uma alíquota (0,1 mL) que foi considerada o tempo zero. As seringas foram, então, incubadas no escuro e novas alíquotas de 0,1 mL foram retiradas de 20 em 20 min. A essas alíquotas foi adicionado o reagente de Griess: 0,1 mL de sulfanilamida 1% (m/v) em HCl 1N e 0,1 mL N-(1-naftil)-etilenodiamina-dicloreto 0,02% (m/v). O nitrito formado foi medido colorimetricamente a 540 nm no leitor de placas ELx800TM (Bio-Tek instruments, Winooski, USA).

3.3 Determinação do conteúdo endógeno de nitrato

O conteúdo endógeno de nitrato foi analisado de acordo com Cataldo et al. (1975). Resumidamente, 50 mg de folhas da planta selvagem e do mutante *nia1 nia2* foram coletadas, homogeneizadas em 300 µL de tampão fosfato 0,1M pH 7,2 e centrifugadas a 12000 *xg* por 15 min. Alíquotas de 50 µL dos extratos foram misturadas com 200 µL de ácido salicílico 5% preparado em H₂SO₄ concentrado. Após 20 min à temperatura ambiente, foram adicionados vagarosamente 4,75 mL de NaOH 2N. As amostras foram

deixadas à temperatura ambiente para esfriar e a abs_{410} foi determinada utilizando o espectrofotômetro MultiSpect 1501 (Simadzu, Kyoto, Japão).

3.4 Quantificação da produção de NO por fluorimetria

A emissão de NO foi determinada conforme descrito por Seligman et al. (2008) com modificações. Amostras de folha foram lavadas em água deionizada e incubadas em 300 μ L de solução contendo o indicador 4,5-diaminofluoresceína na sua forma livre (DAF-2), a 25 μ M, preparado em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2), à temperatura ambiente, sob abrigo de luz. Após 1 hora, as amostras foram retiradas do meio de reação e o volume foi completado para 1500 μ L com o tampão fosfato resultando na concentração final de 5 μ M do DAF. A suspensão foi centrifugada por 5 minutos a 6800 xg e a leitura foi feita em um espectrofluorímetro F-4500 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japão). A emissão de fluorescência (varredura entre 500-550nm) de cada tratamento foi monitorada sob excitação de 495 nm. A fluorescência basal do DAF na ausência do tecido foliar foi descontada de cada amostra. A quantificação da fluorescência foi obtida a partir de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de uma solução saturada de NO (1.75 nmol/ μ L) obtida como descrito por Oliveira et al. (2009).

3.5 Extração de aminoácidos

Folhas, raízes e botões florais de *Arabidopsis thaliana* de ambos os genótipos (selvagem e *nia1 nia2*) foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Os aminoácidos livres foram extraídos de acordo com Oliveira et al. (2009), através da homogeneização das amostras congeladas em almofariz com metanol/clorofórmio/água (12:5:3, v/v). O homogeneizado resultante foi incubado em temperatura ambiente por 24 h e posteriormente centrifugado por 30 min a 1500 xg . O sobrenadante foi coletado e misturado com clorofórmio e água (4:1:1,5, v/v). Após 24 h,

a fase aquosa foi separada, liofilizada e armazenada para análise do conteúdo de aminoácidos.

3.6 Processo cromatográfico para identificar o conteúdo de aminoácidos

Os aminoácidos foram separados e analisados por HPLC de fase reversa (Shimadzu, Kyoto, Japão), por meio da derivatização com o reagente *o*-phthaldialdehyde (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) utilizando uma coluna Waters Spherisorb ODS2 C-18 com 5 μ m, 250 mm x 4,60 mm. A fase móvel foi composta por metanol 65% (solvente A) e tampão fosfato pH 7,25 (50 mM de acetato de sódio, 50 mM de fosfato de sódio dibásico, 1,5 mL de ácido acético, 20 mL de tetrahidrofurano, 20 mL de metanol em 1 L de água, solvente B) em um fluxo de 0,8 mL/min. O gradiente do solvente A aumentou na proporção de 20 a 60% entre 0 e 25 min, 60 a 75% entre 25 e 31 min e 75 a 100% entre 31 e 50 min e então retornou-se às condições iniciais para reequilibrar a coluna. O eluente da coluna foi monitorado com detector de fluorescência modelo RF-10AXL operando com comprimento de onda de excitação de 250 nm e de emissão de 480 nm (Puiatti e Sodek, 1999).

3.7 Extração dos metabólitos secundários

A extração dos fenilpropanóides foi feita de acordo com Hagemeyer et al. (2001). Folhas e botões florais de *Arabidopsis thaliana* de ambos os genótipos (selvagem e *nia1 nia2*) previamente coletados e congelados em nitrogênio líquido foram macerados com uma solução metanol/H₂O 50% (v/v; 20 μ l/10 mg peso fresco) e centrifugados a 15000 $\times g$ por 15 min. Para extração das antocianinas o metanol foi acidificado com 1% de ácido acético (Stobiecki et al., 2006). O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi extraído novamente. Os sobrenadantes foram combinados onde apropriado. O solvente foi evaporado a 40°C em concentrador de amostras Ce ntriVap (Labconco, Kansas City, USA) e o resíduo redissolvido em metanol/H₂O 50% (20 μ L/10mg peso fresco inicial). As amostras foram armazenadas a -80°C para posterior a nálise em HPLC

3.8 Processo cromatográfico para análise da produção de fenilpropanóides

As amostras foram filtradas e analisadas como descrito por (Besseau et al., 2007) usando uma coluna C-18 Shimpack VP-ODS (4 μ m, 4.6 x 250 mm) como parte do sistema de HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japão) em um gradiente de acetonitrila/H₂O/Ac. fórmico (10/89.9/0.1) como solvente A e acetonitrila/H₂O/Ac. fórmico (80/19.9/0.1) como solvente B a 30°C e um fluxo de 1mL/min como segue: 100% do solvente A para 50% do solvente B por 50min, 50% do solvente B para 100% do solvente B por 5 min, 100% do solvente B para 100% do solvente A por 5 min e 100% do solvente A por 10 min para reequilibrar a coluna. Os compostos foram primeiro caracterizados pelo tempo de retenção e por seu espectro de absorção a 345nm para os flavonóis e derivados do ácido sinápico e 520 nm para as antocianinas usando um Detector de arranjo de Diodos modelo SPD-M20A. Kaempferol e ácido sinápico foram usados como padrões para quantificação dos flavonóis e ésteres de ácido sinápico respectivamente.

3.9 Identificação dos fenilpropanóides por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MSⁿ) e UPLC-MS.

A identificação dos ésteres de ácido sinápico e de flavonóis foi feita por HPLC operando como descrito acima conectado a um espectrômetro de massas Ion Trap Esquire 4000 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) com fonte de ionização do tipo electrospray (ESI) operando nos modos negativo e positivo, no laboratório da Profa. Adriana Zerlotti Mercadante, do Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP. Os espectros de massas foram adquiridos entre 100 e 800 de razão massa/carga (m/z) e os parâmetros gerais foram os seguintes: voltagem do capilar, 4000 V; capilar de saída, 70 V; skimmer 1, 12,4 V; skimmer 2, 5 V; gás de arraste (N₂) a 310 °C; fluxo de 9 L/min; nebulizador a 60 psi; energia de fragmentação de 1,4 V. Os espectros foram processados no analisador de dados da Bruker Daltonics. Os picos foram identificados pelo padrão de fragmentação com base

em dados reportados na literatura (Tohge et al., 2005; Stobiecki et al., 2006; Matsuda et al., 2009, 2010).

As antocianinas, quando presentes nas amostras, foram caracterizadas por meio de um UPLC-MS TQD Micromass (Waters, Manchester, Inglaterra) no laboratório do Prof. Paulo Mazzafera, do Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, UNICAMP, equipado com um sistema de bombeamento binário de ultratorque, forno de colunas, sistema automático de injeção, e detector de massas do tipo triplo quadrupolo. A coluna usada foi uma Waters C-18 (5 µm, 50 x 2.1 mm). As condições gerais para o UPLC foram adaptadas do HPLC utilizando os mesmos solventes a um fluxo de 0,25 mL/min: 100% do solvente A para 60% do solvente B por 8 min, 60% do solvente B para 100% do solvente B por 1 min and então 2 min para reequilibrar a coluna em 100% do solvente A. A temperatura da coluna foi a mantida a 30 °C. Após a separação cromatográfica o eluente foi ionizado pela interface de eletrospray (ESI) e analisado no modo positivo nas seguintes condições: Voltagem do capilar, 3000V; voltagem do cone, 30 V; gás de dessolvatação a 300 °C; fonte a 150 °C ; gás de dessolvatação a 480 L/h e para o cone de seleção dos íons a 9 L/h. Os espectros de massas foram adquiridos entre 50 e 1300 de razão massa/carga (m/z) e processados utilizando o software MassLynx. Os picos foram identificados pelo padrão de fragmentação com base em dados reportados na literatura (Tohge et al., 2005).

3.10 Análise da produção de ácidos orgânicos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas

Os ácidos orgânicos foram extraídos usando o mesmo protocolo descrito para a extração de aminoácidos. Uma alíquota de 300 µL dos extratos foi seca a 40°C em concentrador de amostras CentriVap (Labconco, Kansas City, USA) e derivatizada com *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil) trifluoroacetamida em piridina a 70°C por 30 min. Os ácidos orgânicos foram analisados em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas QP2010plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) com uma coluna DB5 (0,25 µm, 0,32 mm x 30 m). A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 100°C

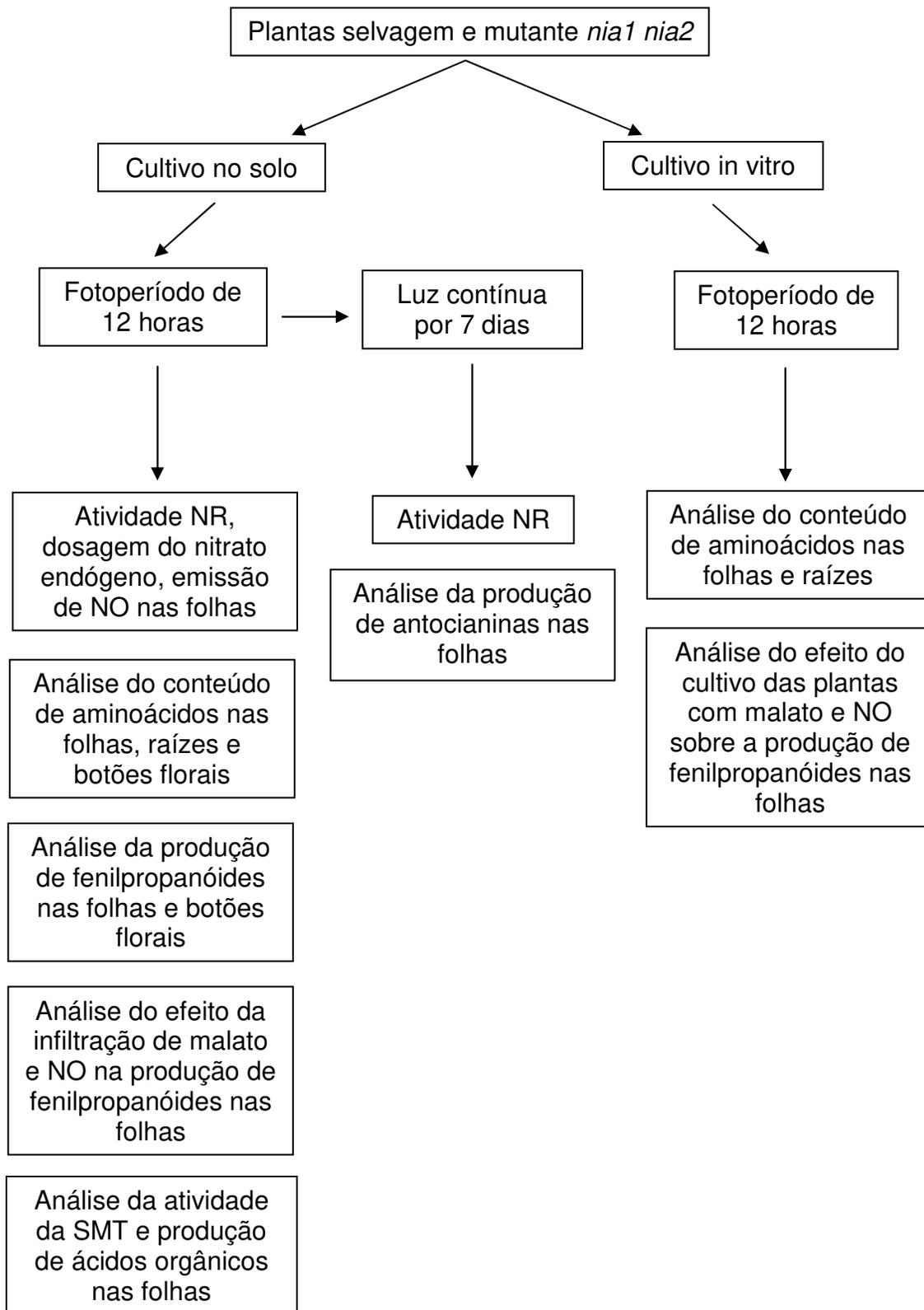
por 4 min e então aumentou linearmente até 290°C a 6°C/min; a incubação final foi mantida nessa temperatura por 1 min. As temperaturas do injetor, da interface e da fonte de íons foram respectivamente 290°C, 290°C e 200°C. O volume de injeção foi 2 µL e o hélio foi utilizado como gás de arraste. O espectro de massas foi obtido com a ionização das moléculas por impacto de elétrons a 70 eV.

3.11 Determinação da atividade da SMT

A atividade da SMT foi determinada de acordo com Lorenzen et al. (1996). Folhas das plantas selvagem e do mutante *nia1 nia2* foram maceradas em 5 volumes de tampão fosfato 0,1M pH 6,2 contendo 20% (m/v) de polivinilpirrolidona (PVPP). Os extratos foram centrifugados a 10000 *xg* por 5 min e os sobrenadantes coletados para os experimentos. A mistura de reação foi composta por 1 mM de sinapoil glicose, 100 mM de malato e diferentes concentrações de NOC5 (3-(aminopropil)-1-hidroxi-3-isopropil-2-oxo-1-triazeno) e cPTIO (2-(4-carboxifenil) - 4,4,5,5-tetrametilimidazoline - 1-oxil-3-oxide) em tampão fosfato 0,1M pH 6,0. A reação foi iniciada pela adição do extrato contendo a proteína (5µL). As amostras foram incubadas a 30 °C por 60 min e a reação interrompida pela adição do mesmo volume de metanol. As amostras foram analisadas por HPLC como descrito acima. O sinapoil glicose foi coletado diretamente do HPLC. A coleta foi feita no intervalo de tempo de 14 a 14,5 min. As amostras coletadas foram misturadas e liofilizadas a 40°C em um CentriVap (Labconco, Kansas City, USA). O precipitado foi redissolvido em tampão fosfato pH 6,0 e analisado por LC/MS para confirmar a presença e pureza do Sinapoil glicose. O conteúdo de proteínas nos extratos foi determinado pelo método de Bradford (1976) usando albumina soro bovina como padrão.

3.12 Organograma dos experimentos realizados

O organograma 1 apresenta um resumo geral de todos os experimentos realizados. Como pode ser observado, a atividade NR, o nível endógeno de nitrato e a emissão de NO foram determinados apenas nas plantas cultivadas no solo. A determinação do conteúdo de aminoácidos nas folhas e nas raízes foi feita tanto em plantas cultivadas no solo como *in vitro*. Já a determinação de aminoácidos nos botões florais foi feita apenas nas plantas cultivadas no solo, já que a floração foi incipiente na planta cultivada *in vitro*. O perfil de fenilpropanóides foi determinado nas folhas de plantas cultivadas no solo e *in vitro* e nos botões florais das plantas cultivadas no solo, já que, como explicado anteriormente, não houve indução satisfatória de floração no cultivo *in vitro*. Nas raízes não foi determinado o perfil de fenilpropanóides, já que a síntese destes metabólitos é dependente de luz e, mesmo nas plantas cultivadas *in vitro*, a produção destes compostos é de difícil indução. Ainda, a produção de antocianinas foi determinada nas folhas das plantas crescidas no solo e submetidas a um estresse de luz. A atividade NR das folhas destas plantas também foi medida. A determinação do efeito do malato e do NO na produção de ésteres de ácido sinápico foi feita adicionando-se estes compostos no meio de cultivo *in vitro* das plantas e infiltrando folhas de plantas adultas cultivadas no solo. A atividade SMT foi determinada a partir das folhas de plantas cultivadas no solo, bem como a determinação de ácidos orgânicos. O detalhamento de cada condição experimental está especificado nas legendas das figuras.



Organograma 1: Resumo geral dos experimentos realizados

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Atividade da nitrato redutase

A função da NR na assimilação do nitrato é bastante conhecida, bem como, sua regulação por diversos sinais em nível transcricional e pós transcricional, sendo o próprio nitrato um regulador importante dessa enzima (Crawford, 1995). Em *Arabidopsis thaliana* o gene *nia2* é responsável por 90% da atividade NR e o gene *nia1* pelos 10% restantes. Entretanto, o mutante *nia1 nia2* utilizado nesse trabalho não foi caracterizado como nulo para a NR (Wilkinson e Crawford, 1993). Assim, a atividade da NR foi avaliada *in vivo* nas plantas selvagem e mutante cultivadas com alto (12,5 mM) e baixo nitrato (2,5 mM). Conforme esperado, a planta mutante apresentou atividade NR muito inferior à planta selvagem. A Figura 9A mostra a atividade da NR em folhas, botões florais e raízes da planta selvagem cultivada com alto nitrato (12,5 mM) e da mutante cultivada baixo nitrato (2,5 mM) onde se observa uma atividade crescente ao longo do tempo na selvagem e uma diminuta atividade na mutante. Após 80 min, a atividade NR nas raízes, folhas e botões da planta selvagem foi de $0,71 \pm 0,05$, $0,57 \pm 0,03$ e $0,4 \pm 0,05$ $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$, enquanto que na mutante a atividade NR foi de $0,009 \pm 0,03$, $0,024 \pm 0,01$ e $0,036 \pm 0,034$ $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$, sem diferenças significativas entre os órgãos. Quando a mutante foi cultivada com alto nitrato (12,5 mM) houve um aumento na atividade da NR nas folhas ($0,093 \pm 0,04$ $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$) ao passo que na selvagem cultivada com baixo nitrato (2,5 mM) houve diminuição na atividade da NR ($0,45 \pm 0,025$ $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$), conforme mostra a Figura 9B. Mesmo assim, ainda é possível observar uma grande diferença entre a planta selvagem e mutante. Isso mostra que a planta mutante mantém uma pequena atividade enzimática e essa atividade é dependente do substrato.

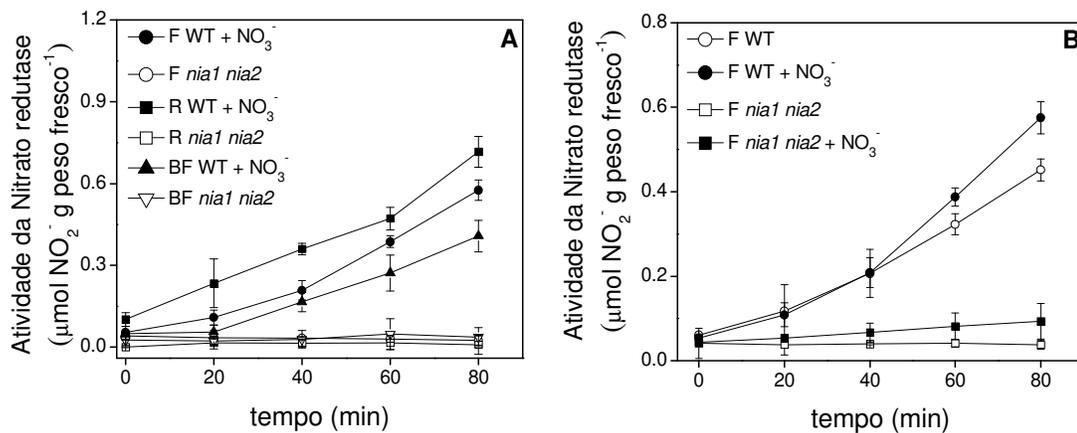


Figura 9: Atividade *in vivo* da NR em folhas, raízes e botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante. As plantas foram cultivadas no solo e irrigadas com solução nutritiva contendo baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻). A: Comparação da atividade NR entre folhas (F), raízes (R) e botões florais (BF) de plantas selvagens cultivadas com alto nitrato (WT + NO₃⁻) e de plantas mutantes cultivadas com baixo nitrato (*nia1 nia2*); B: Efeito do nitrato sobre a atividade NR das folhas (F) selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas com alto (+NO₃⁻) e baixo nitrato. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.1.1 Efeito do estresse de luz na atividade NR

Por ser uma enzima rápida e reversivelmente modulada e responder a muitos sinais, como mencionado acima, a atividade da NR pode ser avaliada em diferentes circunstâncias. Além do nitrato, um fator ativador da NR é a luz, embora não seja um sinal direto de ativação. A partir disso foi avaliado o efeito da luz sobre a atividade da NR de folhas de plantas selvagem e do mutante *nia1 nia2* cultivadas com alto (12,5 mM) e baixo nitrato (2,5 mM). As plantas, inicialmente cultivadas sob fotoperíodo a 90 $\mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, foram mantidas por 7 dias sob luz contínua com intensidade aumentada para 120 $\mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Após esse período as folhas foram coletadas e analisadas.

A Figura 10A mostra que a atividade da NR nas plantas mantidas sob luz contínua foi de 1,20 e 1,27 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$ para a selvagem e 0,017 e 0,045 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$ para o mutante *nia1 nia2* após 80 min para as plantas cultivadas com baixo e alto nitrato, respectivamente. Na Figura 10B pode-se notar que a atividade da NR na selvagem cultivada com alto nitrato aumentou de 0,57 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$ na planta mantida sob fotoperíodo para 1,27 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$ na planta mantida sob luz contínua, evidenciando a ativação da NR, ao passo que, no mutante *nia1 nia2* foi de 0,09 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$ na planta mantida sob fotoperíodo para 0,045 $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g peso fresco}^{-1}$ na planta mantida sob luz contínua. Conforme esperado, houve intensa ativação da NR na planta selvagem mantida sob luz contínua e maior intensidade luminosa, mas não no mutante.

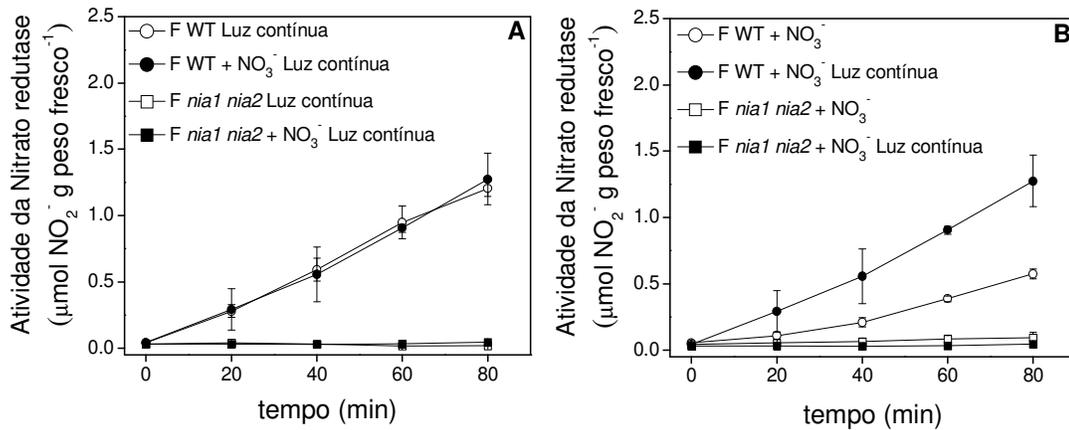


Figura 10: Efeito do estresse de luz sobre a atividade NR nas folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2*. As plantas foram cultivadas no solo, irrigadas com solução nutritiva contendo baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e mantidas por 7 dias sob luz contínua a 120 μmol fótons m⁻² s⁻¹. A: Efeito do nitrato sobre a atividade NR das folhas de plantas mantidas sob luz contínua; B: Comparação da atividade NR de folhas mantidas sob luz contínua ou sob fotoperíodo. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.2 Determinação do conteúdo de nitrato endógeno

Como esperado o mutante *nia1 nia2* apresentou baixa atividade NR comparado a selvagem (Figura 9A). Porém, o mutante foi sensível à variação de nitrato no meio, já que apresentou um pequeno aumento na atividade NR quando cultivada com alto nitrato (Figura 9B). O uso eficiente do nitrogênio depende de sua absorção, assimilação e translocação. Assim é provável que o mutante *nia1 nia2* acumule maior quantidade de nitrato que o selvagem por ser deficiente na assimilação desse nutriente.

A Figura 11 mostra o nível endógeno de nitrato nas folhas das plantas selvagem e mutante cultivadas com alto e baixo nitrato. Como esperado, em virtude da deficiência na NR, o mutante acumulou mais nitrato que a selvagem. Pode-se observar que o nível de nitrato na planta selvagem cultivada com alto nitrato ($175,17 \pm 14,0 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}$ peso fresco⁻¹) foi semelhante ao do mutante cultivado com baixo nitrato ($191,75 \pm 14,21 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}$ peso fresco⁻¹). A selvagem cultivada com baixo nitrato apresentou o menor nível endógeno de nitrato ($108,83 \pm 17,44 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}$ peso fresco⁻¹), e a mutante cultivada com alto nitrato o maior nível de nitrato ($237,66 \pm 15,26 \mu\text{mol NO}_3^- \cdot \text{g}$ peso fresco⁻¹). Dessa forma, a planta selvagem cultivada com alto nitrato e a planta mutante cultivada com baixo nitrato fornecem um modelo interessante de comparação por apresentarem níveis semelhantes de nitrato endógeno. Ainda, diferenças observadas entre essas plantas não poderão ser atribuídas diretamente ao nitrato.

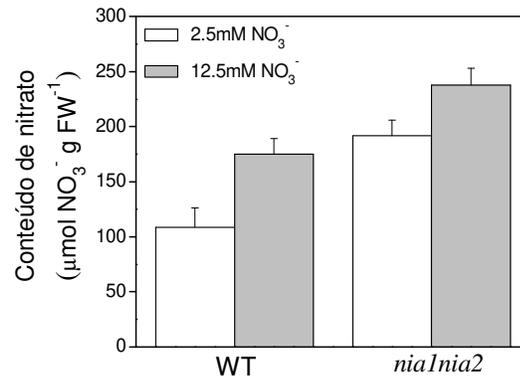


Figura 11: Nível endógeno de nitrato em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato ($+\text{NO}_3^-$). Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata.

4.3 Determinação do nível de aminoácidos

A assimilação do nitrogênio inorgânico em matéria orgânica é fundamental para muitos aspectos do desenvolvimento da planta. A privação de nitrogênio está relacionada a muitas deficiências metabólicas como, por exemplo, redução da capacidade fotossintética (Oliveira et al., 2001).

Nesse sentido, Modolo et al. (2006) demonstraram que o mutante *nia1 nia2* apresenta níveis reduzidos de todos os aminoácidos nas folhas quando comparado com a planta selvagem. Já Oliveira et al. (2009) demonstraram que tratando esse mutante com arginina ou glutamina, os níveis de aminoácidos nas folhas se elevaram aos níveis da selvagem e, ainda, as folhas da planta mutante apresentaram-se maiores e mais verdes, assemelhando-se ao fenótipo da planta selvagem. Como o protocolo estabelecido por Oliveira et al. (2009) demonstrou-se satisfatório para a recuperação fenotípica das plantas mutantes ele foi empregado nesse trabalho, onde, de maneira extensiva foram analisados os níveis de aminoácidos nas raízes e botões florais das plantas selvagem e do mutante *nia1 nia2*. Ainda, foi avaliado como o tratamento com glutamina afetou o conteúdo de aminoácidos nesses órgãos. Esses resultados foram comparados aos obtidos para as folhas. O nível de aminoácidos foi determinado nas plantas cultivadas no solo e *in vitro* com exceção dos botões florais. O cultivo *in vitro* facilita o manuseio das raízes, além do que, era preciso avaliar se o protocolo para a elevação dos níveis de aminoácidos poderia ser aplicado nessa condição. Ainda, o cultivo *in vitro* foi também estabelecido para permitir a utilização de componentes no meio de cultura, como compostos liberadores ou seqüestradores de NO.

A Figura 12 mostra o nível dos aminoácidos individuais nas folhas de plantas cultivadas no solo e *in vitro* com alto e baixo nitrato e na presença de glutamina. Aminoácidos importantes para o transporte de nitrogênio como asparagina e glutamina (Coruzzi et al., 2000) estão drasticamente reduzidos no mutante. Os níveis de aspartato e glutamato, precursores da asparagina e glutamina, respectivamente, também são menores no mutante. A irrigação das plantas com Gln, embora não tenha recuperado os níveis de Glu e Asp, foi eficiente em recuperar os níveis de Asn e Gln das folhas, tanto das plantas cultivadas no solo (Figura 12A), como *in vitro* (Figura 12B). Esse

resultado é coerente com o fato de que a glutamina é importante para o transporte de nitrogênio assimilado pelo xilema a partir de raízes de *Arabidopsis* (Lam et al., 1995). Cabe ressaltar que as plantas cultivadas *in vitro* produziram níveis muito maiores de aminoácidos que as plantas cultivadas no solo.

Esses dados ficam mais claros quando se observa o conteúdo total de aminoácidos nas amostras (Figura 13, A e B). Quando cultivado no solo, o mutante *nia1 nia2* produziu níveis muito menores ($1.088,30 \pm 206,95$ nmol.g peso fresco⁻¹) de todos os aminoácidos nas folhas em comparação à planta selvagem ($3.014,28 \pm 302,80$ nmol.g peso fresco⁻¹) ($p < 0,05$). O cultivo com alto nitrato aumentou ligeiramente o conteúdo total de aminoácidos nas folhas da planta selvagem ($3.760,34 \pm 317,58$ nmol.g peso fresco⁻¹, $p > 0,05$), e não interferiu de no mutante ($1.054,39 \pm 58,78$ nmol.g peso fresco⁻¹). Já o tratamento com Gln foi eficiente em recuperar os níveis de aminoácidos do mutante a valores semelhantes aos da planta selvagem ($3.544,54 \pm 50,10$) (Figura 13A). Isso mostra a eficiência do protocolo estabelecido por Oliveira et al., (2009).

In vitro pode-se notar que o nível total de aminoácidos nas folhas variou com a concentração de nitrato no meio (Figura 13B). A selvagem com baixo nitrato apresentou uma tendência de queda em relação à selvagem com alto nitrato ($9.760,10 \pm 4.474,91$ e $1.3051,34 \pm 1.373,62$ nmol.g peso fresco⁻¹, respectivamente), embora não tenha sido significativo ($p > 0,05$). O mesmo aconteceu com a mutante, que apresentou diferença entre a planta cultivada com alto e baixo nitrato ($6.498,28 \pm 1.302,90$ e $9.768,67 \pm 1.314,46$ nmol.g peso fresco⁻¹, respectivamente), apesar de, também não ter sido significativo. Houve diferença significativa no conteúdo total de aminoácidos apenas entre selvagem com alto nitrato e mutante com baixo nitrato ($p < 0,05$). Entretanto, pode-se notar que a mutante com alto nitrato não apresentou o mesmo nível de aminoácidos que a selvagem (Figura 13B), provavelmente devido à baixa atividade NR (Figura 9). Cabe ressaltar que *in vitro* as plantas são colocadas no meio de cultura com concentrações determinadas de todos os nutrientes e crescem nessa condição. No solo as plantas são regadas regularmente com o meio de cultura. Dessa forma, *in vitro* não há constante reposição do meio de cultura. Como mostrado anteriormente a atividade da NR é responsiva ao nitrato (Figura 9) e *in vitro* isso se torna mais evidente porque a limitação do substrato é maior e isso pode ter causado a diferença entre as plantas

cultivadas com alto ou baixo nitrato. O tratamento com glutamina *in vitro* foi eficiente para recuperar o conteúdo de aminoácidos ($18.544,47 \pm 2.860,10$ nmol.g peso fresco⁻¹) do mutante em níveis até maiores do que a planta selvagem (Figura 13B).

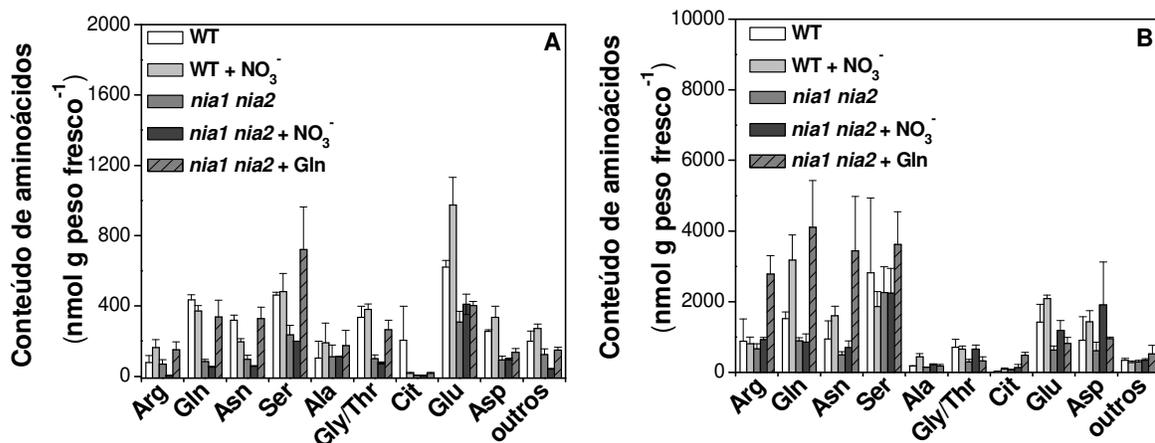


Figura 12: Conteúdo de aminoácidos individuais em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM glutamina (+Gln). A: Plantas cultivadas no solo; B: Plantas cultivadas *in vitro*. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

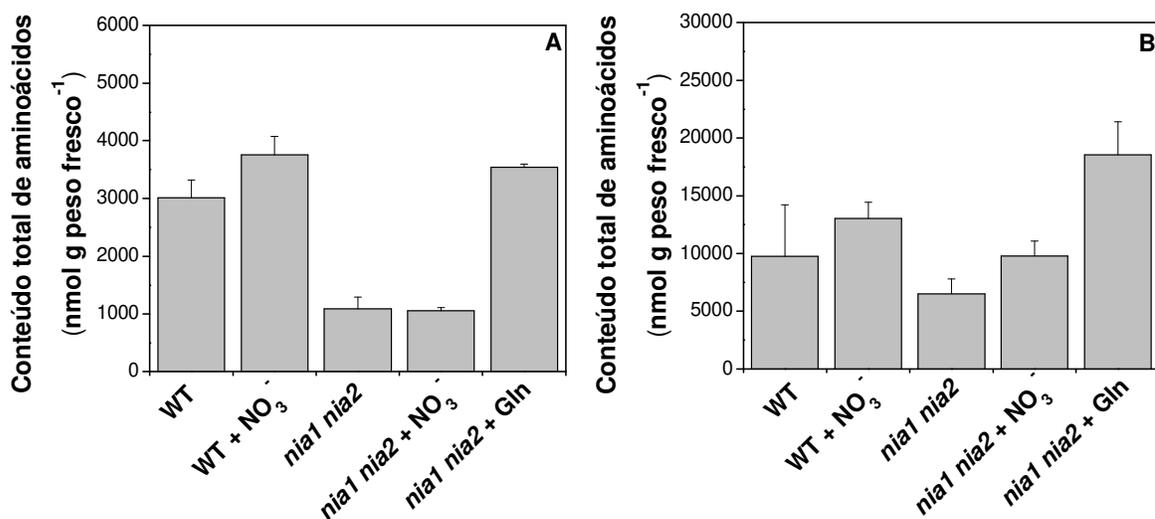


Figura 13: Conteúdo total de aminoácidos em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). A: Plantas cultivadas no solo; B: Plantas cultivadas *in vitro*. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Nas raízes das plantas cultivadas no solo, ao contrário das folhas, o efeito da mutação sobre a NR não afetou de maneira tão drástica o nível dos aminoácidos (Figuras 14A e 15A). Tanto que, nas plantas cultivadas no solo não houve diferença significativa no nível de aminoácidos entre selvagem e mutante. Como pode se observar na Figura 15A, o nível de aminoácidos na planta selvagem cultivada com alto nitrato e mutante cultivada com baixo nitrato não foi diferente. Somente nas mutantes cultivadas com glutamina houve diferença, com um grande aumento desse aminoácido e tendência de aumento de todos os outros. O nível total de aminoácidos (Figura 15A) na selvagem cultivada com alto nitrato foi de $1.879,36 \pm 296,11$ nmol.g peso fresco⁻¹, enquanto na mutante cultivada com baixo nitrato foi de $1.693,81 \pm 332,65$ nmol.g peso fresco⁻¹, sem portanto, diferença significativa ($p > 0,05$). Em contrapartida, na mutante cultivada com glutamina foi de $7.056,36 \pm 1.103,75$ nmol.g peso fresco⁻¹. O fato da planta mutante cultivada com baixo nitrato apresentar níveis de aminoácidos na raiz tão semelhantes à selvagem cultivada com alto nitrato indica que, a amônia presente no meio de cultura talvez seja suficiente para garantir o suprimento de nitrogênio na raiz. A assimilação da amônia, geralmente ocorre na raiz, enquanto o nitrato pode ser assimilado na raiz e nas folhas depois do transporte via xilema (Fischer et al., 1998). Assim, as folhas são mais dependentes do nitrato, porque a amônia deve ser assimilada logo que absorvida pela raiz. Provavelmente por isso, a deficiência na NR foi mais sentida na folha que na raiz em termos de nível de aminoácidos, lembrando que a atividade NR nas raízes da planta mutante é tão baixa quanto nas folhas (Figura 9A). Considerando-se estes resultados não se fez necessário determinar o nível de aminoácidos nas raízes da selvagem cultivada com baixo nitrato e mutante cultivada com alto nitrato, já que, o nitrato não parece ser determinante. O tratamento com glutamina garantiu um excesso desse aminoácido na raiz, o que parece ter sido determinante para a elevação dos níveis de aminoácidos nas folhas (Figura 13), bem como, para recuperação fenotípica da mutante como relatado por Oliveira et al. (2009).

Ao contrário das plantas cultivadas no solo, nas plantas cultivadas *in vitro* o padrão de acúmulo de aminoácidos na raiz foi semelhante ao das folhas no que se refere ao efeito do nitrato e diferença entre selvagem e mutante. Nas raízes das plantas cultivadas *in vitro* o principal aminoácido acumulado, assim como nas plantas cultivadas

no solo, foi a glutamina (Figura 14B). Entretanto, o nível dos aminoácidos variou entre selvagem e mutante e foi dependente da concentração de nitrato no meio.

A Figura 15B mostra que, *in vitro*, as raízes da planta selvagem foram bastante sensíveis à variação na concentração de nitrato. Assim, o conteúdo total de aminoácidos, de $33.726,16 \pm 8.074,20$ nmol.g peso fresco⁻¹ na planta selvagem cultivada com baixo nitrato foi elevado para $68.340,14 \pm 9.525,20$ nmol.g peso fresco⁻¹ na planta com alto nitrato ($p < 0,05$). Entretanto, na mutante com alto nitrato, embora, tenha havido um aumento ($34.569,02 \pm 380,30$ nmol.g peso fresco⁻¹) em relação à mutante com baixo nitrato ($23.234,73 \pm 2.720,91$ nmol.g peso fresco⁻¹) ($p < 0,05$) os níveis não foram tão altos quanto na selvagem com alto nitrato, o que pode ser atribuído à baixa atividade NR da mutante. Também, o tratamento com glutamina não aumentou de maneira tão expressiva os níveis de aminoácidos na mutante, recuperando para valores similares ao tratamento da mutante com alto nitrato ($35.492,33 \pm 4.112,31$). Contudo, não fazia sentido aumentar a concentração de glutamina, uma vez que nas folhas os níveis de aminoácidos na mutante assemelharam-se àqueles da selvagem. Assim como nas folhas, nas raízes das plantas *in vitro* a variação da concentração de nitrato no meio de cultura causou variação dos aminoácidos. É possível que a síntese de aminoácidos nas plantas *in vitro* tenha sido mais dependente do nitrato do que as plantas no solo. A constante reposição do meio de cultura mantinha os níveis de amônia nas plantas no solo, e isso, talvez, tenha minimizado a necessidade do nitrato para a síntese de aminoácidos na raiz. Assim, a deficiência de aminoácidos aparece nas folhas pela baixa atividade NR da mutante. Nas plantas *in vitro*, como não há reposição do meio de cultura, a concentração de nitrato resulta mais claramente na síntese de aminoácidos devido a alterações na atividade da NR. Isso pode ter causado a variação dos níveis de aminoácidos conforme a variação de nitrato no meio. Além disso, outro fator relevante é que as plantas *in vitro* acumularam quantidades maiores de aminoácidos. Por exemplo, na selvagem cultivada *in vitro* com alto nitrato o nível de aminoácidos na raiz e nas folhas foi de $68.340,14 \pm 9.525,20$ e $13.051,34 \pm 1.373,62$ nmol.g peso fresco⁻¹ enquanto nas plantas no solo foi de $1.879,36 \pm 296,11$ e $3.760,34 \pm 317,58$ nmol.g peso fresco⁻¹ respectivamente. Como será mostrado abaixo, os botões florais acumulam grandes quantidades de

aminoácidos e as folhas, usualmente, são fontes desses aminoácidos para os órgãos reprodutivos. As plantas *in vitro* permanecem mais tempo no estadio vegetativo e talvez por isso acumulem maiores quantidades de aminoácidos. Na idade em que foram analisadas, as plantas estavam próximas à fase de transição do estadio vegetativo para o reprodutivo, sendo que, a mutante é precoce nesse processo (Seligman et al., 2008). Como essa transição é mais marcante nas plantas cultivadas no solo, a remobilização de nutrientes deve ser mais intensa que nas plantas *in vitro* resultando num menor acúmulo de aminoácidos bem como em maiores diferenças entre selvagem e mutante na folha.

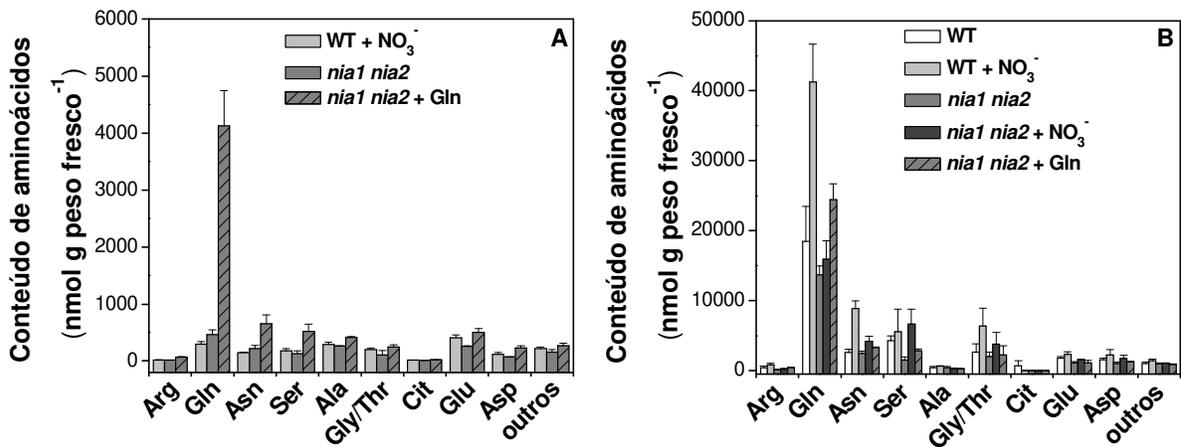


Figura 14: Conteúdo de aminoácidos individuais em raízes de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). A: Plantas cultivadas no solo; B: Plantas cultivadas *in vitro*. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

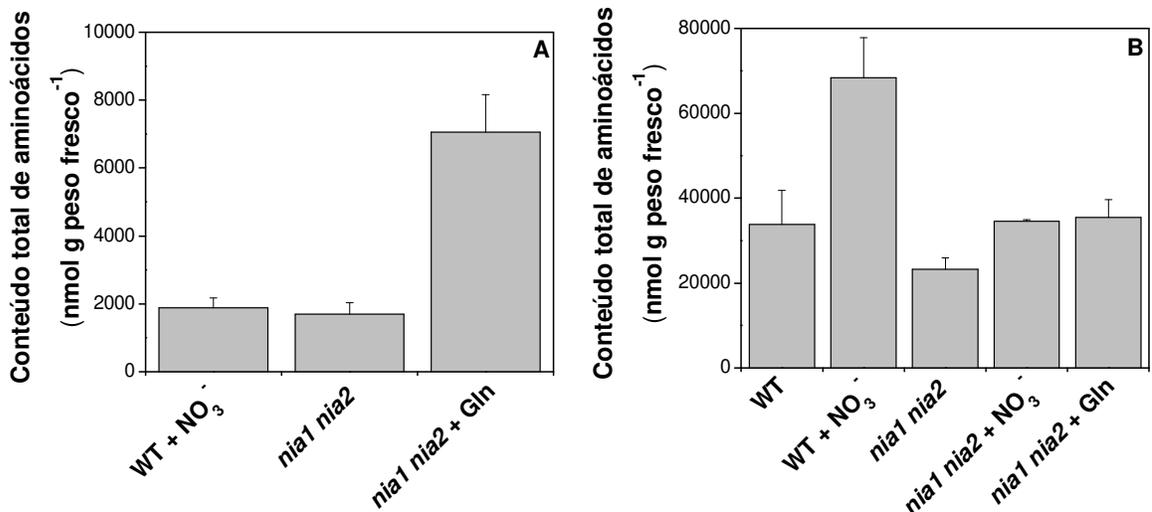


Figura 15: Conteúdo total de aminoácidos em raízes de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). A: Plantas cultivadas no solo; B: Plantas cultivadas *in vitro*. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Os botões florais de plantas cultivadas no solo apresentaram um alto conteúdo de aminoácidos (Figura 16). Embora a atividade NR dos botões florais seja similar às folhas (Figura 9), tanto o nível de aminoácidos individuais como o conteúdo total de aminoácidos não foi diferente entre as plantas. Os principais aminoácidos acumulados foram glutamina, asparagina, serina e aspartato. O nível total de aminoácidos nos botões foi de $24.968,08 \pm 2.577,99$ nmol.g peso fresco⁻¹ para a selvagem com alto nitrato, $21.174,56 \pm 5.149,65$ nmol.g peso fresco⁻¹ para a mutante com baixo nitrato e $25.541,69 \pm 4.714,83$ nmol.g peso fresco⁻¹ para a mutante com glutamina. A ausência de diferença entre a selvagem com alto nitrato e a mutante com baixo nitrato e glutamina parece caracterizar os botões como drenos para os aminoácidos. Por isso, os botões florais apresentam maior nível de aminoácidos em relação às raízes e folhas das plantas cultivadas no solo. Assim, mesmo tendo baixa atividade NR, a mutante não é deficiente em aminoácidos no botão. Em *Arabidopsis* as estruturas reprodutivas são consideradas drenos fracos se comparados a outras plantas (Soudry et al., 2005). No entanto, há que se considerar que ocorre uma remobilização de nutrientes. Dessa forma, a variação da concentração de nitrato no meio não é tão significativa em termos de aminoácidos nos botões, assim como nas raízes.

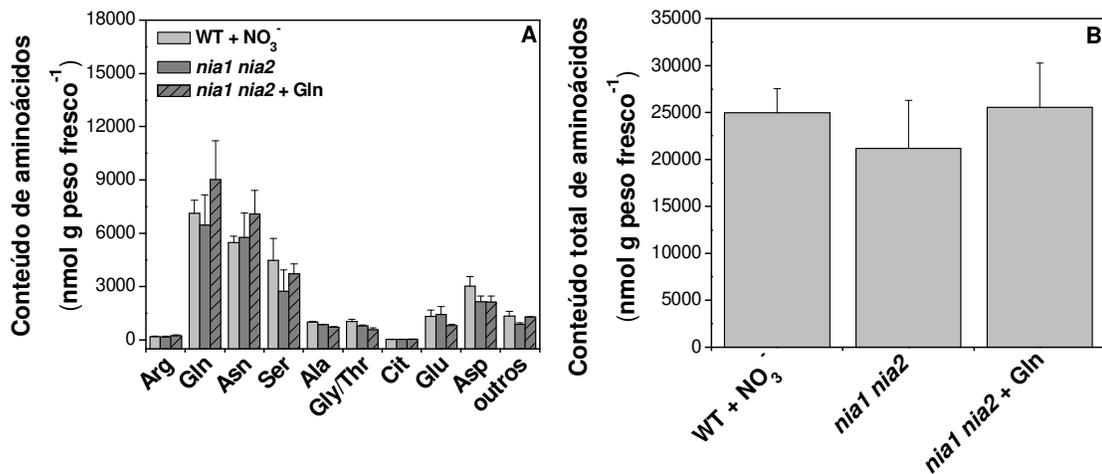


Figura 16: Conteúdo de aminoácidos em botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) com alto nitrato (12,5 mM; +NO₃⁻) e mutante *nia1 nia2* com baixo nitrato (2,5mM) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). Plantas cultivadas no solo. A: Conteúdo de aminoácidos individuais; B: Conteúdo total de aminoácidos. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

4.4 Emissão de NO

Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que folhas e botões florais do mutante *nia1 nia2* são deficientes na produção de NO e que a elevação dos níveis de aminoácidos nas folhas não altera de forma significativa esses resultados, embora haja uma tendência de aumento na planta tratada com arginina (Modolo et al., 2005; Oliveira et al. 2009; Seligman et al., 2008). A Figura 17 confirma esses dados e mostra que a concentração de nitrato no meio afetou a produção de NO nas folhas, tanto na planta selvagem quanto na mutante. Assim, enquanto a emissão de NO pelas folhas da planta selvagem foi de $1,79 \pm 0,18 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{g peso fresco}^{-1}$, na mutante a emissão foi de $0,62 \pm 0,12 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{g peso fresco}^{-1}$. No cultivo com alto nitrato estes valores se elevaram para $2,91 \pm 0,25 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{g peso fresco}^{-1}$ e $1,29 \pm 0,17 \text{ nmol.h}^{-1}.\text{g peso fresco}^{-1}$, respectivamente.

Como discutido acima, não é possível, até o presente momento, estabelecer exatamente a(s) fonte(s) de NO nas plantas, mas a NR têm despontado com crescente relevância, quer por apresentar atividade redutora de nitrito (Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002) ou por prover nitrito para a síntese de NO por outros mecanismos (Modolo et al., 2005).

Em relação aos botões florais, foi demonstrado que estes apresentam emissão de NO muito mais intensa que as folhas (Seligman et al., 2008). No entanto, esta emissão é pouco afetada pela deficiência na NR.

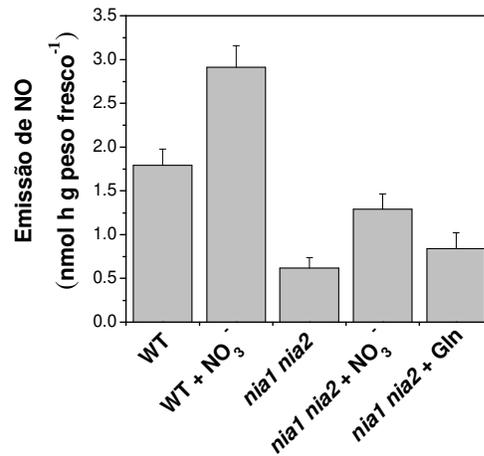


Figura 17: Emissão de NO em folhas *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivada com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

4.5 Análise da produção de fenilpropanóides

4.5.1 Compostos identificados e perfil cromatográfico das plantas

Extratos de folhas e botões florais de *Arabidopsis thaliana* foram analisados por HPLC de fase reversa e espectrometria de massas para identificar a produção de compostos fenólicos na planta selvagem e no mutante *nia1 nia2*. A metodologia empregada permitiu a identificação de flavonóis glicosídeos derivados de Kaempferol, Quercetina e Isoraminetina e ésteres de ácido sinápico na planta selvagem e no mutante *nia1 nia2* em plantas crescidas em condições normais de cultivo, ou seja, sob fotoperíodo de 12 horas e $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Quando as plantas foram estressadas sob luz cont\u00ednua por 7 dias a $120 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ houve a produ\u00e7\u00e3o de antocianinas al\u00e9m dos compostos acima citados. As Tabelas 1 e 2 mostram os compostos identificados com o tempo de reten\u00e7\u00e3o e a raz\u00e3o massa/carga dos \u00edons protonados e desprotonados.

O perfil cromatogr\u00e1fico das folhas crescidas sob fotoper\u00edodo de 12 horas (Figura 18) demonstra a incapacidade da mutante em acumular fenilpropan\u00f3ides ao n\u00edvel da selvagem. Da mesma forma, nas plantas estressadas por 7 dias de luz cont\u00ednua, a mutante n\u00e3o foi capaz de acumular antocianinas como a selvagem (Figura 19). Ao contr\u00e1rio, nos bot\u00f5es florais, selvagem e mutante apresentaram um perfil semelhante e, por isso, a Figura 20 mostra apenas o perfil cromatogr\u00e1fico da planta selvagem. Esses dados s\u00e3o abordados quantitativamente ao longo da apresenta\u00e7\u00e3o dos resultados.

Tabela 1: Ésteres de ácido sinápico e flavonóis glicosídeos identificados em extratos metanólicos de folhas e botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem e do mutante *nia1 nia2* cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Código do pico	Composto identificado	TR (min)	[M+H] ⁺ m/z	[MS/MS] m/z	[M+H] ⁻ m/z	[MS/MS] m/z
SG	Sinapoil Glicose	14,2			385	223
Q1	Quercetina 3-O-Raminosil-glicosídeo 7-O-Raminosídeo	14,4	757	611, 449, 303	755	609, 447
K1	Kaempferol 3-O-Raminosil-Glicosídeo 7-O-Raminosídeo	16,0	741	595, 433, 287	739	593
Q2	Quercetina 3-O-Glicosídeo 7-O-Raminosídeo	18,4	711	449, 303	609	447
K2	Kaempferol 3-O-Glicosídeo 7-O-Raminosídeo	20,8	595	433, 287	593	431, 285
Q3	Quercetina 7-O-Raminosídeo	21,2	595	449, 303	593	447
F1	Isoramnetina-3-Raminosídeo-7-Glicosídeo	21,5	625	317, 463	623	461, 315
K3	Kaempferol 3-O-raminosídeo 7-O-raminosídeo	23,9	579	433,287	577	431, 285
SM	Sinapoil Malato	24,2			339	223, 164
F2	Isoramnetina di-raminosídeo	24,4	609	463, 317	607	461, 315
DSG	1,2-Disinapoilglicose	28,1			591	367, 223 205

Tabela 2: Antocianinas identificadas em extratos metanólicos de folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e do mutante *nia1 nia2* crescidas sob fotoperíodo de 12 horas a 90 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ por três semanas e, em seguida, transferidas para luz contínua por 7 dias a 120 μmol fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa.

Código do pico	Composto identificado	TR (min)	[M+H] ⁺ m/z	[MS/MS] m/z
A1	Cianidina 3-O-[2''-O-(2'''-O-(sinapoil) xilosil) glicosídeo] 5-O-glicosídeo	13,7	949	449,287
A2	Cianidina 3-O-[2''-O-(xilosil)-6''-O-(p-O-(glicosil)-p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-glicosídeo	15,7	757	1051, 889, 287
A3	Cianidina 3-O-[2''-O-(xilosil) glicosídeo] 5-O-glicosídeo	16,6	749	449, 287
A4	Cianidina 3-O-[2''-O-(xilosil) 6''-O-(p-O-(glicosil) p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-[6'''-O-(malonil) glicosídeo]	17,5	1137	889, 535, 287
A5	Cianidina 3-O-[2''-O-(2'''-O-(sinapoil) xilosil) 6''-O-(p-O-(glicosil) p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-glicosídeo	19,8	1257	1095, 449
A6	Cianidina 3-O-[2''-O-(6'''-O-(sinapoil) xilosil) 6''-O-(p-O-(glicosil)-p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-(6''''-O-malonil) glicosídeo	20,2	1343	1095, 535
A7	Cianidina 3-O-[2''-O-(xilosil) 6''-O-(p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-glicosídeo	22,4	889	727, 449, 287
A8	Cianidina 3-O-[2''-O-(2'''-O-(sinapoil) xilosil) 6''-O-(p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-glicosídeo	25,1	1095	287
A9	Cianidina 3-O-[2''-O-(xilosil)-6''-O-(p-cumaroil) glicosídeo] 5-O-malonilglicosídeo	27,2	975	727, 535, 287

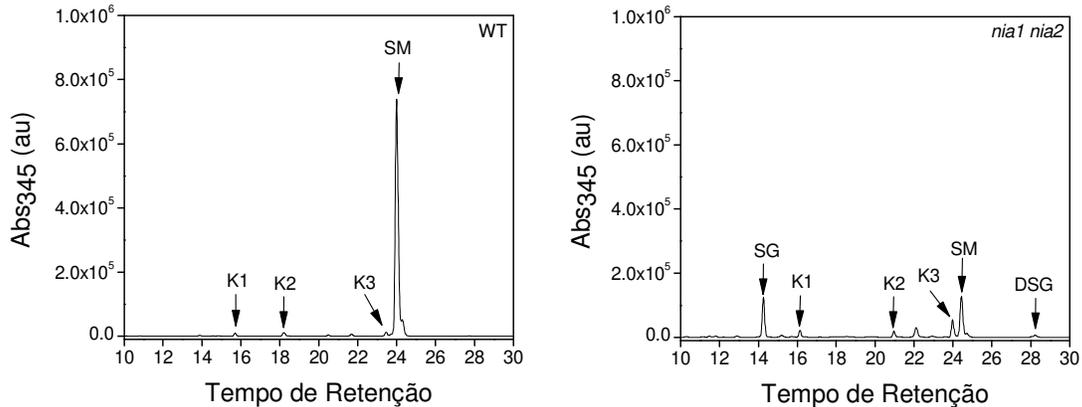


Figura 18: Perfil cromatográfico de ésteres de ácido sinápico e flavonóis glicosídeos em extratos metanólicos de folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Identificação dos picos de acordo com a Tabela 1. Cromatogramas obtidos pela Abs_{345nm}.

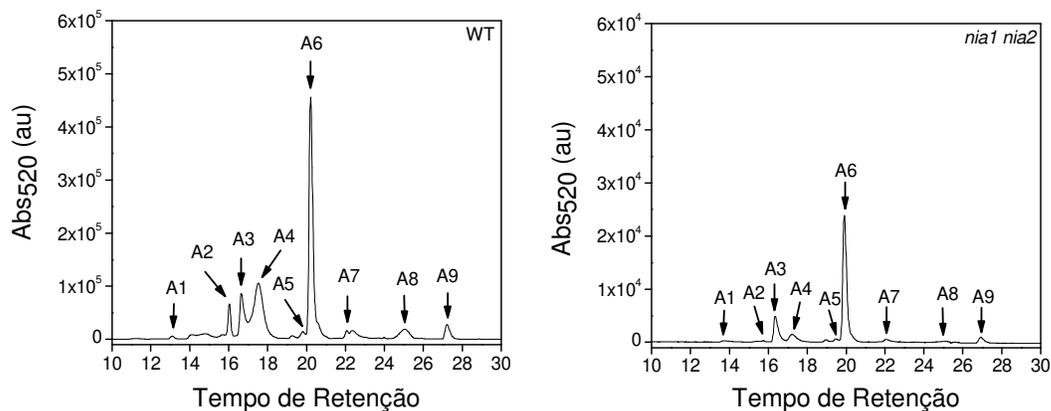


Figura 19: Perfil cromatográfico de antocianinas em extratos metanólicos de folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a 90 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa e, em seguida, transferidas para luz contínua por 7 dias a 120 $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Identificação dos picos de acordo com a Tabela 2. Cromatogramas obtidos pela Abs_{520nm}.

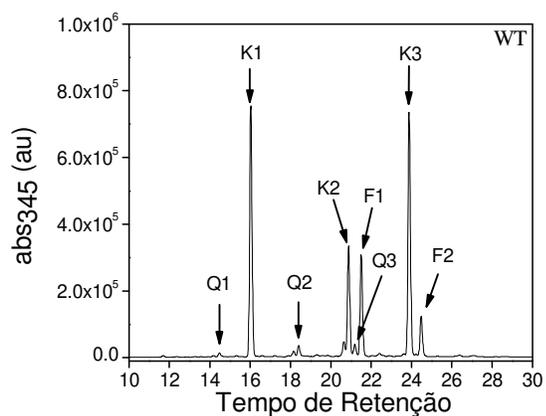


Figura 20: Perfil cromatográfico de flavonóis glicosídeos em extratos metanólicos de botões florais de *Arabidopsis thaliana* do genótipo selvagem (WT). Plantas cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a $90 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa. Identificação dos picos de acordo com a Tabela 1. Cromatograma obtido pela $\text{Abs}_{345\text{nm}}$.

4.5.2 Perfil metabólico das folhas: Ésteres de ácido sinápico, flavonóis glicosídeos e efeito do NO

Nas folhas da planta selvagem cultivada no solo sob fotoperíodo, majoritariamente, foi identificado o sinapoil malato (SM), e pequenas quantidades de derivados de kaempferol. Isso está de acordo com a literatura. Besseau et al. (2007) também identificaram o SM como composto majoritário em folhas de *A. thaliana* selvagem ecotipo Col 0. Em contrapartida, no mutante *nia1 nia2* o nível de SM foi significativamente menor que na planta selvagem, e houve acúmulo de seu precursor sinapoil glicose (SG). Como pode ser visto na Figura 21A, no cultivo com baixo nitrato, enquanto as folhas da selvagem acumularam $1.540,9 \pm 89,2$ nmol.mg peso fresco⁻¹ de SM a mutante acumulou $297,0 \pm 70,0$ nmol.mg peso fresco⁻¹ e adicionalmente $290,6 \pm 33,8$ nmol.mg peso fresco⁻¹ de SG. Parece claro que as folhas da mutante apresentam um obstáculo à síntese de SM. A enzima que faz a conversão de sinapoil glicose em sinapoil malato, 1-O-sinapoilglicose:malato sinapoiltransferase (SMT), já está bem caracterizada (Strack, 1982; Lehfeltdt et al., 2000; Hause et al., 2002). Adicionalmente, essa enzima apresenta uma atividade hidrolítica menor que leva a produção de 1,2-di-O-sinapoil-β-glicose (DSG) e ácido sinápico (Stehle et al., 2008). Em concordância com este fato foi identificada uma pequena produção de DSG na folha da planta mutante, ao passo que na selvagem cultivada na terra apenas traços de SG e DSG foram identificados.

Especialmente na mutante a ocorrência desses compostos mostrou-se sensível à variação da concentração de nitrato no meio de cultura utilizado para irrigação das plantas. Quando a planta mutante foi cultivada com alto nitrato o nível de SG foi menor ($103,9 \pm 10,6$ nmol.mg peso fresco⁻¹) e o de SM foi maior ($660,1 \pm 62,4$ nmol.mg peso fresco⁻¹) em relação às plantas cultivadas com baixo nitrato. Apesar disso, os níveis de SM não foram recuperados quando comparados à selvagem.

O nível de flavonóis glicosídeos, principalmente k1 e k3 foi maior na mutante comparado com a selvagem (Figura 21B), o que sugere que a incapacidade de sintetizar SM leva ao acúmulo desses compostos. No entanto, cabe ressaltar que a

quantidade de flavonóides é proporcionalmente muito inferior aos ésteres de ácido sinápico produzidos.

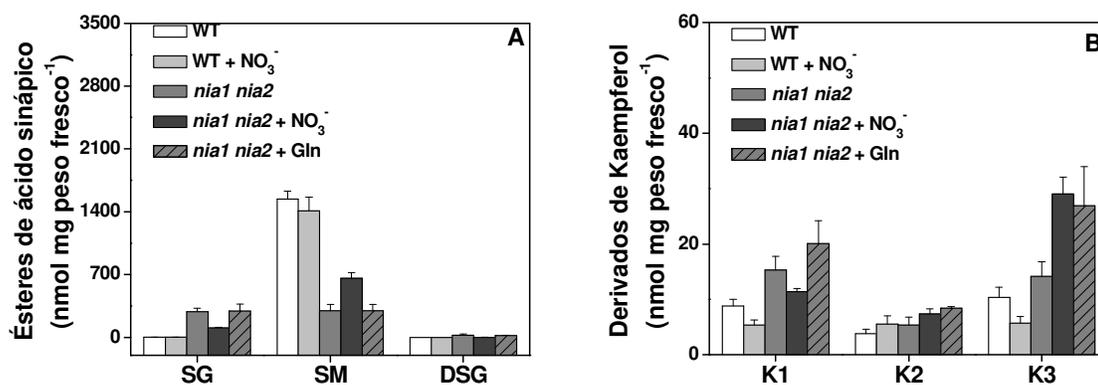


Figura 21: Fenilpropanóides acumulados em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). A: Ésteres derivados do ácido sinápico; B: Derivados glicosídeos de kaempferol. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Identificação dos compostos de acordo com a Tabela 1.

Considerando o papel da nitrato redutase na redução do nitrato para fornecimento de compostos nitrogenados, incluindo fenilalanina, o aminoácido precursor para a síntese dos fenilpropanóides (Dixon e Paiva, 1995), uma das possibilidades é que a deficiência na assimilação do nitrogênio poderia causar essa diferença no metabolismo secundário das folhas. Entretanto, o tratamento com glutamina, que recupera os níveis de aminoácidos nas folhas (Figuras 12 e 13) não afetou de maneira significativa a produção de fenilpropanóides na mutante, indicando que as diferenças observadas não podem ser atribuídas à deficiência na assimilação de nitrogênio.

Outra hipótese é que o NO possa ser um sinalizador importante para a síntese desses compostos secundários. Realmente, já foi demonstrado que o NO estimula a expressão da PAL e da CHS (Delledonne et al., 1998), enzimas iniciais da via de síntese dos fenilpropanóides. Corroborando com isso há o fato de que as folhas do mutante *nia1 nia2* apresentam menor emissão de NO que aquelas da planta selvagem (Figura 17) e quando cultivada com alto nitrato apresentaram aumento na emissão de NO e na síntese de sinapoil malato. A medida do nitrato endógeno (Figura 11) mostrou que uma sinalização do nitrato *per-se* é pouco provável, já que a selvagem cultivada com alto nitrato acumulou níveis semelhantes de nitrato à mutante cultivada com baixo nitrato. Sendo que, nessa condição ocorrem as maiores diferenças entre as plantas no que se refere à síntese de SM. Outra possibilidade é que a atividade prejudicada da SMT nas folhas da mutante *nia1 nia2* seja devido aos níveis de malato, um dos substratos da enzima. Strack et al. (1986) mostraram que atividade da SMT em cotilédones de rabanete é controlada pelo “pool” de malato e o acúmulo desse ácido orgânico é dependente do fornecimento de nitrato. Assim, a atividade da SMT dependente de nitrato poderia explicar a deficiência na conversão do SG em SM. Ainda, é conhecido que a produção de ácidos orgânicos é prejudicada em plantas com deficiência na NR (Scheible et al., 1997, 2000). Por isso, foi avaliado se o malato e/ou o NO poderiam ser fatores limitantes para a síntese de SM nas folhas do mutante *nia1 nia2*. As plantas foram cultivadas *in vitro* para que pudesse ser adicionado o malato ou os doadores de NO ao meio de cultura. Como mostrado na Figura 22 o perfil dos metabólitos na folha das plantas cultivadas *in vitro* foi semelhante ao das plantas cultivadas no solo. Entretanto, o SG e o DSG também foram identificados na selvagem,

mas o SM continuou como composto predominante (Figura 22A). O cultivo com alto nitrato aumentou os níveis de SM e diminuiu o SG, mas a variação na mutante foi menor que na planta selvagem. Na mutante cultivada com baixo nitrato o nível de SG foi de $372,3 \pm 128,2$ nmol.mg peso fresco⁻¹ e o de SM foi de $87,4 \pm 13,5$ nmol.mg peso fresco⁻¹. Na presença de 2,5 mM de malato não houve alteração significativa na concentração de SM. Porém, com 5 mM de malato houve aumento para $342,3 \pm 110,2$ nmol.mg peso fresco⁻¹ e a adição de NO potencializou esse efeito. Assim, nas plantas cultivadas com 5 mM de malato e 100 µM NOC5 o nível de SM nas folhas da mutante aumentou para $612,6 \pm 85,3$ nmol.mg peso fresco⁻¹ e nas plantas com 5 mM de malato e 200 µM NOC5 para $947,7 \pm 62,7$ nmol.mg peso fresco⁻¹. Esses resultados indicam que o NOC5 na presença do malato causou um aumento dose-dependente do SM, uma vez que foram atingidos níveis semelhantes ao da selvagem cultivada *in vitro* com alto nitrato ($921,2 \pm 88,9$ nmol.mg peso fresco⁻¹). O tratamento com NOC5 sem a presença do malato não causou alteração na mutante.

Com relação aos derivados de kaempferol (Figura 22B), nota-se que houve um aumento nas plantas tratadas com malato e/ou NOC5. O aumento na presença do NOC está de acordo com uma possível ação do NO em enzimas iniciais da via. Por outro lado, o aumento na presença do malato sugere que a impossibilidade de sintetizar SM leva a mutante a acumular flavonóis, como observado nas plantas cultivadas no solo (Figura 21B).

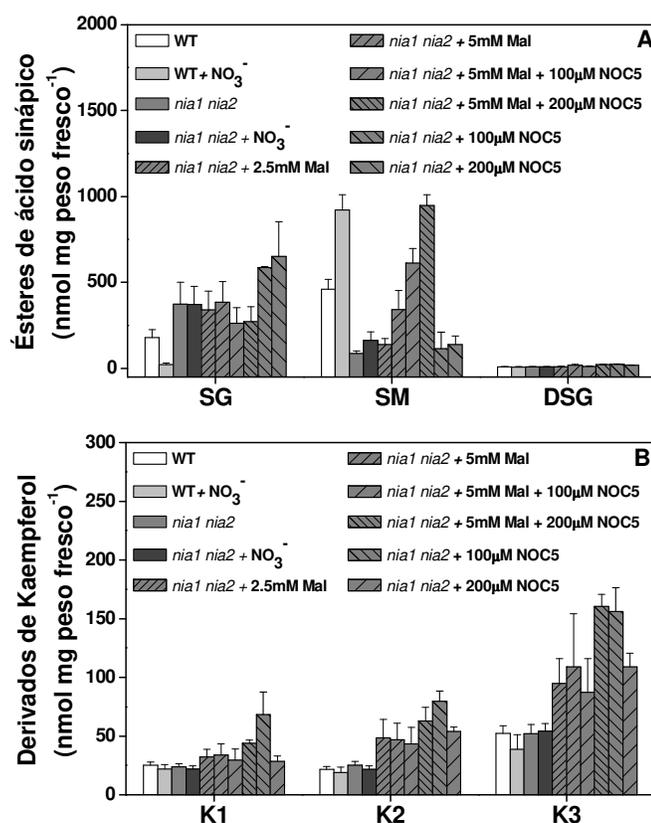


Figura 22: Fenilpropanóides acumulados em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas *in vitro* na presença de malato e doador de NO. As plantas foram cultivadas em meio de cultura sólido com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻). A planta mutante cultivada com baixo nitrato foi suplementada com malato (Mal), NOC5, ou ambos nas concentrações indicadas. A: Ésteres derivados do ácido sinápico; B: Derivados glicosídeos de kaempferol. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Identificação dos compostos de acordo com Tabela 1.

No intuito de obter um suporte adicional para esta proposição, outro protocolo foi desenvolvido no qual as folhas da planta mutante cultivadas no solo foram infiltradas com malato, NOC ou ambos e, após 24 h, os fenilpropanóides foram extraídos e analisados. As plantas controle foram infiltradas com o tampão e este tratamento não afetou a produção dos metabólitos. A Figura 23 mostra a média de pelo menos três experimentos nos quais a produção dos ésteres de ácido sinápico está representada em termos relativos ao conteúdo de SM na mutante. Nesse caso é possível observar uma tendência de aumento de SM na presença de malato e NOC. Os valores obtidos foram similares quando se usou o NOC18, que libera NO mais lentamente (meia-vida = 3.400 min) que o NOC5 (meia-vida = 93 min). Estes resultados mostram que o efeito estimulador do NO na conversão de SG em SM nas plantas adultas foi menos efetivo em relação aos obtidos nas plantas cultivadas *in vitro* na presença de NOC e malato (Figura 22), sugerindo que a baixa atividade da SMT é mais difícil de ser recuperada nas plantas adultas.

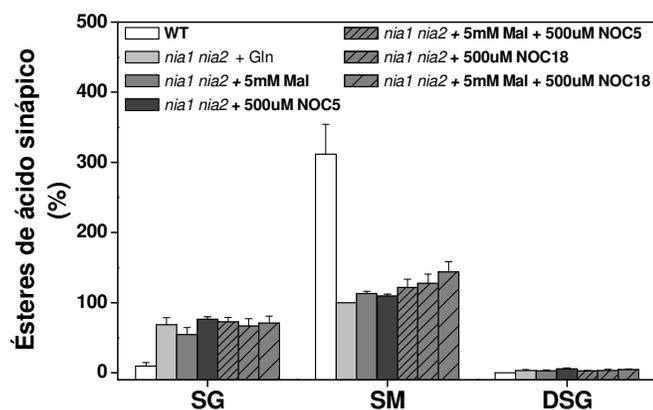


Figura 23: Efeito da infiltração de malato e NO no conteúdo dos ésteres de ácido sináptico em folhas de *Arabidopsis thaliana*. As plantas foram cultivadas no solo, a selvagem foi irrigada com alto (12,5 mM) e a mutante *nia1 nia2* com baixo (2,5mM) nitrato e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). As plantas mutantes foram infiltradas com malato, NOC ou ambos nas concentrações indicadas. As plantas controle foram infiltradas com tampão apenas. Os fenilpropanóides foram extraídos das folhas 24 horas após a infiltração, analisados e expressos em porcentagem relativa ao conteúdo de SM na planta deficiente. Identificação dos compostos de acordo com a Tabela 1.

4.5.3 Efeito do estresse de luz sobre o perfil metabólico das folhas: Acúmulo de antocianinas

Uma vez que o mutante *nia1 nia2* é deficiente no acúmulo de sinapoil malato e este é um composto de proteção contra raios UV (Landry et al., 1995), as plantas foram submetidas a um estresse luminoso para avaliar a produção de SM e flavonóis glicosídeos e induzir a síntese de antocianinas. Está bem estabelecido que a produção de flavonóides (Kubasek et al., 1992) e antocianinas (Steyn et al., 2002) é afetada pela luz. Além disso, Besseau et al. (2007) verificaram que plantas cultivadas com baixa luminosidade ($20 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$) acumularam maiores quantidades de sinapoil malato e flavonóis 54h após terem sido expostas ao estresse luminoso ($190 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$). Quando as plantas cultivadas no solo sob fotoperíodo de 12 horas a $90 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ foram transferidas e mantidas por 7 dias sob luz contínua a $120 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, nove diferentes antocianinas foram identificadas nas folhas. A identificação desses compostos foi baseada no espectro de absorção da luz UV e no padrão de fragmentação obtido por espectrometria de massas (Tabela 2) e foi consistente com dados da literatura (Bloor e Abrahams, 2002; Tohge et al., 2005).

Como pode ser visto na Figura 24, a antocianina A6 foi o composto mais abundante nas plantas, fato este que está de acordo com estudos prévios que mostraram ser esta a principal antocianina acumulada em *Arabidopsis* (Bloor e Abrahams, 2002; Tohge et al., 2005). O composto A6 é uma sinapoil cianidina e a enzima responsável por adicionar o sinapoil ao núcleo de cianidina é denominada sinapoil-glicose: antocianina aciltransferase (SAT), por utilizar como substrato para essa sinapoição o sinapoil glicose. Esta enzima está intimamente relacionada à SMT (Fraser et al., 2007). Isto revela uma conexão entre o metabolismo dos ésteres de ácido sinápico e das antocianinas. Na Figura 24 nota-se que a mutante não foi capaz de acumular antocianinas ao nível da selvagem e, ainda, as plantas cultivadas com baixo nitrato acumularam mais antocianinas que as plantas cultivadas com alto nitrato. Por outro lado, a selvagem acumulou maiores quantidades de antocianinas quando cultivada com alto nitrato. Essas variações observadas podem estar relacionadas à atividade da NR, já que esta foi influenciada pelo estresse luminoso. Enquanto na selvagem a luz

aumentou a atividade NR, na mutante o efeito foi oposto diminuindo a já residual atividade (Figura 10). Embora seja conhecido que a luz ativa a NR (Kaiser e Huber, 2001), pode ter havido um dano foto-oxidativo na mutante e as antocianinas são conhecidas por atenuar esses danos (Steyn et al., 2002). A Figura 25A mostra o efeito do estresse luminoso sobre a síntese do SM. A planta selvagem cultivada com alto nitrato produziu altos níveis de SM ($3.520,4 \pm 1.385,7$ nmol.mg peso fresco⁻¹) e passou a acumular SG ($376,8 \pm 70,6$ nmol.mg peso fresco⁻¹), que não havia sido identificado nas plantas no solo não estressadas (Figura 21). As plantas cultivadas com baixo nitrato não apresentaram aumento nos níveis de SM ($401,8 \pm 327,7$ nmol.mg peso fresco⁻¹) mas mostraram um amplo aumento de SG ($1691,4 \pm 199,7$ nmol.mg peso fresco⁻¹). Como a atividade da NR é modulada pela luz (Kaiser e Huber, 2001), provavelmente a baixa concentração de nitrato tornou-se limitante e a rota foi desviada para síntese de antocianinas, ao passo que, na planta cultivada com alto nitrato mesmo sendo sintetizadas antocianinas houve a possibilidade de aumentar o SM. Os níveis de SM na mutante foram similares aos das plantas não submetidas ao estresse luminoso ($296,4 \pm 113,8$ nmol.mg peso fresco⁻¹ na mutante com baixo nitrato e $894,6 \pm 133,6$ nmol.mg peso fresco⁻¹ na mutante com alto nitrato). Em contrapartida os níveis de SG foram maiores ($1.108,1 \pm 17,3$ nmol.mg peso fresco⁻¹ na mutante com baixo nitrato, $747,2 \pm 147,2$ nmol.mg peso fresco⁻¹ na mutante com alto nitrato).

Com relação aos derivados de kaempferol houve aumento de sua síntese passando da ordem de 10^2 (Figura 21B) nas plantas cultivadas sob fotoperíodo para 10^3 (Figura 25B) nas plantas mantidas sob luz contínua. O tratamento com glutamina não influenciou de maneira significativa esses resultados. O aumento da síntese de flavonóis glicosídeos e o acúmulo de SG, até mesmo na selvagem, é coerente com o desvio da rota de síntese para produção das antocianinas. É interessante notar que o mutante *nia1 nia2* foi capaz de acumular derivados de kaempferol no nível da selvagem, porém seus níveis de antocianinas foram menores que aqueles da selvagem. Uma vez que a adição de sinapoil às cianidinas envolve a ação de uma aciltransferase é possível que o *nia1 nia2* possua alguma deficiência nesse passo, assim como na reação envolvendo a SMT, que também é uma aciltransferase dependente de sinapoil glicose.

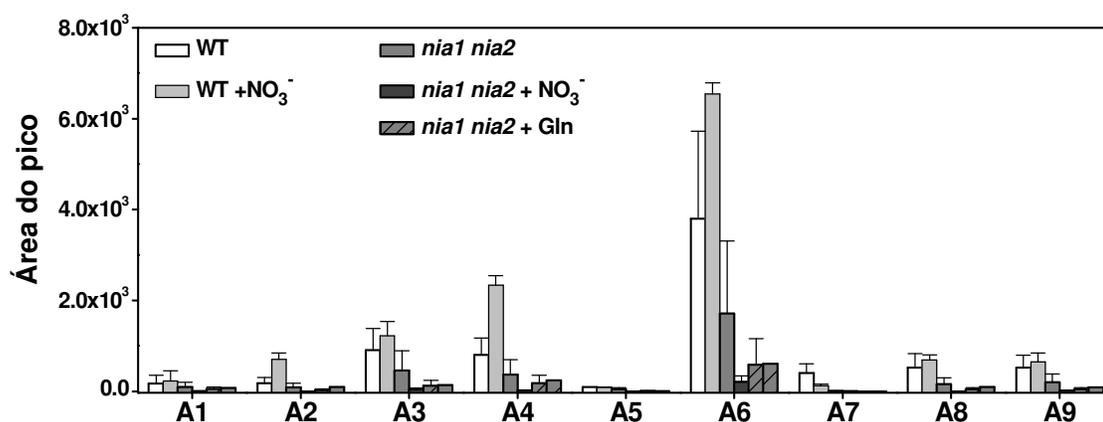


Figura 24: Antocianinas acumuladas em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) mantidas sob estresse luminoso. As plantas foram cultivadas no solo e irrigadas com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Identificação dos compostos de acordo com a Tabela 2.

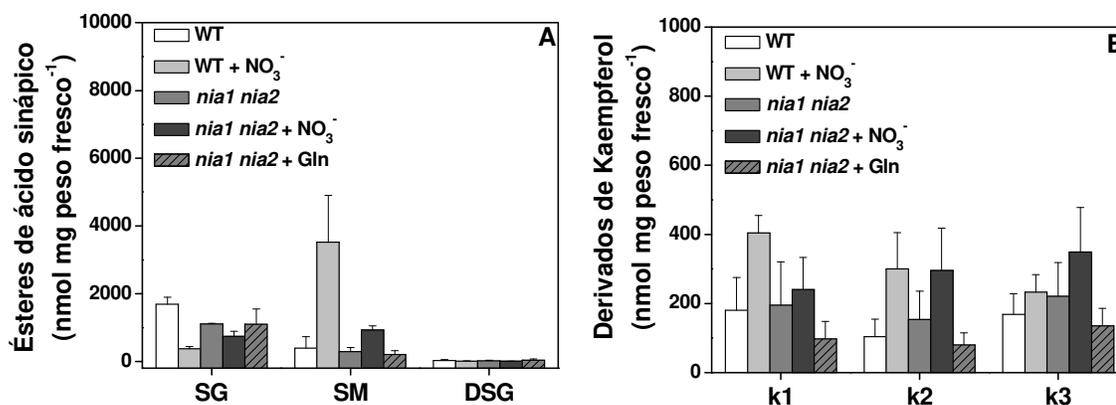


Figura 25: Fenilpropanóides acumulados em folhas *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) mantidas sob estresse luminoso. As plantas foram cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). A: Ésteres derivados do ácido sinápico; B: Derivados glicosídeos de kaempferol. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Identificação dos compostos de acordo com a Tabela 1.

4.5.4 Perfil metabólico dos Botões florais: Flavonóis glicosídeos

Nos botões florais foram identificados flavonóis glicosídeos derivados de kaempferol, quercetina e isoramnetina (Figura 26). Esses compostos são característicos das flores (Yonekura-Sakakibara et al., 2007, 2008; Bottcher et al., 2008; Matsuda et al., 2010). Não parece haver diferença significativa na ocorrência desses compostos entre as plantas selvagem e mutante, embora o tratamento com glutamina sugira uma discreta diminuição de alguns compostos. Estes resultados contrastam com aqueles observados nas folhas, que acumularam principalmente ésteres de ácido sinápico, embora em níveis reduzidos no mutante *nia1 nia2*, mesmo após o tratamento com Gln que elevou o conteúdo de aminoácidos ao nível da selvagem (Figura 21). Diferentemente, os botões florais apresentaram quantidades elevadas de flavonóides glicosilados e seus níveis não foram afetados pela deficiência na NR. Conforme mostrado na Figura 16, o conteúdo total de aminoácidos nos botões florais também não foi alterado no mutante *nia1 nia2*, enquanto nas folhas seus níveis foram bastante reduzidos (Figuras 12 e 13). Como a selvagem cultivada com alto nitrato apresentou níveis de metabólitos semelhantes à mutante com baixo nitrato, não foram analisadas a selvagem com baixo e a mutante com alto nitrato. Parece que a deficiência na NR não afeta a produção de metabólitos secundários em botões florais de *A. thaliana*.

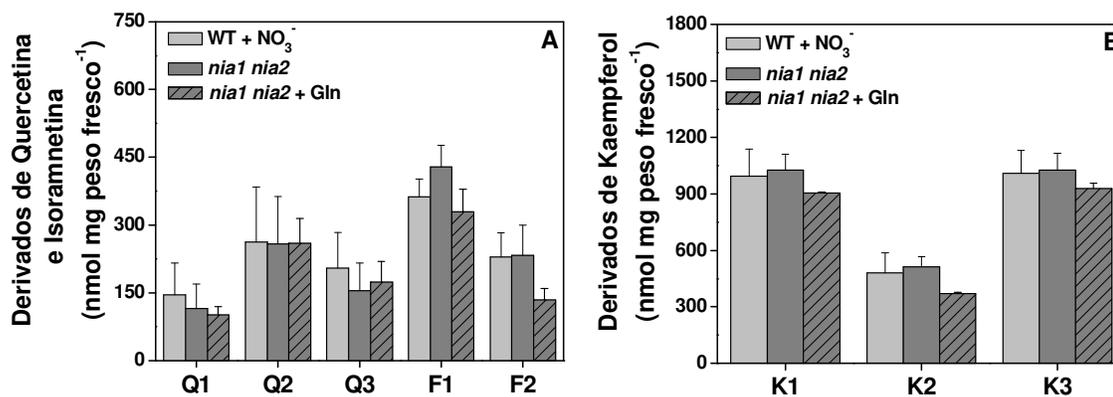


Figura 26: Flavonóis glicosídeos acumulados em botões florais de *Arabidopsis thaliana* selvagem (WT) com alto nitrato (12,5 mM; +NO₃⁻) e mutante *nia1 nia2* com baixo nitrato (2,5 mM) e na presença de 10 mM de glutamina (+Gln). Plantas cultivadas no solo. A: Derivados glicosídeos de Quercetina e Isoramnetina; B: Derivados glicosídeos de Kaempferol. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Identificação dos compostos de acordo com a Tabela 1.

4.6 Atividade da SMT

Em face da deficiência apresentada pela mutante na síntese de SM, foi avaliada a atividade da enzima SMT na folha da planta selvagem e no mutante *nia1 nia2*. Para tanto, extratos foliares brutos foram preparados e incubados na presença dos substratos sinapoil glicose e malato. Como pode ser observado na Figura 27 a mutante apresenta atividade significativamente menor (1.24 ± 0.13 pkat mg prot⁻¹) que a planta selvagem ($6,12 \pm 1,14$ pkat mg prot⁻¹) demonstrando que sua incapacidade de sintetizar SM pode ser devido a alguma falha na proteína que cause a baixa atividade. Para avaliar se o NO está envolvido nesse processo, a atividade da SMT foi avaliada na selvagem na presença de um agente sequestrante de NO (cPTIO) e do doador de NO (NOC5) na mutante. Na presença de cPTIO a atividade enzimática foi totalmente suprimida, enquanto que, houve apenas um ligeiro aumento na presença do NOC5 (2.23 ± 0.12 pkat mg prot⁻¹). Esses dados revelam que o NO é importante para a atividade da SMT, mas a prejudicada atividade da enzima na planta mutante, quando já adulta, é de difícil recuperação. Isso é coerente com o fato de que tratando a planta durante o cultivo com o NOC5 houve recuperação dos níveis de SM na mutante (Figura 22), ao passo que, nas folhas que foram infiltradas (Figura 23), houve apenas um pequeno aumento na síntese de SM.

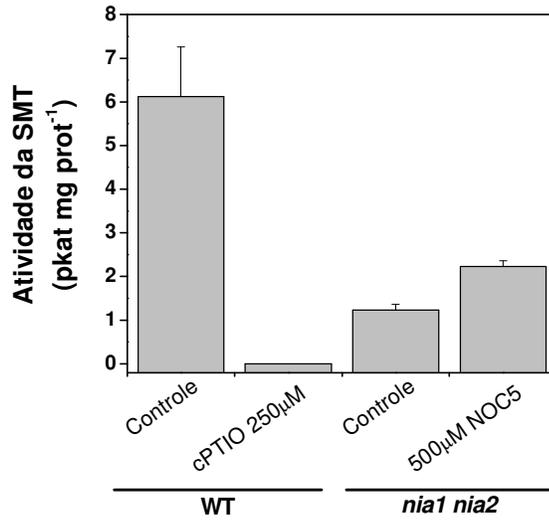


Figura 27: Atividade da enzima SMT em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* na presença dos substratos sinapoil glicose e malato catalisando a formação de sinapoil malato. Efeito de cPTIO e NOC5. Os dados representam a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.7 Análise da produção de ácidos orgânicos nas folhas

A relação entre o metabolismo de nitrogênio e oxigênio tem diferentes implicações para o desenvolvimento da planta. Se por um lado a assimilação de nitrogênio consome esqueletos de carbono e energia, a falta de carbono resulta em deficiência de nitrogênio. Além disso, o metabolismo de nitrogênio e carbono está associado em quase todas as vias bioquímicas da planta (Coruzzi e Zhou 2001, Stitt et al., 2002). A Figura 28 mostra o acúmulo de ácidos orgânicos nas plantas selvagem e mutante. Na Figura 28A percebe-se que a mutante quando cultivada com baixo nitrato apresentou menores níveis de succinato, fumarato, malato e citrato que a planta selvagem. Já os maiores níveis de lactato e piruvato foram obtidos justamente na mutante com baixo nitrato. Isso indica uma deficiência no ciclo de Krebs gerando um acúmulo de piruvato, que é justamente a molécula que inicia o ciclo pela condensação com o oxaloacetato e de lactato, que indica maior fermentação na mutante. Contudo, esses resultados foram atenuados na mutante cultivada com alto nitrato. Os níveis de piruvato e lactato diminuíram e os outros ácidos orgânicos aumentaram de maneira a se assemelham à selvagem com baixo nitrato. Porém, não houve elevação ao nível da selvagem com alto nitrato. De qualquer forma, existe uma clara relação entre o nitrato no meio de cultura e a síntese de ácidos orgânicos. A Figura 28B mostra especificamente o acúmulo de malato por esse ser substrato da SMT. Certamente a incapacidade da mutante em sintetizar SM é devido ao baixo acúmulo desse composto. Porém, quando a planta mutante foi cultivada com alto nitrato seus níveis de malato foram semelhantes à selvagem com baixo nitrato. No entanto, como mostrado na Figura 22A, embora a mutante cultivada com alto nitrato tenha apresentado um aumento na síntese de SM, este foi bem menor que o nível da selvagem com baixo nitrato, mesmo tendo níveis de malato parecidos. Esse é um forte indício de que não apenas o malato é importante para a síntese de SM. Assim, o malato como substrato para a SMT é indispensável, mas o NO desempenharia um papel sinalizador. É também importante lembrar que o cultivo da mutante com alto nitrato também causou um aumento na emissão de NO, mas não ao nível da selvagem com baixo nitrato (Figura 17). Por isso a combinação

malato e NO utilizada *in vitro* mostrou-se a mais eficiente na elevação dos níveis de SM (Figura 22).

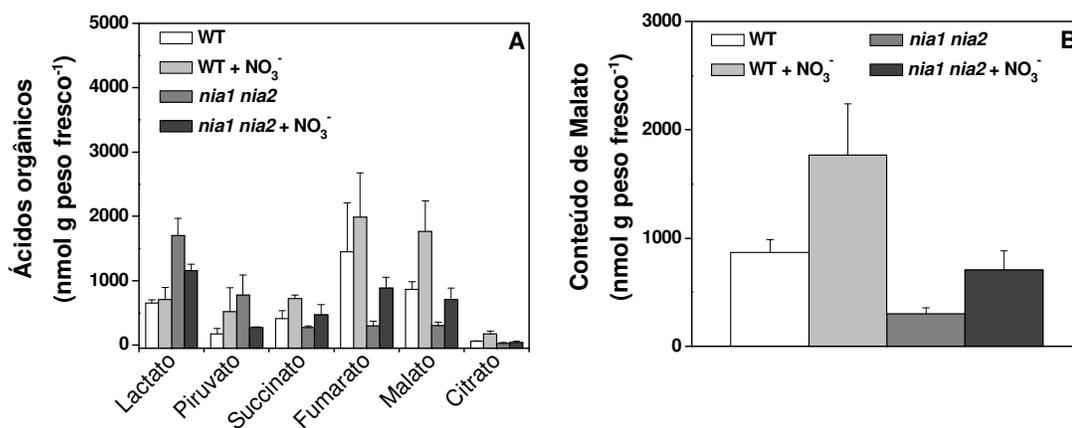


Figura 28: Ácidos orgânicos acumulados em folhas de *A. thaliana* selvagem (WT) e mutante (*nia1 nia2*) cultivadas no solo com baixo (2,5 mM) ou alto (12,5 mM) nitrato (+NO₃⁻). A: Lactato e intermediários do ciclo de Krebs, B: Malato. Os dados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

5 DISCUSSÃO GERAL

5.1 Efeito da mutação na NR sobre o metabolismo de fenilpropanóides nas folhas: NO e aciltransferases

A grande diversidade de compostos secundários nas plantas é resultado da formação de muitos subprodutos em cascatas de reações iniciadas a partir de diferentes metabólitos primários entre os quais destacam-se os aminoácidos aromáticos (Aharoni e Galili, 2010). A produção de metabólitos secundários é muito responsiva a estresses ambientais. Nesse contexto, a via dos fenilpropanóides tem sido muito estudada e o NO foi identificado como um ativador da síntese desses compostos, ativando a transcrição de genes iniciais da via (Delledonne et al., 1998). Muitos trabalhos têm mostrado a diversidade de compostos produzidos por *A. thaliana* (Graham, 1998; Veit e Pauli, 1999; Bloor e Abrahams, 2002; Kerhoas et al., 2006; Matsuda et al., 2010), especialmente fenilpropanóides. Entretanto, não existem relatos acerca da influência da NR, bem como a respeito da sinalização do NO nos produtos finais da via. Assim, esse trabalho analisou o papel sinalizador do NO sobre a síntese de fenilpropanóides em *Arabidopsis thaliana* que é um modelo extremamente popular para estudo de muitos aspectos da biologia vegetal incluindo o metabolismo secundário (D'Auria e Gershenzon, 2005).

A NR, além de ser uma enzima chave na assimilação do nitrogênio, tem apresentado crescente relevância na produção de NO em plantas. Sua atividade redutora produz o nitrito que é considerado o principal substrato para a síntese de NO em plantas e, ainda, a própria NR pode reduzir o nitrito a NO (Yamasaki e Sakihama, 2000; Rockel et al., 2002; Modolo et al., 2005). Por isso, neste trabalho foi utilizado o mutante *nia1 nia2* que apresenta atividade residual para a NR para investigar os efeitos do NO sobre o metabolismo de fenilpropanóides em *Arabidopsis thaliana*. Esta proteína é um homodímero onde cada monômero está associado a três grupos prostéticos: uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD), um grupamento heme e um complexo constituído entre molibdênio e pterina. A NR está solúvel no citosol e catalisa a transferência de dois elétrons do NAD(P)H para o nitrato (+5) que é reduzido a nitrito (+3). Este é

posteriormente reduzido a amônia (-3) nos plastídios (Campbell, 1999). Esta é a ação primária da NR e está amplamente compreendida. A atividade redutora que produz NO seria, nesse sentido, secundária, mas que não pode ser desconsiderada levando-se em conta o papel sinalizador do NO nos vegetais (Meyer et al., 2005). Mesmo assim, não é trivial que uma enzima que tem forte preferência por nitrato possa produzir um sinalizador a partir do nitrito que está presente nas células em baixos níveis. Uma boa relação fisiológica entre a NR e o NO foi obtida por Desikan et al. (2002): na presença de nitrito houve aumento da emissão de NO na epiderme de folhas de *Arabidopsis* seguida do fechamento dos estômatos. Em contrapartida, o L-NAME (inibidor da NOS) pareceu não afetar o movimento estomático. No mutante *nia1 nia2*, nem o ABA nem o nitrito causaram aumento da síntese de NO e fechamento estomático. Posteriormente, os mesmos autores demonstraram que o tungstato (inativador da NR) eliminou a produção de NO dependente de nitrito (Desikan et al. 2004).

As plantas possuem diferentes mecanismos de regulação da NR em resposta a estímulos ambientais e químicos (Campbell, 1999; Kaiser et al., 1999). Dentre os diversos fatores moduladores da NR dois são de especial interesse desse trabalho, o nitrato e a luz. O mutante espontâneo *nia1 nia2* descrito por Wilkinson e Crawford (1993), apresenta o gene *Nia2* deletado e carrega uma mutação pontual no gene *Nia1*. Isso permite uma atividade residual da NR que ficou claramente evidenciada neste trabalho (Figura 9). Mesmo na mutante, a NR mostrou-se sensível à concentração de nitrato no meio. Corroborando com esse fato, Kaiser e Huber (2001) demonstraram que a atividade da NR é rapidamente suprimida na ausência de nitrato e é recuperada quando este é novamente fornecido. Da mesma forma a atividade da NR foi afetada pela luz contínua, no entanto, nesse caso a mutante não foi capaz de responder a esse estímulo (Figura 10). A ativação da NR pela luz está diretamente relacionada à fotossíntese, uma vez que na ausência de CO₂ a NR se torna inativa, mas pode ser ativada pela presença de açúcar. Isso revela uma necessidade de coordenar a assimilação de carbono e nitrogênio (Lilo, 2008; Kaiser e Huber, 2001). Contudo, não está esclarecido quais componentes estão envolvidos quando um sinal é transferido do cloroplasto, onde a fotossíntese ocorre, para o citosol onde está a NR.

No que se refere ao uso de mutantes para NR em estudos relacionados ao NO é preciso considerar outras questões que podem afetar o desenvolvimento da planta. A nutrição nitrogenada nesses mutantes está consideravelmente alterada. Quando plantas são cultivadas com nitrato e amônia, certamente um mutante para NR terá problemas para metabolizar o nitrato. Com isso, essas plantas terão seu desenvolvimento baseado na amônia, o que é bastante diferente de plantas que metabolizam o nitrato (Wilkinson e Crawford, 1993; Bloom et al., 2002). Além disso, mutantes para a NR acumulam nitrato em altos níveis (Unkles et al., 2004). Esse acúmulo de nitrato ficou claro neste trabalho nas folhas do mutante *nia1 nia2*, como visto na Figura 11. Por isso, foi importante cultivar as plantas em duas concentrações de nitrato no meio de cultura. Como comentado acima, a mutante cultivada com baixo nitrato apresentou níveis endógenos de nitrato semelhantes à selvagem cultivada com alto nitrato. Isso foi importante para eliminar o efeito sinalizador do próprio nitrato, já que nessa condição são observadas as maiores diferenças entre as duas plantas no que se refere ao metabolismo secundário (Figura 21). Porém, a concentração de nitrato considerada baixa neste trabalho não foi extrema, o que permitiu que a planta selvagem cultivada com baixo nitrato apresentasse níveis de aminoácidos nas folhas parecidos com a selvagem cultivada com alto nitrato (Figura 13). Essa pequena variação nos níveis de aminoácidos está de acordo com a variação discreta na atividade da NR entre as plantas com alto e baixo nitrato (Figura 9B). Da mesma forma, a pequena variação na atividade NR da planta mutante não se relacionou de maneira drástica com o conteúdo de aminoácidos nas folhas (Figura 13). Peng et al. (2008) cultivaram plantas de *Arabidopsis* em diferentes condições de nutrientes no meio de cultura e consideraram que 3 mM de nitrato foi uma concentração limitante, inclusive levando ao acúmulo de antocianinas na planta selvagem como forma de se adaptar a esse estresse. Porém esses autores cultivaram as plantas em fotoperíodo de dia longo (16/8) com luminosidade a $150 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Como será comentado adiante, quando expostas à luz contínua as plantas passaram a acumular antocianinas, mas quando cultivadas sob fotoperíodo de 12 horas a $90 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ não houve acúmulo desses compostos. Em trabalho ainda mais recente Ikram et al. (2011), estudando as respostas de *Arabidopsis* à variação de nitrogênio, consideraram 4 mM como

fornecimento normal de nitrato. Com isso, pode-se considerar que em nossa condição de cultivo, mesmo com baixo nitrato, a planta selvagem tinha condições adequadas de desenvolvimento. Com relação à mutante, Wilkinson e Crawford (1993) já haviam demonstrado seu baixo crescimento quando somente o nitrato é fornecido como fonte de nitrogênio. Diante disso, foi ainda utilizado o cultivo da mutante *nia1 nia2* com glutamina como estabelecido por Oliveira et al. (2009). Esses autores demonstraram que cultivando a mutante com glutamina, esta passou a apresentar um fenótipo semelhante à selvagem e teve seus níveis de aminoácidos nas folhas totalmente recuperados, resultado esse confirmado nesse trabalho (Figura 13). Com isso, foram obtidas condições que minimizaram as diferenças oriundas do acúmulo e assimilação diferenciais do nitrato entre as plantas selvagem e mutante.

A variação na atividade NR, embora não tenha tido substancial efeito sobre o nível de aminoácidos nas folhas causou variação na emissão de NO. Modolo et al. (2005) e Oliveira et al. (2009) demonstraram que a deficiência na NR causa menor produção de NO nas folhas da mutante *nia1 nia2* e nossos resultados indicam que modulando a atividade dessa enzima *in vivo* é possível verificar alteração na produção desse radical e a glutamina não interfere nesses resultados (Figura 17).

No que se refere à síntese de fenilpropanóides tem-se que, em condições normais de cultivo (Figura 21), folhas da planta selvagem acumularam sinapoil malato (SM), que é o produto final da via dos fenilpropanóides em *Arabidopsis thaliana*, e pequenas quantidades de derivados glicosídeos de kaempferol. Contrariamente, a mutante *nia1 nia2* apresentou baixos níveis de SM e acumulou seu precursor sinapoil glicose (SG). Ainda, a mutante apresentou níveis discretamente superiores dos derivados glicosídeos de kaempferol. Mesmo assim os níveis de metabólitos foram menores na mutante, já que a selvagem acumulou grande quantidade de SM. Como a rota de biossíntese desses compostos apresenta uma ramificação que pode levar ao acúmulo de flavonóides ou ésteres de ácido sinápico (Figura 6), parece claro que a mutante tem um impedimento na síntese de SM, o que leva ao acúmulo de seu precursor e também de flavonóides. Esses resultados indicaram que a enzima responsável pela conversão do sinapoil glicose em sinapoil malato, a 1-O-sinapoil glicose:malato sinapoiltransferase (SMT), tem sua atividade prejudicada na mutante *nia1 nia2*.

A deficiência na NR diminui a incorporação de nitrogênio em aminoácidos e pode afetar a produção de metabólitos secundários, tanto por afetar a síntese de precursores para esses compostos, quanto por interferir nos níveis de nitrato que pode agir como um sinal (Fritz et al., 2006; Rubin et al., 2009). Entretanto, nas plantas mutantes tratadas com glutamina, os níveis de aminoácidos foram recuperados. Mesmo assim, elas permaneceram incapazes de converter o SG em SM. Diferentemente, o tratamento com nitrato, que aumentou a atividade da NR (Figura 9) e a produção de NO (Figura 17) nas folhas da mutante, foi capaz de aumentar os níveis de SM e diminuir os de SG (Figura 21), mesmo não tendo recuperado os níveis de aminoácidos (Figura 13). Isso sugere que a SMT pode ser influenciada pelo NO. Como comentado acima o conteúdo endógeno de nitrato nas folhas mostrou que uma sinalização do nitrato *per se* é pouco provável, já que as maiores diferenças na síntese de SM ocorreram entre a planta selvagem cultivada com alto nitrato e a mutante cultivada com baixo nitrato e estas apresentaram níveis endógenos de nitrato semelhantes (Figura 11).

A elevação dos níveis de aminoácidos não altera a produção de NO, mas a modulação da atividade da NR sim. Uma vez que a produção de NO a partir de nitrito é competitivamente inibida por nitrato (Crawford, 2006a) as taxas de emissão são normalmente baixas em folhas inteiras. Para a NR de milho, o K_m para o nitrito é 100 μM e o nitrato é um inibidor competitivo com K_i de 50 μM . Contudo, em situações onde a NR produz excesso de nitrito (sob condições de saturação de substrato) a emissão de NO pode atingir altos níveis (Rockel et al., 2002). Isso explicaria o aumento da emissão de NO na planta selvagem em resposta ao nitrato (Figura 17).

Outro impedimento para atividade da SMT nas folhas da mutante pode resultar de níveis reduzidos de malato. Como co-substrato necessário para a conversão de SG em SM, é bem conhecido que o metabolismo de malato afeta fortemente a atividade da SMT (Strack et al., 1986). Assim, o malato estimulou a conversão do SG em SM quando foi adicionado ao meio de cultura das plantas cultivadas *in vitro* (Figura 22) e, também, quando foi infiltrado nas folhas das plantas cultivadas no solo (Figura 23). Por isso, não se pode descartar que baixos níveis de malato nas folhas da mutante *nia1 nia2* podem ser responsáveis, pelo menos em parte, pelo acúmulo deficiente dos ésteres de ácido sinápico. Isso ajuda a explicar porque somente o NO não foi capaz de

recuperar os níveis de SM. Porém, o NO parece agir sinergisticamente com o malato para estimular a conversão do SG em SM na planta mutante (Figuras 22 e 23). Esses resultados sugerem que a atividade da SMT é também regulada pelo NO, além do malato.

Corroborando com esses dados, foi observado que os níveis de ácidos orgânicos estão diminuídos na mutante cultivada com baixo nitrato (Figura 28). É bem conhecido que baixos níveis de malato estão relacionados com a assimilação deficiente de nitrogênio (Tschoep et al., 2009). Mas, quando cultivada com alto nitrato a planta mutante apresentou níveis de malato semelhantes à selvagem com baixo nitrato (Figura 28). Citrato, fumarato e succinato variaram da mesma forma que o malato. Trabalhando com mutantes para o gene *NIA* em tabaco Scheible, et al. (1997) verificaram que o nível de ácidos orgânicos é sensível à variação na disponibilidade de nitrato. Esses autores observaram níveis de ácidos orgânicos maiores na planta mutante cultivada com 12 mM de nitrato do que na selvagem cultivada com 0,2 mM, evidenciando todo o efeito da limitação de nitrogênio. O fato de neste trabalho a mutante cultivada com alto nitrato ter acumulado níveis de ácidos orgânicos parecidos com a selvagem com baixo nitrato é mais um indicativo de que a concentração de nitrato considerada baixa não foi extrema. Isso também confirma que a falta de malato é, de fato, um fator limitante para a mutante na conversão do SG em SM. Mas, como comentado nos resultados, a mutante cultivada com alto nitrato, embora tenha apresentado um aumento na síntese de SM, não chegou ao nível da selvagem com baixo nitrato, mesmo tendo níveis de malato parecidos. Outra confirmação importante, embora não mostrada neste trabalho, foi que a expressão da SMT não está prejudicada na mutante, ao contrário, foi ligeiramente maior que na selvagem. Isso evidencia uma possível tentativa de compensação na expressão gênica em virtude da baixa atividade da enzima transcrita. Realmente, ensaios com extratos foliares realizados na presença de SG e malato mostraram que a atividade SMT no mutante *nia1 nia2* está bastante prejudicada e que o NO estimulou a conversão de SG em SM, mas este estímulo foi muito tênue (Figura 27). Porém, o agente sequestrante de NO, cPTIO, foi efetivo na inibição da atividade enzimática da selvagem. É possível que a SMT apresente alterações estruturais e/ou conformacionais difíceis de serem corrigidas após a proteína ter sido sintetizada com essa alteração na

mutante. Por isso, a adição de NO e malato ao meio de cultura ao longo de todo o desenvolvimento da planta foi o mais eficiente (Figura 22), enquanto o tratamento agudo por meio da infiltração apresentou resultado mais discreto (Figura 23).

Strack et al (1986) propôs que, em face de sua localização vacuolar (Sharma e Strack, 1985), a SMT deve possuir um sofisticado mecanismo de controle de sua atividade. Embora estes autores tenham mostrado que a atividade da SMT é ativada por malato, ficou aberta a possibilidade de que outro sinal pudesse contribuir para a atividade da enzima. Diante de nossos resultados é cabível supor que o NO possa ser o sinal adicional proposto por Strack et al. (1986).

A SMT é uma SCPL (Serina carbóxi peptidase-“like”) e foi assim classificada unicamente com base em sua sequência de aminoácidos, que é similar a outras SCPs conhecidas. Mas, apesar dessa similaridade, as SCPLs sofreram uma diversificação em sua função (Fraser et al., 2007). Foi proposto que, em alguns grupos de SCPLs tenha havido uma modificação da atividade de carbóxi peptidase para aciltransferase, como no caso das sinapoiltransferases dependentes de sinapoil glicose. Curiosamente, a planta mutante foi também deficiente na síntese de antocianinas sinapoiladas quando submetida ao estresse de luz (Figura 24). A enzima SAT (sinapoil antocianina transferase), que catalisa esta reação, é intimamente relacionada à SMT e está localizada no mesmo cluster gênico (Stehle et al., 2009). Isto sugere que não apenas a SMT, mas outros membros da classe das aciltransferases dependentes de sinapoil glicose possam ter sua atividade prejudicada pela deficiência na NR. A presença de altos níveis de flavonóides na mutante submetida ao estresse luminoso (Figura 25A) mostra que não houve problema na ativação desse ramo da via, indicando que a deficiência poderia ser em outro ponto, mais especificamente, na adição do núcleo sinapoil, já que em *Arabidopsis* é comum a presença de antocianinas sinapoiladas, como identificado neste trabalho (Tabela 2). Embora nossos resultados indiquem que o NO possa ser o fator limitante para a atividade dessas aciltransferases, não se pode descartar a possibilidade de que outro sinal, cuja produção tenha sido afetada pela deficiência na NR, possa também interferir na atividade dessas proteínas.

Por serem SCPLs, Stehle et al. (2006) usaram as SCPs como modelos para determinar a estrutura da SMT e da SCT e também mutagênese sítio-dirigida na SMT.

Os modelos de estrutura da AtSMT e outras aciltransferases sugeriram a formação de três pontes de sulfeto (denominadas S1, S2 e S3) e, pelo menos uma destas, é altamente conservada nessa classe de proteínas. Ainda, a análise da estrutura primária da SMT mostrou vários outros resíduos de cisteína (Fraser et al., 2005). Esses resíduos de cisteína presentes na estrutura primária da SMT e as evidências desse estudo apontando que essa enzima possa ter sua atividade regulada pelo NO levantam a possibilidade de que esse controle possa ser realizado por S-nitrosilação. Contrariamente à nitração de tirosina, que consiste em uma modificação permanente na proteína (Radi, 2004) e é considerada como um marcador de estresse nitrosativo (Valderrama et al., 2007), a adição de NO a um grupamento sulfidril da proteína é um processo reversível e associado à sinalização celular (Corpas et al., 2008). Tem sido sugerido também que a S-nitrosoglutathione (GSNO) atue como um carregador de NO nas células e atue como um agente efetivo para transferência de NO para outros grupos tióis, inclusive de proteínas, num processo conhecido como transnitrosilação (Marino e Gladyshev, 2010). A identificação de proteínas de plantas moduladas por S-nitrosilação é recente. Análises proteômicas revelaram várias proteínas que são S-nitrosiladas durante a HR (Romero-Puertas et al., 2007). Adicionalmente, a NPR1 e a TGA1 são S-nitrosiladas por GSNO e na presença deste a ligação do TGA1 ao DNA é consideravelmente fortalecida (Lindermayr et al., 2010). Outras enzimas de plantas também têm sido associadas a S-nitrosilação (Lindermayr e Durner, 2009). Evidentemente, análises posteriores são necessárias para determinar, de fato, se a SMT e outras aciltransferases dependentes de sinapoil glicose, como a SAT, são reguladas por S-nitrosilação e para isso será importante verificar se elas possuem resíduos de cisteína sensíveis a variação redox. Contudo, fica clara a relação entre a deficiência na NR e a ação dessas aciltransferases em *Arabidopsis thaliana*. É preciso considerar também que a deficiência na NR desestabiliza o metabolismo da planta de diferentes maneiras e a alteração da homeostase de NO é apenas uma dessas alterações. No caso da SMT, ficou evidente que a síntese prejudicada de malato causada pela deficiência na NR afetou a síntese de SM além do NO. Mas no caso da SAT, selvagem e mutante apresentaram níveis parecidos dos precursores das antocianinas, quais sejam, de um lado flavonóides e do outro sinapoil glicose. Isso

mostra que outro fator seria o causador da diferença entre a selvagem e a mutante. Esse fator poderia ser o NO. Esses resultados abrem uma perspectiva interessante, porque existe uma clara relação na literatura entre metabolismo de nitrogênio e acúmulo de antocianinas (Peng et al., 2007 e 2008), mas não há relatos sobre qualquer ação do NO. Não se pode esquecer, porém, que por estarem relacionadas à adaptação contra estresses, as antocianinas estão associadas a muitos fatores. De qualquer forma essas aciltransferases são um alvo em potencial do NO.

5.2 Efeito da deficiência na NR sobre o metabolismo de aminoácidos nos diferentes órgãos e acúmulo de flavonóides no botão floral: Relações de fonte e dreno

Qualitativamente o nitrogênio é o nutriente mais importante para a planta, uma vez que ele é essencial para a síntese de compostos como a clorofila, ácidos nucleicos e aminoácidos. Por isso, o uso eficiente do nitrogênio depende de seu transporte para o interior da célula e de sua assimilação e translocação no interior da planta (Krouk et al., 2010). As plantas obtêm nitrogênio não somente na forma de nitrato e amônia, mas também na forma orgânica (aminoácidos, peptídeos e proteínas) a partir do solo (Näsholm et al., 2009). Como comentado acima, Modolo et al. (2006) e Oliveira et al. (2009) demonstraram que a deficiência na NR leva a um menor acúmulo de aminoácidos nas folhas da mutante *nia1 nia2* em relação à selvagem e que isso pode ser corrigido pela adição de glutamina ao meio de cultura. Nesse trabalho, adicionalmente foi avaliado o efeito da deficiência na NR no acúmulo de aminoácidos também em raízes e em botões florais de *Arabidopsis thaliana*.

A assimilação de nitrogênio acontece nas folhas e nas raízes e a amônia produzida por esse e outros processos como a fotorespiração é, então, incorporada em glutamina e glutamato pelas enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase) (Weber e Flügge, 2002). A absorção do nitrogênio inorgânico ou orgânico a partir do solo e o transporte desses compostos nitrogenados a partir dos chamados órgãos fonte (raízes e folhas) para os drenos

(folhas em desenvolvimento, flores e sementes) estão integrados à fisiologia da planta e são essenciais para o seu desenvolvimento (Rentsch et al., 2007).

A comparação da atividade NR nos diferentes órgãos da planta selvagem (Figura 9A) mostrou que a maior atividade foi observada na raiz, seguida das folhas e botões florais. Esses dados são coerentes porque raízes e folhas têm maior responsabilidade na assimilação do nitrogênio e é natural que possuam maior atividade NR que os botões florais. Já a planta mutante, conforme esperado, apresentou apenas atividade residual nos três órgãos. Por apresentar essa deficiência na NR era de se esperar, também, que a planta mutante apresentasse conteúdo reduzido de aminoácidos nas raízes e botões florais da mesma forma que nas folhas. Entretanto, essa correlação não foi tão direta. Wilkinson e Crawford (1993), quando da caracterização do mutante *nia1 nia2* usado nesse trabalho estabeleceram uma condição de cultivo utilizando concentrações reduzidas de nitrato no meio de cultura, justamente pela limitação da mutante em metabolizar esse nutriente. Com isso, naturalmente a planta torna-se mais dependente da amônia no meio de cultura. Entretanto, altas concentrações desse elemento podem ser tóxicas (Lothier et al., 2011). Assim, a assimilação deficiente do nitrogênio inorgânico em esqueletos de carbono causa muitos efeitos sobre as plantas, tais como diminuição de componentes estruturais da fotossíntese, como a clorofila e a ribulose bifosfato carboxilase (rubisco) (Lam et al., 1996).

A Figura 12 mostra os níveis de aminoácidos individuais nas folhas das plantas selvagem e mutante cultivadas no solo e *in vitro* com alto e baixo nitrato e na presença de glutamina. Conforme esperado os níveis de todos os aminoácidos foi menor na planta mutante e a glutamina foi eficiente em recuperá-los (Figura 13). Surpreendentemente, o cultivo com alto e baixo nitrato não afetou a síntese de aminoácidos nas plantas mutantes cultivadas no solo mesmo que a atividade NR tenha sido afetada. Já nas plantas mutantes cultivadas *in vitro* nota-se que o nível de aminoácidos foi bem maior que nas plantas cultivadas no solo e que a concentração de nitrato no meio interferiu nesses valores, embora não tenha havido elevação ao nível da selvagem com alto nitrato. É coerente que a glutamina tenha recuperado os níveis de aminoácidos nas folhas, já que tem sido demonstrado que uma grande variedade de plantas crescendo em condições naturais obtém aminoácidos do solo (Chapin et al.,

1993; Kielland, 1994; Raab et al., 1996, 1999; Schmidt e Stewart, 1999). Um grande número de proteínas, muitas ainda não identificadas, pode permear o transporte de aminoácidos nas plantas (Rentsch et al., 2007). No genoma de *Arabidopsis thaliana* foram identificados pelo menos 53 genes para transportadores de aminoácidos (Wipf et al., 2002; Lalonde et al., 2004). A absorção de aminoácidos pelas raízes pode acontecer tanto por transporte ativo quanto passivo (Bush, 1993; Delrot et al., 2001).

O fato das plantas cultivadas *in vitro* apresentarem níveis mais altos de aminoácidos e terem sido susceptíveis à variação de nitrato no meio de cultura pode estar relacionado à transição do estadió vegetativo para o reprodutivo. A análise dos aminoácidos foi feita em plantas com 4 a 5 semanas. Em nossas condições de cultivo, as plantas nessa idade cultivadas no solo estão justamente na fase de transição para o estadió reprodutivo ou já fizeram essa transição como demonstrado por Seligman et al. (2008). Contrariamente, as plantas cultivadas *in vitro* não apresentam um desenvolvimento floral tão consistente quanto as plantas cultivadas no solo. Tem sido demonstrado que a indução do florescimento é disparada por diferentes estímulos oriundos das folhas (Zeevaart, 2008). A natureza desses estímulos é complexa, mas muitas observações indicam que o transporte de aminoácidos das folhas para o meristema apical mediado pelo floema está incluído nesse processo, juntamente com outros fatores, tais como hormônios (Corbesier et al., 2002). Isso foi demonstrado em *Arabidopsis thaliana* e *Sinapis alba* (Corbesier et al., 2001).

Dessa forma, há que considerar uma mobilização de nutrientes na direção das estruturas reprodutivas. Assim, nos botões florais houve grande acúmulo de aminoácidos (Figura 16). Curiosamente, nota-se que não houve diferença entre selvagem e mutante. Em *Arabidopsis* as estruturas reprodutivas são consideradas drenos fracos se comparadas a outras plantas (Soudry et al., 2005). No entanto, há que se considerar que ocorre uma remobilização de nutrientes. Essa remobilização pode explicar a ausência de diferença no nível de aminoácidos entre os botões da planta selvagem com aqueles da planta mutante. A folha atuaria, nesse sentido, como fonte de nutrientes, sendo o nitrogênio essencial e remobilizado principalmente na forma de aminoácidos. A NR no botão, não seria, nesse aspecto, crucial, uma vez que os aminoácidos seriam em grande parte exportados das folhas e não sintetizados. De

acordo com Diaz et al. (2008) 36 a 40 % do nitrogênio exportado para o eixo floral e os órgãos reprodutivos se deu a partir das folhas em roseta, enquanto a raiz foi responsável por 1,5% do nitrogênio exportado. A relação entre fornecimento de nitrogênio e transição para a fase reprodutiva está bem estabelecida. O florescimento é freqüentemente retardado pelo fornecimento de nitrogênio enquanto baixos níveis desse nutriente têm efeito inverso (Dickens e van Staden 1988, Bernier et al. 1993). Castro Marín et al. (2011) demonstraram que o cultivo com baixo nitrato torna o florescimento em *Arabidopsis thaliana* precoce. Ainda, a elevação dos níveis de aminoácidos com glutamina não interfere nesse processo. Estes autores discutem que o florescimento precoce é uma estratégia para garantir o sucesso reprodutivo em condições nutricionais adversas. Funcionalmente, isso estaria associado à senescência foliar para remobilizar os nutrientes dos tecidos vegetativos para os reprodutivos. Para esses autores, a glutamina, que promoveu um restabelecimento dos níveis de aminoácidos e um adequado crescimento, não modificou a época do florescimento porque o sinal relacionado ao nitrato atuaria em nível “upstream” à própria glutamina. Esses resultados estão totalmente de acordo com este trabalho. Por isso, a grande diferença nos níveis de aminoácidos ocorre nas folhas. O mutante *nia1 nia2*, para garantir seu sucesso reprodutivo, redirecionaria seus aminoácidos das folhas para os tecidos reprodutivos. Com isso, os botões florais analisados apresentaram altos níveis de aminoácidos e não houve diferença entre selvagem e mutante (Figura 16). Isso claramente demonstra a relação de fonte e dreno entre folhas e botões florais de *Arabidopsis thaliana*. Outro aspecto relevante é que o fator mencionado por Castro Marín et al., (2011) relacionado ao nitrato e que age “upstream” à glutamina tornando o florescimento precoce pode ser o NO. Já foi demonstrado que o NO é um repressor da indução floral (He et al., 2004). Além disso, a modulação da atividade NR pelo nitrato nas folhas (Figura 9B) não afetou o conteúdo de aminoácidos (Figura 13A), mas interferiu na emissão de NO (Figura 17). Seligman et al. (2008) demonstraram que o mutante *nia1 nia2* tem florescimento precoce em relação à selvagem e que isso pode estar relacionado ao NO. Ratificando esse resultado, dados não publicados de nosso laboratório indicaram que a modulação da atividade NR também interferiu na transição para o estadio reprodutivo nas plantas. Quando cultivada com alto nitrato, a mutante

teve seu florescimento um pouco atrasado, da mesma forma que a selvagem quando cultivada com baixo nitrato, teve seu florescimento adiantado. O nitrato foi descartado como sinalizador pelas mesmas razões já citadas anteriormente. Assim, o NO parece ser o causador dessa diferença. Já a glutamina não interfere no florescimento da mutante. Dessa forma pode-se hipotetizar que o NO seria o fator “upstream” à glutamina mencionado por Castro Marín et al., 2011. Ainda, a deficiência em aminoácidos nas folhas da mutante já demonstrada previamente (Modolo et al., 2006; Oliveira et al., 2009) e agora confirmadas nesse trabalho, seria diretamente relacionada à mobilização desses aminoácidos para as estruturas reprodutivas.

O efeito da deficiência na NR nos níveis de aminoácidos também foi avaliado nas raízes. Nesse caso a resposta das plantas cultivadas no solo e *in vitro* foi bastante diferente. No solo não houve diferença entre selvagem e mutante, mas *in vitro* houve (Figuras 14 e 15). Além disso, as raízes das plantas cultivadas *in vitro* foram bastante susceptíveis à variação do nitrato no meio de cultura havendo grande diferença no nível de aminoácidos entre a selvagem cultivada com alto e baixo nitrato. Na mutante a variação entre as plantas cultivadas com alto e baixo nitrato foi menor, mas também ocorreu. A planta selvagem cultivada com baixo nitrato apresentou níveis de aminoácidos semelhantes à mutante.

Nas raízes, de certa forma o efeito foi oposto às folhas. Nas plantas cultivadas no solo, houve grande diferença nos níveis de aminoácidos entre selvagem e mutante nas folhas, mas não na raiz. Já nas plantas cultivadas *in vitro* também houve diferença nas folhas, mas na raiz a variação foi maior, principalmente na selvagem. Além disso, assim como nas folhas, cabe ressaltar os altos níveis de aminoácidos nas raízes das plantas cultivadas *in vitro* em relação às raízes das plantas cultivadas no solo. Novamente, pode-se estabelecer uma correlação com a transição para o estadio reprodutivo. As plantas no solo necessitam para seu desenvolvimento reprodutivo de altos níveis de aminoácidos nos botões florais (Figura 16). Isso faz com que os níveis de aminoácidos nas raízes e folhas sejam menores, sendo que, nas raízes a presença da amônia garantiria o suprimento, enquanto as folhas seriam mais afetadas por serem mais dependentes do nitrato. Nas plantas *in vitro* os aminoácidos permanecem nas folhas e raízes por não haver, pelo menos na mesma intensidade, mobilização para as

estruturas reprodutivas. Assim, a variação no nitrato é mais perceptível em termos de aminoácidos.

Ainda, as plantas *in vitro* foram mantidas no meio de cultura ao longo do desenvolvimento sem reposição de nutrientes ao contrário das plantas cultivadas no solo, que eram regadas com solução nutritiva três vezes por semana. Assim, é plausível que o estresse nutricional do baixo nitrato tenha sido mais sentido nas plantas *in vitro*. Por isso, a grande variação nos níveis de aminoácidos na planta selvagem. Na mutante, não houve tanta variação pela deficiência na NR.

Cabe ressaltar que, assim como os aminoácidos, o nitrato também pode ser mobilizado entre diferentes órgãos (Rossato et al., 2001). Assim, é possível que nas plantas cultivadas *in vitro* com baixo nitrato, grande parte da assimilação desse nutriente tenha ocorrido nas folhas causando essa diferença com relação à planta com alto nitrato nas raízes. Na mutante com alto nitrato o nível de aminoácidos não aumentou tanto quanto na selvagem, pela deficiência na NR. Um aspecto determinante pode ter sido a amônia. A assimilação da amônia ocorre principalmente na raiz, enquanto o nitrato pode também ser assimilado nas folhas (Tobin e Yamaya, 2001). Como comentado na descrição dos resultados, a reposição do meio de cultura nas plantas no solo, provavelmente mantinha os níveis de amônia garantindo o suprimento de aminoácidos na raiz, ao passo que nas plantas *in vitro* a incapacidade da mutante em metabolizar o nitrato ficou mais evidente.

Os aminoácidos sintetizados nas raízes, ou absorvidos diretamente do solo, são translocados principalmente pelo xilema para a parte aérea. Como a transpiração é alta em folhas fotossinteticamente ativas, quantidades relativamente altas de aminoácidos são exportadas das raízes para as folhas (Hirner et al., 2006). Esses aminoácidos podem ser metabolizados, temporariamente armazenados ou transferidos para o floema para distribuição nas flores, frutos e sementes (Lalonde et al., 2003). A transferência de aminoácidos do xilema diretamente para o floema também ocorre para suprimento rápido dos órgãos dreno (Zhang et al., 2010). Durante o desenvolvimento reprodutivo, as sementes representam o maior dreno para o nitrogênio orgânico. Normalmente, todos os aminoácidos protéicos são transportados dentro do floema para a semente, mas em muitas espécies de plantas, incluindo *Arabidopsis* Gln, Glu, Asp, Asn, Ser, ou

Ala parecem ser predominantes (Lam et al., 1995, Wilkinson e Douglas, 2003; Hunt et al., 2006). Embora em nosso trabalho não tenha sido analisada a composição no floema, nota-se que os referidos aminoácidos se acumularam em maior quantidade nas folhas (Figuras 12A) e nos botões florais (Figuras 16A), o que pode indicar que estejam mais relacionados ao transporte.

O controle do conteúdo de aminoácidos parece ser estritamente regulado no xilema e no floema, e apresenta uma complexidade variável que indica um amplo sistema transportador de aminoácidos em plantas para diferentes órgãos (Bush, 1993; Fischer et al., 1998). Como observado nesse trabalho, o acúmulo de aminoácidos nos diferentes órgãos frente à deficiência na NR foi diferente. Assim, o papel da folha como fonte de nitrogênio orgânico, já amplamente debatido na literatura (Tegeder e Rentsch, 2010), parece justificar a deficiência verificada na mutante. É evidente que uma análise mais detalhada da composição de aminoácidos nos tecidos vasculares ajudaria a estabelecer melhor o fluxo de aminoácidos entre os diferentes órgãos, mas, de fato, parece que a planta lida com a baixa atividade da NR de maneira a mobilizar seus aminoácidos para garantir seu sucesso reprodutivo.

Os flavonóides são compostos fenólicos amplamente descritos e, em *Arabidopsis*, estão representados por três classes; antocianinas, flavonóis e proantocianidinas da testa da semente (Routaboul et al., 2006; Peer et al., 2001). As antocianinas são facilmente observadas em tecidos vegetativos mediante estresses porque conferem uma coloração incomum. Mas os principais flavonóides de *Arabidopsis* são os flavonóis que normalmente aparecem glicosilados nas posições C-3 e C-4 e os principais substituintes são os açúcares glicose e ramnose (Pelletier et al., 1999; Kerhoas et al., 2006). Como mostrado nas Tabelas 1 e 2, os flavonóides identificados neste trabalho se enquadram nessas categorias.

Contrariamente às folhas, que possuem níveis discretos de flavonóides em condições normais de cultivo, os botões florais apresentaram altos níveis de flavonóides e não houve diferença entre as plantas selvagem e mutante (Figura 26). De fato, a presença de flavonóis glicosídeos derivados de kaempferol e quercetina em estruturas reprodutivas de *Arabidopsis* já foi demonstrada (Burbulis et al., 1996; Routaboul et al., 2006, Jones et al., 2003). Também, não surpreende que folha e botão floral apresentem

um perfil metabólico diferente. Matsuda et al. (2010) já demonstraram em estudo de metabolômica que diferentes tecidos, incluindo raízes, flores e sementes apresentam um perfil metabólico distinto e característico. O fato de não haver diferença entre selvagem e mutante demonstra que a deficiência na NR não afeta a síntese de flavonóis em *Arabidopsis thaliana*. Assim como nas folhas (Figura 21B), a mutante foi capaz de acumular flavonóis nos botões florais (Figura 26) ao nível da selvagem.

Assim como para os aminoácidos, a ocorrência de altos níveis de flavonóides nos botões florais pode estar relacionada ao sucesso reprodutivo. Em milho e petúnia a ocorrência de flavonóides foi associada a eventos reprodutivos (Mo et al., 1992; van der Meer et al., 1992). Mais recentemente, Thompson et al. (2010) demonstraram que a ausência do transportador de flavonóides FFT (AtDTX35), normalmente presente em altos níveis nas flores, afeta os níveis de flavonóides e prejudica a germinação da semente e desenvolvimento do pólen. Contudo, essa relação não é tão simples em *Arabidopsis*, já que Burbulis et al. (1996) verificaram que o mutante para a chalcona sintase (*tt4*) é fértil. Porém, Thompson et al. (2010) argumentam em relação a isso que o alto nível de flavonóis no pólen pode ser um indicativo de um papel indireto, pelo menos, na fertilidade do gametófito masculino. De qualquer forma, parece haver uma relação entre acúmulo de flavonóides e eventos reprodutivos em plantas e o fato de não ter sido verificada diferença na ocorrência desses compostos entre as plantas selvagem e mutante não exclui a possibilidade de que em estruturas específicas do tecido floral de *Arabidopsis* possa haver diferenças, já que, neste trabalho foi analisado o botão floral sem fazer distinção de estruturas específicas.

6 CONCLUSÕES

O mutante *nia1 nia2*, deficiente para a enzima nitrato redutase, foi incapaz de acumular fenilpropanóides nas folhas no mesmo nível da planta selvagem e essa incapacidade parece estar relacionada a atividade das enzimas aciltransferases dependentes de sinapoil glicose.

Nesse sentido, foi demonstrado que o metabolismo dos ésteres de ácido sinápico está alterado nas folhas da planta mutante. O composto sinapoil malato está reduzido na planta mutante e seu precursor sinapoil glicose está aumentado. Esta falha metabólica foi associada à baixa atividade da enzima sinapoil malato transferase (SMT), responsável pela conversão do sinapoil glicose em sinapoil malato. A baixa atividade dessa enzima foi relacionada, *in vivo*, aos baixos níveis de malato e NO na planta mutante em decorrência da deficiência na NR. Por isso, o cultivo da planta mutante com malato e NO foi capaz de recuperar os níveis de sinapoil malato. A determinação da atividade da SMT mostrou que, de fato, essa enzima possui menor atividade na planta mutante e essa atividade foi influenciada pelo NO. Porém, a atividade da enzima não pôde ser recuperada totalmente, sugerindo uma modificação estrutural de difícil reversão na planta mutante adulta.

Foi também demonstrado que a planta mutante, quando submetida ao estresse luminoso, foi incapaz de acumular antocianinas sinapoidadas no mesmo nível da planta selvagem. Porém, os precursores das antocianinas, a saber, flavonóis e sinapoil glicose, foram acumulados normalmente na mutante. Como o metabolismo dos flavonóis não apresentou nenhuma falha em decorrência da deficiência na NR, foi levantada a possibilidade de que um dos problemas para o acúmulo das antocianinas seja a incorporação do sinapoil glicose nas antocianinas.

A enzima responsável pela adição do sinapoil glicose no núcleo de cianidina é chamada sinapoil antocianina transferase (SAT) e está intimamente relacionada à SMT. Essas duas enzimas pertencem à classe de proteínas denominadas SCPL, que são dependentes de sinapoil glicose e estruturalmente semelhantes. Isso abre a possibilidade de que o NO seja um regulador da atividade dessa classe de proteínas.

Ainda, a avaliação do efeito da deficiência na NR sobre a síntese de aminoácidos mostrou que a folha é o órgão mais afetado na planta. Botões florais e raízes não foram ou foram menos afetados pela deficiência na NR. A conclusão foi que as folhas atuam como fontes de aminoácidos, principalmente para as estruturas reprodutivas e, por isso, se mostraram deficientes em aminoácidos diante da baixa atividade NR da mutante. Os botões florais seriam, nesse aspecto, os drenos e por isso não apresentaram deficiência de aminoácidos. As raízes também foram pouco afetadas, porque seriam menos dependentes do nitrato na obtenção de seus aminoácidos, pela presença da amônia que normalmente é assimilada nesse órgão. O tratamento da planta mutante com glutamina foi eficiente em recuperar os níveis de aminoácidos na planta mutante. Por fim, o metabolismo dos flavonóis nos botões florais também não foi alterado, assim como nas folhas.

Tem-se com isso que, a baixa atividade da NR compromete o metabolismo dos ésteres de ácido sinápico e antocianinas em folhas de *Arabidopsis* e que essa alteração pode estar relacionada aos níveis reduzidos de NO. Porém, o metabolismo dos flavonóis não foi comprometido. Além disso, as relações de fonte e dreno de aminoácidos foram alteradas na planta mutante.

Por fim, o acúmulo de ésteres de ácido sinápico, que conferem um sabor amargo e adstringente aos vegetais, são características indesejáveis para Brassicaceas de valor comercial. Assim, a relação entre metabolismo de nitrogênio e metabolismo dos ésteres de ácido sinápico demonstrada neste trabalho pode ser uma alternativa viável de se manipular a ocorrência desses compostos nas plantas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aharoni A, Galili G** (2010) Metabolic engineering of the plant primary-secondary metabolism interface. *Curr. Opin. Biotechnol.* **22**: 1-6.
- Alboresi A, Gestin C, Leydecker MT, Bedu M, Meyer C, Truong HN** (2005) Nitrate, a signal relieving seed dormancy in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* **28**: 500-512.
- Arasimowicz M, Floryszak-Wierzore J** (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* **172**: 876-887 .
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM** (2002) Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature* **416**: 337-339.
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, Sandalio LM, Valderrama R, Palma JM, Lupianez JA, Del rio LA** (1999) Localization of nitric-oxide synthase in plant peroxisomes. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 36729-36733.
- Baumert A, Milkowski C, Schmidt J, Nimtz M, Wray V, Strack D** (2005) Formation of a complex pattern of sinapate esters in *Brassica napus* seeds, catalysed by enzymes of a serine carboxypeptidase-like acyltransferase family. *Phytochemistry* **66**:1334-1345.
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P** (1993) Physiological signals that induce flowering. *Plant Cell* **5**:1147-1155.
- Besseau S, Hoffmann L, Geoffroy P, Lapierre C, Pollet B, Legrand M** (2007) Flavonoid Accumulation in *Arabidopsis* Repressed in Lignin Synthesis Affects Auxin Transport and Plant Growth. *The Plant Cell* **19**: 148-162.
- Bethke PC, Libourel IGL, Jones RL** (2006) Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **57**: 517-526.

- Bi YM, Wang RL, Zhu T, Rothstein SJ** (2007) Global transcription profiling reveals differential responses to chronic nitrogen stress and putative nitrogen regulatory components in *Arabidopsis*. *BMC Genomics* **8**: 281.
- Bloom AJ, Meyerhoff PA, Taylor AR, Rost TL** (2002). Root development and absorption of ammonium and nitrate from the rhizosphere. *Journal of Plant Growth Regulation* **21**: 416-431.
- Bloor SJ, Abrahams S** (2002) The structure of the major anthocyanin in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* **59**: 343-346.
- Böttcher C, Roepenack-Lahaye EV, Schmidt J, Schmotz C, Neumann S, Scheel D, Clemens S** (2008) Metabolome analysis of biosynthetic mutants reveals diversity of metabolic changes and allows identification of a large number of new compounds in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **147**: 2107-2120.
- Bouchereau AJ, Hamelin J, Lamour I, Renard M, Larher F** (1991) Distribution of sinapine and related compounds in seeds of Brassica and allied genera. *Phytochemistry* **30**:1873-1881.
- Bradford MM** (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.
- Bredemeier C, Mundstock CM** (2000) Regulação da absorção e assimilação do nitrogênio nas plantas. *Ciência Rural, Santa Maria* **30**: 365-372.
- Broun P** (2005) Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 272-279.
- Buer CS, Djordjevic MA** (2009) Architectural phenotypes in the transparent testa mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* **60**: 751-763.
- Buer CS, Muday GK** (2004) The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of *Arabidopsis* roots to gravity and light. *Plant Cell* **16**: 1191-1205.

- Buer CS, Muday GK, Djordjevic M.A.** (2007) Flavonoids are differentially taken up and transported long distances in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **145**: 478-490.
- Burbulis IE, Iacobucci M, Shirley BW** (1996) A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **8**: 1013-1025.
- Bush DR** (1993) Proton-coupled sugar and amino acid transporters in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **44**: 513-542.
- Campbell WH** (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and physiology. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **50**: 277-303.
- Cataldo DA, Haroon M, Schrader LE, Youngs VL** 1975 Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissues by nitration of salicylic acid. *Commun. Soil Plant Anal.* **6**:71-80.
- Chapin FS, Moilanen L, Kielland K** (1993) Preferential use of organic nitrogen for growth by a non-mycorrhizal arctic sedge. *Nature* **361**: 150-153.
- Castro Marín I, Loeff I, Bartetzko L, Searle I, Coupland G, Stitt M, Osuna D** (2010) Nitrate regulates floral induction in *Arabidopsis*, acting independently of light, gibberellin and autonomous pathways. *Planta* **233**: 539-552.
- Cartea ME, Francisco M, Soengas P, Velasco P** (2011) Phenolic compounds in *Brassica* vegetables. *Molecules* **16**: 251-280.
- Corbesier L, Bernier G, Périlleux C** (2002) C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **43**: 684-688.
- Corbesier L, Havelange A, Lejeune P, Bernier G, Périlleux C** (2001) N content of phloem and xylem exudates during the transition to flowering in *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell and Environment* **24**: 367-375.
- Corpas FJ, Barroso JB, Del rio LA** (2001) Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**: 145-150.

- Corpas FJ, del Río LA, Barroso JB** (2008) Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species: nitrosative stress responses or components of signal transduction pathways? *Plant Signal. Behav.* **3**: 301-303.
- Coruzzi G, Last R** (2000) Amino acids, in: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, American Society of Plant Physiologists, pp. 358-410.
- Coruzzi GM, Zhou L** (2001) Carbon and nitrogen sensing and signaling in plants: emerging 'matrix effects.' *Curr. Opin. Plant. Biol.* **4**: 247-253.
- Crawford N, Glass ADM** (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plant Science* **3**: 389-395.
- Crawford NM** (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell* **7**: 859-868.
- Crawford NM** (2006a). Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* **57**: 471-478.
- Crawford NM, Galli M, Tischner R, Heimer YM, Okamoto M, Mack A** (2006b) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* **11**: 526-527.
- Crawford NM Forde BG** (2002) Molecular and developmental biology of inorganic nitrogen nutrition. In: Meyerowitz EM, ed. *The Arabidopsis book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists.
- D'Auria JC, Gershenzon J** (2005) The secondary metabolism of *Arabidopsis thaliana*: growing like a weed. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **8**:308-16.
- Davies KM, Schwinn KE, Deroles SC, Manson DG, Lewis DH, Bloor SJ, Bradley JM** (2003) Enhancing anthocyanin production by altering competition for substrate between flavonol synthase and dihydroflavonol 4-reductase. *Euphytica* **131**: 259-268.
- Dean JV, Harper JE** (1986) Nitric oxide and nitrous oxide production by soybean and winged bean during in vivo nitrate reductase assay. *Plant Physiology* **82**: 718-723.

- Dechorgnat J, Nguyen C-T, Armengaud P, Jossier M, Diatloff E, Filleur S, Daniel-Vedele F** (2011). From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany*, **62**: 1349-1359.
- Del Rio LA, Corpas FJ Barroso JB** (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* **65**: 783-792.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A., Lamb, C.** (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C** (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 13454-13459.
- Delledonne M** (2005) NO news is good news for plants. *Curr. Opin.Plant Biol.* **8**: 1-7.
- Delrot S, Atanassova R, Gomes E, Coutos-Thevenot P** (2001) Plasma membrane transporters: a machinery for uptake of organic solutes and stress resistance. *Plant Science* **161**: 391-404.
- Desikan R, Cheung M-K, Bright J, Henson D, Hancock JT Neill SJ** (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *J. Exp. Bot.* **55**: 205-212.
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S** (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **99**: 16314-16318.
- Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry J-F, Dily FL, Masclaux-Daubresse C** (2008) Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in *Arabidopsis* under Low Nitrogen Nutrition. *Plant Physiology* **147**: 1437-1449.
- Dickens CWS, Van Staden J** (1988) The in vitro flowering of *Kalanchoë blossfeldiana* Poellniz. I. Role of culture conditions and nutrients. *J. Exp. Bot.* **39**: 461-471.

- Dixon RA, Paiva NL** (1995) Stress induced Phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097.
- Durner J, Wendehenne D, Klessig DF** (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 10328-10333.
- Fan SC, Lin CS, Hsu PK, Lin SH, Tsay YF** (2009) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT1.7, expressed in phloem, is responsible for source-to-sink remobilization of nitrate. *The Plant Cell* **21**: 2750-2761.
- Fischer WN, André B, Rentsch D, Sylvia K, Tegeder M, Breitzkreuz K, Frommer WB** (1998) Amino acid transport in plants. *Trends in plant science* **3**: 188-195.
- Franke R, Humphreys JM, Hemm MR, Denault JW, Ruegger MO, Cusumano JC, Chapple C** (2002) The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **30**:33-45.
- Fraser CM, Rider LW, Chapple C** (2005) An expression and bioinformatics analysis of the *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like gene family. *Plant Physiol.* **138**: 1136-1148.
- Fraser CM, Thompson MG, Shirley AM, Ralph J, Schoenherr JA, Sinlapadech T, Hall MC, Chapple C** (2007) Related *Arabidopsis* serine carboxypeptidase-like sinapoylglucose acyltransferases display distinct but overlapping substrate specificities. *Plant Physiol.* **144**: 1986-1999.
- Frey M, Chomet P, Glawischnig E, Stettner C, Grun S, Winklmair A, Eisenreich W, Bacher A, Meeley RB, Briggs SP** (1997) Analysis of a chemical plant defense mechanism in grasses. *Science* **277**: 696-699.
- Fritz C, Palacios-Rojas N, Feil R, Stitt M** (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon-nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *Plant J.* **46**: 533-548.
- Gago B, Lundberg JO, Barbosa RM, Laranjinha J** (2007) Red wine-dependent reduction of nitrite to nitric oxide in the stomach. *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 1233-1242.

- Gansel X, Munos S, Tillard P, Gojon A** (2001) Differential regulation of the NO₃ and NO₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local-controls by N status of the plant. *The Plant Journal* **26**: 143-155.
- Gläßgen WE, Rose A, Madlung J, Koch W, Gleitz J, Seitz HU** (1998) Regulation of enzymes involved in anthocyanin biosynthesis in carrot cell cultures in response to treatment with ultraviolet light and fungal elicitors. *Planta* **204**: 490-498.
- Gojon A, Nacry P, Davidian JC** (2009) Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **12**:328-338.
- Gonzales A, Mendenhall J, Huo Y, Lloyd A** (2009) TTG1 complex MYBs, MYB5 and TT2, control outer seed coat differentiation. *Dev. Biol.* **325**: 412-421.
- Gonzalez A, Zhao M, Leavitt JM, Lloyd AM** (2008) Regulation of the anthocyanin biosynthetic pathway by the TTG1/bHLH/Myb transcriptional complex in *Arabidopsis* seedlings. *Plant J* **53**: 814-827.
- Gordon T, Lea PJ, Rosenberg C, Trinchnat JC** (2001). Nodule formation and function. In: Lea P, Morot-Gaudry JF, eds. *Plant nitrogen*. Berlin: Springer-Verlag, 101-146.
- Graham TL** (1998) Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology Biochemistry* **36**: 135-144.
- Grienenberger E, Besseau S, Geoffroy P, Debayle D, Heintz D, Lapierre C, Pollet B, Heitz T, Legrand M** (2009) A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of *Arabidopsis* anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. *Plant J* **58**: 246-259.
- Grotewold E** (2004) The challenges of moving chemicals within and out of cells: insights into the transport of plant natural products. *Planta* **219**: 906-909.
- Guo FQ, Crawford NM** (2005) *Arabidopsis* nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**: 3436-3450.
- Guo F-Q, Okamoto M, Crawford MJ** (2003) *Science* **302**, 100-103.

- Gutierrez RA, Stokes TL, Thum K, Xu X, Obertello M, Katari MS, Tanurdzic M, Dean A, Nero DC, McClung CR** (2008) Systems approach identifies an organic nitrogen-responsive gene network that is regulated by the master clock control gene CCA1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 4939-4944.
- Hagemeyer J, Schneider B, Oldham NJ, Hahlbrock K** (2001) Accumulation of soluble and wall-bound indolic metabolites in *Arabidopsis thaliana* leaves infected with virulent or avirulent *Pseudomonas syringae* pathovar tomato strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **98**: 753-758.
- Hamberger B, Hahlbrock K** (2004) The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 2209-2214.
- Hause B, Meyer K, Viitanen PV, Chapple C, Strack D** (2002) Immunolocalization of 1-O-sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 26-32.
- He Y, Tang RH, Hao Y, Stevens RD, Cook CW, Ahn SM, Jing L, Yang Z, Chen L, Guo F, Fiorani F, Jackson RB, Crawford NM, Pei ZM** (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* **305**:1968-1971.
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C** (2004) Light induces phenylpropanoid metabolism in *Arabidopsis* roots. *Plant J.* **38**: 765-78.
- Herdel K, Schmidt P, Feil R, Mohr A, Schurr U** (2001). Dynamics of concentrations and nutrient fluxed in the xylem of *Ricinus communis*: diurnal course, impact of nutrient availability and nutrient uptake. *Plant, Cell and Environment* **24**: 41-52.
- Hirel B, Bertin P, Quillere I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadiou S, Retalliau C, Falque M, Gallais A** (2001) Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiol.* **125**: 1258-1270.
- Hirner A, Ladwig F, Stransky H, Okumoto S, Keinath M, Harms A, Frommer WB, Koch W** (2006). *Arabidopsis* LHT1 is a high-affinity transporter for cellular amino acid uptake in both root epidermis and leaf mesophyll. *Plant Cell* **18**: 1931-1946.

- Hoch WA, Singaas EL, Mccown BH** (2003) Resorption protection. Anthocyanins facilitate nutrient recovery in autumn by shielding leaves from potentially damaging light levels. *Plant Physiology* **133**: 1296-1305.
- Hoffmann L, Maury S, Martz F, Geoffroy P, Legrand M** (2003). Purification, cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**: 95-103.
- Honda T, Tatsuzawa F, Kobayashi N, Kasai H, Nagumo S Shigihara A, Saito N** (2005) Acylated anthocyanins from the violet-blue flowers of *Orychophragonus violaceus*. *Phytochemistry* **66**:1844-1851.
- Humphreys JM, Hemm MR, Chapple C** (1999) New routes for lignin biosynthesis defined by biochemical characterization of recombinant ferulate 5-hydroxylase, a multi-functional cytochrome P450-dependent monooxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:10045-10050.
- Hunt EJ, Pritchard J, Bennett MJ, Zhu X, Barrett DA, Allen T, Bale JS, Newbury HJ** (2006). The *Arabidopsis thaliana/Myzus persicae* model system demonstrates that a single gene can influence the interaction between a plant and a sap-feeding insect. *Mol. Ecol.* **15**: 4203-4213.
- Ikram, S., Bedu, M., Daniel-Vedele, F., Chaillou, S., Chardon, F.** (2011) Natural variation of *Arabidopsis* response to nitrogen availability. *Journal of Experimental Botany* doi: 10.1093.
- Jones P, Messner B, Nakajima J-I, Schäffner A-R, Saito K** (2003) UGT73C6 and UGT78D1, glycosyltransferases involved in flavonol glycoside biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 43910-43918.
- Kaiser WM, Weiner H, Huber SC** (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. *Physiol. Plant.* **105**: 385-390.
- Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai CB, Rockel P, Sonoda M, Planchet E** (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of Experimental Botany* **53**: 875-882.

- Kaiser WK, Huber SC** (2001) Post-translational regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1981-1989.
- Kant S, Bi Y-M, Rothstein SJ** (2011) Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany* **62**: 1499-1509.
- Kerhoas L, Aouak D, Cingöz A, Routaboul JM, Lepiniec L, Einhorn J, Birlirakis N** (2006) Structural characterization of the major flavonoid glycosides from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 6603-6612.
- Kielland K** (1994) Amino acid absorption by arctic plants: implications for plant nutrition and nitrogen cycling. *Ecology* **75**: 2373-2383.
- Klepper L** (1990) Comparison between NO_(x) evolution mechanisms of wild type and nr1 mutant soybean leaves. *Plant Physiology* **93**: 26-36.
- Klepper LA** (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen oxide (NO₂) emissions from herbicide treated soybean plants. *Atmospheric Environment* **13**: 537-542.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F** (2005) Flavonoids: a colourful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science* **10**: 236-242.
- Koornneef M** (1990) Mutations affecting the testa color in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Services* **27**: 1-4.
- Koornneef M, Luiten W, de Vlaming P, Schram AW** (1982) A gene controlling flavonoid-39-hydroxylation in *Arabidopsis*. *Arabidopsis Information Services* **19**: 113-115.
- Krouk G, Crawford NM, Coruzzi GM, Tsay Y** (2010) Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 1-8.
- Kubasek WL, Shirley BW, McKillop A, Goodman HM, Briggs W, Ausubel FM** (1992) Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* **4**: 1229-1236.

- Kuznetsova S, Knaff DB, Hirasawa M, Setif P, Mattioli TA** (2004) Reactions of spinach nitrite reductase with its substrate, nitrite, and a putative intermediate, hydroxylamine. *Biochemistry* **43**: 10765-10774.
- Lalonde S, Tegeder M, Throne-Holst M, Frommer WB, Patrick JW** (2003). Phloem loading and unloading of sugars and amino acids. *Plant Cell Environ.* **26**: 37-56.
- Lalonde S, Wipf D, Frommer WB** (2004) Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annual Review in Plant Biology* **55**: 341-372.
- Lam HM, Coschigano K, Oliveira IC, Melo-Oliveira R, Coruzzi G** (1996) The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 569-93.
- Lam HM, Coschigano K, Schultz C, Melo-Oliveira R, Tjaden G, Oliveira I, Ngai N, Hsieh MH, Coruzzi G** (1995). Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 887-898.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G** (2003) Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* **54**:109-136.
- Landry LG, Chapple CCS, Last R** (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol* **109**: 1159-1166.
- Lehfeldt C, Shirley AM, Meyer K, Ruegger MO, Cusumano JC, Viitanen PV, Strack D, Chapple C** (2000) Cloning of the SNG1 gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase-like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* **12**: 1295-1306.
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J-M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M** (2006) Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**: 405-430.
- Lewis NG, Yamamoto E** (1990). Lignin: Occurrence, biogenesis and biodegradation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41**: 455-496.

- Li AX, Steffens JC** (2000) An acyltransferase catalyzing the formation of diacylglycerol is a serine carboxypeptidase-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 6902-6907.
- Lillo C, Lea US, Ruoff P** (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant, Cell and Environment* **31**: 587-601.
- Lillo C, Meyer C, Lea US, Provan F, Oltedal S** (2004) Mechanisms and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *J. Exp. Bot.* **55**: 1-8.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J.** (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**: 921-930.
- Lindermayr C, Durner J** (2009) S-Nitrosylation in plants: pattern and function. *J. Proteomics* **73**: 1-9.
- Lindermayr C, Sell S, Müller B, Leister D, Durner J** (2010) Redox regulation of the NPR1-TGA1 system of *Arabidopsis thaliana* by nitric oxide. *Plant Cell* **22**: 2894-2907
- Liu K, Tsay Y** (2003). Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *EMBO J.* **22**: 1005-1013.
- Lorenzen M, Racicot V, Strack D, Chapple C** (1996). Sinapic acid ester metabolism in wild type and a sinapoylglucoseaccumulating mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **112**: 1625-1630.
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, Lemaitre T, Azzopardi M, Morin H, Chardon F, Reisdorf-Cren M, Avice JC, Masclaux-Daubresse C** (2011) The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in *Arabidopsis* rosettes when nitrate supply is not limiting. *J Exp Bot* **62**:1375-1390.
- Mackerness SAH, John CF, Jordan B, Thomas B** (2001) Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. *FEBS Lett.* **489**: 237-242.

- Majerowicz N, França MGC, Peres LEP, Médici LO, Figueiredo AS** (2003) *Fisiologia Vegetal Curso Prático. Âmbito Cultural Edições LTDA, Rio de Janeiro, Brasil* 138 pp.
- Malagoli P, Laine P, Le Deunff E, Rossato L, Ney B, Ourry A** (2004). Modeling nitrogen uptake in oilseed rape cv Capitol during a growth cycle using influx kinetics of root nitrate transport systems and field experimental data. *Plant Physiology* **134**: 388-400.
- Marino SM, Gladyshev VN** (2010). Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *J. Mol. Biol.* **395**: 844-859.
- Martens S, Forkmann G** (1999) Cloning and expression of Xavone synthase II from Gerbera hybrids. *Plant J.* **20**:611-618.
- Martens S, Forkmann G, Matern U, Lukacin R** (2001) Cloning of parsley Xavone synthase I. *Phytochemistry* **58**: 43-46.
- Martens S, Preuss A, Matern U** (2010) Multifunctional flavonoid dioxygenases: flavonol and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* L. *Phytochemistry* **71**: 1040-1049.
- Masclaux-Daubresse C, Daniel-Vedele F, Dechorgnat J, Chardon F, Gaufichon L, Suzuki A** (2010) Nitrogen uptake, assimilation and remobilisation in plants: challenges for sustainable and productive agriculture. *Annals of Botany* **105**: 1141-1157.
- Matsuda F, Hirai MY, Sasaki E, Akiyama K, Yonekura-Sakakibara K, Provart NJ, Sakurai T, Shimada Y, Saito K** (2010) AtMetExpress Development: A Phytochemical Atlas of Arabidopsis Development. *Plant Physiology* **152**: 566-578.
- Matsuda F, Sakakibara KY, Niida R, Kuromori T, Shinozaki K, Saito K** (2009) MS/MS spectral tag-based annotation of non-targeted profile of plant secondary metabolites. *The Plant Journal* **57**: 555-577.
- Meyer C, Lea US, Provan F, Kaiser WM, Lillo C** (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynth. Research* **83**: 181-189.

- Mickelson S, See D, Meyer FD, Garner JP, Foster C.R., Blake, T.K., Fischer, A.M.** (2003). Mapping of QTL associated with nitrogen storage and remobilization in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J. Exp. Bot.* **54**: 801-812.
- Miles AM, Wink DA, Cook JC Grisham MB** (1996) Determination of nitric oxide using fluorescence spectroscopy. *Methods in Enzymology* **268**:105-120.
- Milkowski C, Baumert A, Schmidt D, Nehlin L, Strack D** (2004) Molecular regulation of sinapate ester metabolism in *Brassica napus*: expression of genes, properties of the encoded proteins and correlation of enzyme activities with metabolite accumulation. *Plant J.* **38**: 80-92.
- Milkowski C, Strack D** (2010) Sinapate Esters in Brassicaceous Plants: Biochemistry, Molecular Biology, Evolution and Metabolic Engineering. *Planta* **232**: 19-35.
- Miller AJ, Fan X, Shen Q, Smith SJ** (2008) Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *J. Exp. Bot.* **59**:111-119.
- Mo Y, Nagel C, Taylor LP** (1992) Biochemical complementation of chalcone synthase mutants defines a role for flavonols in functional pollen. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **89**: 7213-7217.
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhães JR, Salgado I** (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae* *FEBS Lett.* **579**: 3814-3820.
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IMG, Pinto-Maglio CAF, Oliveira HC, Seligman K, Salgado I** (2006) Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Sci.* **171**: 34-40.
- Modolo LV, Cunha FQ, Braga MR, 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.
- Müller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nilsen TH** (2007) Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism. *Plant Physiology* **143**: 156-171.

- Murphy A, Peer WA, Taiz L** (2000) Regulation of auxin transport by aminopeptidases and endogenous flavonoids. *Planta* **211**: 315-324.
- Nair RB, Xia Q, Kartha CJ, Kurylo E, Hirji RN, Datla R, Selvaraj G** (2002) *Arabidopsis* CYP98A3 mediating aromatic 3-hydroxylation. Developmental regulation of the gene, and expression in yeast. *Plant Physiol.* **130**: 210-220.
- Näsholm T, Kielland K, Ganeteg U** (2009). Uptake of organic nitrogen by plants. *New Phytol.* **182**: 31-48.
- Nazoa P, Videmar J, Tranbarger TJ, Mouline K, Damiani I, Tillard P, Glass ADM, Touraine B** (2003) Regulation of the nitrate transporter gene AtNRT2.1 in *Arabidopsis thaliana*, responses to nitrate, amino acids, and developmental stage. *Plant Molecular Biology* **52**: 689-703.
- Neill S, Desikan R, Hancock JT** (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* **159**: 11-35.
- Neill, S., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Wilson, I.** (2008) Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.* **59**: 25-35.
- Oliveira HC, Justino GC, Sodek L, Salgado I** (2009) Amino acid recovery does not prevent susceptibility to *Pseudomonas syringae* in nitrate reductase double-deficient *Arabidopsis thaliana* plants. *Plant Science* **176**: 105-111.
- Oliveira IC, Brenner E, Chiu J, Hsieh M-H, Kouranov A, Lam H-M, Shin MJ, Coruzzi G** (2001) Metabolite and light regulation of metabolism in plants: lessons from the study of a single biochemical pathway. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**: 567-575.
- Olsen KM, Slimestad R, Lea US, Brede C, Løvdal T, Ruoff P, Verheul M, Lillo C** (2009) Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies. *Plant Cell Environ* **32**:286-299.
- Osakabe K, Tsao CC, Li L, Popko JL, Umezawa T, Carraway DT, Smeltzer RH, Joshi CP, Chiang VL** (1999) Coniferyl aldehyde 5-hydroxylation and methylation direct syringyl lignin biosynthesis in angiosperms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:8955-8960

- Peer WA, Brown DE, Tague BW, Muday GK, Taiz L, Murphy AS** (2001) Flavonoid accumulation patterns of transparent testa mutants of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **126**: 536-548.
- Pelletier MK, Burbulis IE, Shirley BW** (1999) Disruption of specific flavonoid genes enhances the accumulation of flavonoid enzymes and end-products in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Molecular Biology* **40**: 45-54.
- Peng M, Hannam C, Gu H, Bi Y-M, Rothstein SJ** (2007) A mutation in NLA, which encodes a RING-type ubiquitin ligase, disrupts *Arabidopsis* adaptability to nitrogen limitation. *The Plant Journal* **50**: 320-337.
- Peng M, Hudson D, Schofield A, Tsao R, Yang R, Gu H, Bi Y-M, Rothstein SJ** (2008) Adaptation of *Arabidopsis* to nitrogen limitation involves induction of anthocyanin synthesis which is controlled by the NLA gene. *Journal of Experimental Botany* **59**: 2933-2944.
- Prinsi B, Negri AS, Pesaresi P, Cocucci M, Espen L** (2009) Evaluation of protein pattern changes in roots and leaves of *Zea mays* plants in response to nitrate availability by two-dimensional gel electrophoresis analysis. *BMC Plant Biol.* **9**: 113.
- Puiatti M, Sodek L** (1999) Waterlogging affects nitrogen transport in the xylem of soybean. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 767-773.
- Raab TK, Lipson DA, Monson RK** (1996) Non-mycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle. *Oecologia* **108**: 488-494.
- Raab TK, Lipson DA, Monson RK** (1999) Soil amino acid utilization among species of the Cyperaceae: plant and soil processes. *Ecology* **80**: 2408-2419.
- Raab TK, Terry N** (1995) Carbon, nitrogen and nutrient interactions in *Beta vulgaris* L. as influenced by nitrogen source, NO_3^- versus NO_4^+ . *Plant Physiology* **107**: 575-584.
- Radi R** (2004) Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 4003-4008.

- Raun WR, Johnson GV** (1999) Improving nitrogen use efficiency for cereal production. *Agronomy Journal* **91**: 357-363.
- Reddy AM, Reddy VS, Scheffler BE, Wienand U, Reddy AR** (2007) Novel transgenic rice overexpressing anthocyanidin synthase accumulates a mixture of flavonoids leading to increased antioxidant potential. *Metab. Eng.* **9**: 95-111.
- Reed AJ, Below FE, Hageman RH** (1980) Grain protein accumulation and the relationship between leaf nitrate reductase and protease activities during grain development in maize (*Zea mays L.*). *Plant Physiology* **66**: 1179-1183.
- Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M** (2007) Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *FEBS Letters* **581**: 2281-2289.
- Ribeiro EA, Cunha FQ, Tamashiro WMSC, Martins IS** (1999) Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters* **445**: 283-286.
- Richard-Molard C, Krapp A, Brun F, Ney B, Daniel-Vedele F, Chaillou S** (2008). Plant response to nitrate starvation is determined by N storage capacity matched by nitrate uptake capacity in two *Arabidopsis* genotypes. *J. Exp. Bot.* **59**: 779-791.
- Rocha BS, Gago B, Barbosa RM, Laranjinha J** (2009) Dietary polyphenols generate nitric oxide from nitrite in the stomach and induce smooth muscle relaxation. *Toxicology* **265**: 41-48.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM** (2002). Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Bot.* **53**: 103-110.
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Mattè A, Zaninotto F, Finkemeier I, Jones AM, Perazzolli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M** (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *The Plant Cell* **19**: 4120-4130.
- Rossato L, Laine P, Ourry A** (2001). Nitrogen storage and remobilization in *Brassica napus L.* during the growth cycle: Nitrogen fluxes within the plant and changes in soluble protein patterns. *J. Exp. Bot.*, **52**: 1655-1663.

- Routaboul J-M, Kerhoas L, Debeaujon I, Pourcel L, Caboche M, Einhorn J, Lepiniec L** (2006) Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **224**: 96-107.
- Rubin G, Tohge T, Matsuda F, Saito K, Scheible WR** (2009). Members of the LBD family of transcription factors repress anthocyanin synthesis and affect additional nitrogen responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **21**: 3567-3584.
- Ruegger M, Meyer K, Cusumano JC, Chapple C** (1999). Regulation of ferulate-5-hydroxylase expression in *Arabidopsis* in the context of sinapate ester biosynthesis. *Plant Physiol.* **119**: 101-110.
- Salgado I, Modolo LV, Magalhães JR Tamashiro WMSC Saviani EE** (2006) Production of nitric oxide in plants by nitric oxide synthase enzymes. In: Singh RP, Jaiwal PK (eds) *Biotechnological approaches to improve nitrogen use efficiency in plants*. Studium, Houston, pp 87-102.
- Santa-Catarina C, Silveira V, Scherer GFE, Segal Floh EI** (2007) Polyamine and nitric oxide levels relate with morphogenetic evolution in somatic embryogenesis of *Ocotea catharinensis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **90**:93-101.
- Saslowsky DE, Dana CD, Winkel-Shirley B** (2000) An allelic series for the chalcone synthase locus in *Arabidopsis*. *Gene* **255**: 127-138.
- Scheible WR, Gonzalez-Fontes A, Lauerer M, Mueller-Roeber B, Caboche M, Stitt M** (1997) Nitrate acts as a signal to induce organic acid metabolism and repress starch metabolism in tobacco. *The Plant Cell* **9**: 783-798.
- Scheible WR, Krapp A, Stitt M** (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, Cell and Environment* **23**: 1155-1167.
- Scheible W-R, Morcuende R, Czechowski T, Fritz C, Osuna D, Palacios-Rojas N, Schindelasch D, Thimm O, Udvardi MK, Stitt M** (2004) Genome-wide reprogramming of primary and secondary metabolism, protein synthesis, cellular

- growth processes, and the regulatory infrastructure of *Arabidopsis* in response to nitrogen. *Plant Physiol.* **136**: 2483-2499.
- Schmidt S, Stewart GR** (1999) Glycine metabolism by plant roots and its occurrence in Australian plant communities. *Australian Journal of Plant Physiology* **26**: 253-264.
- Schoch G, Goepfert S, Morant M, Hehn A, Meyer D, Ullmann P, Werck-Reichhart D** (2001) CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3'-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway. *J Biol Chem.* **276**: 36566-36574.
- Seligman K, Saviani EE, Oliveira HC, Pinto-Maglio CAF, Salgado I** (2008) Floral Transition and Nitric Oxide Emission During Flower Development in *Arabidopsis thaliana* is Affected in Nitrate Reductase-Deficient Plants. *Plant and Cell Physiology* **49**: 1112-1121.
- Sharma V, Strack D** (1985) Vacuolar localization of 1-sinapylglucose: L-malate sinapoyltransferase in protoplasts from cotyledons of *Raphanus sativus*. *Planta* **163**: 563-568
- Sheahan JJ** (1996) Sinapate esters provide greater UV-B attenuation than flavonoids in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *Am. J. Bot.* **83**: 679-686.
- Shirley AM, McMichael CM, Chapple C** (2001) The *sng2* mutant of *Arabidopsis* is defective in the gene encoding the serine carboxypeptidase-like protein sinapoylglucose:choline sinapoyltransferase. *Plant J.* **28**: 83-94.
- Shi Q, Ding F, Wang X, Wei M** (2007) Exogenous nitric oxide protect cucumber roots against oxidative stress induced by salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**: 542-550.
- Smillie RM, Hetherington SE** (1999). Photoabatement by anthocaynin shields photosynthetic systems from light stress. *Photosynthetica* **36**: 451-463.
- Soudry E, Ulitzur S, Gepstei S** (2005) Accumulation and remobilization of amino acids during senescence of detached and attached leaves: in planta analysis of tryptophan levels by recombinant luminescent bacteria. *Journal of Experimental Botany* **56**: 695-702.

- Steffens JC** (2000) Acyltransferases in protease's clothing. *Plant Cell* **12**: 1253-1256.
- Stehle F, Brandt W, Milkowski C, Strack D** (2006) Structure determinants and substrate recognition of serine carboxypeptidase-like acyltransferases from plant secondary metabolism. *FEBS Lett.* **580**: 6366-6374.
- Stehle F, Brandt W, Schmidt J, Milkowski C, Strack D**, (2008). Activities of *Arabidopsis* sinapoylglucose: malate sinapoyltransferase shed light on functional diversification of serine carboxypeptidase-like acyltransferases. *Phytochemistry* **69**: 1826-1831.
- Stehle F, Brandt W, Stubbs MT, Milkowski C, Strack D** (2009) Sinapolytransferases in the light of molecular evolution. *Phytochemistry* **70**:1652-1661
- Steyn WJ, Wand SJE, Holcroft DM, Jacobs G** (2002) Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist* **155**: 349-361.
- Stitt M** (1999) Nitrate and the regulation of primary metabolism, allocation and growth. *Current Opinion in Plant Science* **2**: 178-186.
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A** (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J. Exp. Bot.* **53**:959-970.
- Stobiecki M, Skiryecz A, Kerhoas L, Kachlicki P, Mutha D, Einhorn J, Mueller-Roeber B** (2006) Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. *Metabolomics* **2**: 197-219.
- Stöhr C, Strube F, Marx G, Ullrich WR, Rockel P** (2001). A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835-841.
- Strack D** (1982) Development of 1-O-sinapoyl- β -D-glucose: L-malate sinapoyltransferase activity in cotyledons of red radish (*Raphanus sativus* L. var. *sativus*). *Planta* **155**: 31-36.

- Strack D, Reinecke J, Takeuchi S** (1986) Evidence for a relationship between malate metabolism and activity of 1-sinapoylglucose: L-malate sinapoyltransferase in radish (*Raphanus sativus* L.) cotyledons. *Planta* **167**: 212-217.
- Stracke R, De Vos RC, Bartelniewoehner L, Ishihara H, Sagasser M, Martens S, Weisshaar B** (2009) Metabolomic and genetic analyses of flavonol synthesis in *Arabidopsis thaliana* support the *in vivo* involvement of leucoanthocyanidin dioxygenase. *Planta* **229**: 427-445.
- Stracke R, Ishihara H, Huel G, Barsch A, Mehrrens F, Niehaus K, Weisshaar B** (2007) Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling. *Plant J.* **50**: 660-677.
- Stuehr DJ** (1997) Structure-function aspects in the nitric oxide synthases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **37**: 339-359.
- Takahama U, Oniki T, Hirota S** (2002) Oxidation of quercetin by salivary components: Quercetin-dependent reduction of salivary nitrite under acidic conditions producing nitric oxide. *J. Agric. Food Chem.* **50**: 4317-4322.
- Takeda K, Fischer D, Grisebach H** (1988) Anthocyanin composition of *Sinapis alba*, light induction of enzymes and biosynthesis. *Phytochemistry* **27**: 1351-1353.
- Tatsuzawa F, Saito N, Seki H, Yokoi M, Yukawa T, Shinoda K, Honda T** (2004) Acylated anthocyanins in the flowers of *Vanda* (Orchidaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **32**: 651-664.
- Tayeh MA, Marletta MA** (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate: tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 19654-19658.
- Tegeder M, Rentsch D** (2010). Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Mol. Plant* **3**: 997-1011.
- Tewari RK, Kumar P, Kim S, Hahn E-J, Paek K-Y** (2009) Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalaenopsis* flower: an

- implication of NO in the senescence and oxidative stress regulation. *Plant Cell Rep* **28**: 267-279.
- Tobin AK, Yamaya T** (2001). Cellular compartmentation of ammonium assimilation in rice and barley. *Journal of Experimental Botany* **52**: 591-604.
- Thompson E, Wilkins C, Demidchik V, Davies JM, Glover BJ** (2010) An *Arabidopsis* flavonoid transporter is required for anther dehiscence and pollen development. *J. Exp. Bot.* **61**: 439-51.
- Tohge T, Nishiyama Y, Hirai MY, Yano M, Nakajima J, Awazuhara M, Inoue E, Takahashi H, Goodenowe DB, Kitayama M, Masaaki N, Mami Y, Kazuki S** (2005) Functional genomics by integrated analysis of metabolome and transcriptome of *Arabidopsis* plants over-expressing an MYB transcription factor. *Plant J* **42**: 218-235.
- Tossi V, Amenta M, Lamattina L, Cassia R** (2011) Nitric oxide enhances plant ultraviolet-B protection up-regulating gene expression of the phenylpropanoid biosynthetic pathway. *Plant Cell Environ.* **34**: 909-924.
- Treutter D** (2005) Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biology* **7**: 581-591.
- Tschoep H, Gibon Y, Carillo P, Armengaud P, Szecowka M, Nunes-Nesi A, Fernie AR, Koehl K, Stitt M** (2009) Adjustment of growth and central metabolism to a mild but sustained nitrogen-limitation in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* **32**: 300-318.
- Unkles SE, Wang R, Wang Y, Glass AD, Crawford NM, Kinghorn JR** (2004) Nitrate reductase activity is required for nitrate uptake into fungal but not plant cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 28182-28186.
- Valderrama R, Corpas FJ, Carreras A, Fernández-Ocaña A, Chaki M, Luque F, Gómez-Rodríguez MV, Colmenero-Varea P, Del Río LA, Barroso JB** (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett.* **3**: 453-61.
- van der Meer IM, Stam ME, van Tunen AJ, Mol JN, Stuitje AR** (1992) Antisense inhibition of flavonoid biosynthesis in petunia anthers results in male sterility. *Plant Cell* **4**: 253-262.

- Veit M, Pauli GF** (1999) Major flavonoids from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Journal of Natural Products* **62**: 1301-1303.
- Vidmar JJ, Zhuo D, Siddiqi MY, Schjoerring JK, Touraine B, Glass AD** (2000) Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* **123**: 307-318.
- Vogt T** (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Mol. Plant.* **3**: 2-20.
- Wade HK, Bibikova TN, Valentine WJ, Jenkins GI** (2001) Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* leaf tissue. *The Plant Journal* **25**: 675-685.
- Wang MY, Siddiqi MY, Ruth TJ, Glass A** (1993) Ammonium uptake by rice roots (II. Kinetics of $^{13}\text{NH}_4^+$ + influx across the plasmalemma). *Plant Physiology* **103**: 1259-1267.
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM** (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, and sulfate metabolism. *Plant. Physiol.* **132**: 556-567.
- Wang SX, Ellis BE** (1998) Enzymology of UDP-glucose:sinapic acid glucosyltransferase from *Brassica napus*. *Phytochemistry* **49**: 307-318.
- Weaver LM, Herrmann KM** (1997) Dynamics of the shikimate pathway in plants. *Trends in Plant Science* **2**: 346-351.
- Weber A, Flügge U-I** (2002) Interaction of cytosolic and plastidic nitrogen metabolism in plants. *Journal of Experimental Botany* **53**: 865-874.
- Wilkinson JQ, Crawford NM** (1993) Identification and characterisation of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Mol. Gen. Genet.* **239**: 289-297.
- Wilkinson TL, Douglas AE** (2003). Phloem amino acids and the host plant range of the polyphagous aphid, *Aphis fabae*. *Entomol. Exp. Appl.* **106**: 103-113.

- Winkel-Shirley B** (2001) Flavonoid biosynthesis: a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology* **126**: 485-493.
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 218-223.
- Winkel-Shirley BW, Kubasek WL, Storz G, Bruggemann E, Koornneef M, Ausubel FM, Goodman HM** (1995) Analysis of *Arabidopsis* mutants deficient in flavonoid biosynthesis. *The Plant Journal* **8**: 659-671.
- Wipf D, Ludewig U, Tegeder M, Rentsch D, Koch W, Frommer WB** (2002) Conservation of amino acid transporters in fungi, plants and animals. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 139-147.
- Wu X, Prior RL** (2005) Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry in common foods in the United States: vegetables, nuts, and grains. *J. Agric. Food. Chem.* **53**: 3101-3113.
- Xu YC, Zhao BL** (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**: 833-838.
- Yamasaki H, Sakihama Y** (2000). Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Lett.* **468**: 89-92.
- Yamasaki H, Sakihama Y, Shunichi T** (1999) An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Letters to Trends in Plant Science* **4**: 128-1299.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Matsuda F, Nakabayashi R, Takayama H, Niida R, Watanabe-Takahashi A, Inoue E, Saito K** (2008). Comprehensive flavonol profiling and transcriptome coexpression analysis leading to decoding gene-metabolite correlations in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 2160-2176.
- Yonekura-Sakakibara K, Tohge T, Niida R, Saito K** (2007) Identification of a flavonol 7-O-rhamnosyltransferase gene determining flavonoid pattern in *Arabidopsis* by

transcriptome coexpression and reverse genetics. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 14932-14941.

Zeevaart JA (2008) Leaf-produced floral signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 541-47.

Zeng X, Chow WS, Su L, Peng X, Peng C (2010) Protective effect of supplemental anthocyanins on *Arabidopsis* leaves under high light. *Physiologia Plantarum* **138**: 215-225.

Zemojtel T, Fröchlich A, Palmieri MC, Kolanczyk M, Mikula I, Wyrwicz LS, Wanker EE, Mundlos S, Vingron M, Martasek P, Durner J (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends in Plant Science* **11**: 524-525.

Zhang L, Tan Q, Lee R, Trethewey A, Lee Y-H, Tegeder M (2010). Altered xylem-phloem transfer of amino acids affects metabolism and leads to increased seed yield and oil content in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**: 3603-3620.