

SIMONE CESPEDES VITOR

“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA MODULADA POR ÓXIDO
NÍTRICO NA RESPOSTA DE DEFESA DE *ARABIDOPSIS*
THALIANA À BACTÉRIA *PSEUDOMONAS SYRINGAE*”

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

SIMONE CESPEDES VITOR

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA MODULADA POR ÓXIDO
NÍTRICO NA RESPOSTA DE DEFESA DE *ARABIDOPSIS
THALIANA* À BACTÉRIA *PSEUDOMONAS SYRINGAE*”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Simone Cespedes Vitor
Ione Salgado
e aprovada pela Comissão Juizadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Vegetal.

Orientadora: Profa. Dra. Ione Salgado

CAMPINAS,
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

V833a Vitor, Simone Cespedes, 1986-
Análise da expressão gênica modulada por óxido nítrico na resposta de defesa de *Arabidopsis thaliana* à bactéria *Pseudomonas syringae* / Simone Cespedes Vitor. – Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Ione Salgado.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Nitrato redutases. 2. Óxido nítrico. 3. Expressão gênica. 4. Fitopatologia. 5. *Arabidopsis thaliana*. 6. *Pseudomonas syringae*. I. Salgado, Ione, 1953-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês Analysis of gene expression modulated by nitric oxide in the defense response of *Arabidopsis thaliana* to the bacteria *Pseudomonas syringae*

Palavras-chave em Inglês:

Nitrate reductases

Nitric oxide

Gene expression

Phytopathology

Arabidopsis thaliana

Pseudomonas syringae

Área de concentração: Biologia Vegetal

Titulação: Mestra em Biologia Vegetal

Banca examinadora:

Ione Salgado [Orientador]

Marcelo Menossi Teixeira

Marília Gaspar

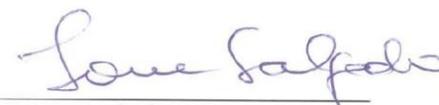
Data da defesa: 20-02-2013

Programa de Pós Graduação: Biologia Vegetal

Campinas, 20 de Fevereiro de 2013

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ione Salgado (Orientadora)



Assinatura

Prof. Dr. Marcelo Menossi Teixeira



Assinatura

Dra. Marília Gaspar



Assinatura

Profa. Dra. Anete Pereira de Souza

Assinatura

Dra. Marcia Regina Braga

Assinatura

**À minha família e ao meu
noivo, que são as pessoas
mais importantes da minha
vida, dedico esta dissertação.**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por permanecer ao meu lado sempre.

À minha família, meus pais e irmãos, quem amo muito e aos quais devo minha educação e minha vida.

À minha outra família, Zezé e Izabel, pelo carinho e cuidado paternais que dispensam a mim.

Ao Lucas, meu noivo, por ser meu melhor amigo e o amor da minha vida.

Aos caros colegas Uiara, Higor e Cris, pelas reuniões, pelos papos, risos e desaBAFOS. Tudo seria muito trágico se não fosse cômico, aliás, se não fosse por vocês.

À minha Professora Ione Salgado pela oportunidade e imprescindível orientação ao longo deste trabalho.

Ao Halley também por sua orientação e estímulo em todas nossas conversas, mas acima de tudo obrigada por ter se demonstrado um grande amigo.

À Elzira e à Jusceley, que além de todo o suporte técnico necessário para a realização dos experimentos, são verdadeiras amigas.

Aos amigos do laboratório, Lucas e Camila, pelas dicas e discussões, pela companhia no dia a dia do laboratório e também fora dele, como nos congressos e ocasiões especiais. Estendo os agradecimentos aos que não estão mais no laboratório, como o Plínio, mas que foram igualmente importantes.

Aos amigos da fisiologia vegetal por serem sempre bastante solícitos e em especial ao Diego e ao Luciano por terem contribuído diretamente para este trabalho.

À secretária Maria Roseli pela disponibilidade em ajudar a qualquer momento.

Ao Prof. Michel Vincentz pela importante colaboração e ao seu aluno "Jonhny" por me auxiliar nos experimentos de PCR em tempo real.

Ao Prof. Paulo Mazzafera, sua aluna Jullyana e à Juliana Mayer por ajudarem com as análises de lignina.

Aos Professores Anete, Marília e Sodek por haverem participado da minha qualificação e pré-banca.

Aos membros da minha banca de defesa pela disponibilidade e contribuição para o trabalho.

Ao CNPq e à FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que embora não citados contribuíram de alguma forma para este trabalho.

Por fim agradeço a você que me prestigia com sua leitura. Obrigada!

RESUMO

O NO é uma molécula sinalizadora versátil muito importante em diversos processos em plantas. Uma de suas principais atuações é na sinalização celular durante o processo de defesa contra o ataque de patógenos. Plantas de *Arabidopsis thaliana* do genótipo mutante *nia1 nia2*, deficientes para os dois genes estruturais que codificam para a enzima nitrato redutase (NR), são susceptíveis à bactéria *Pseudomonas syringae*. Foi sugerido que a resposta de defesa prejudicada no mutante NR-deficiente seria resultante de seus reduzidos níveis de NO, quando comparados àqueles do genótipo selvagem. Em um trabalho recente de nosso grupo, empregando microarranjo de DNA, foi observado que a fumigação com gás NO no mutante *nia1 nia2* foi capaz de modular diversos genes relacionados à defesa, alguns dos quais não previamente documentados como responsivos a esse radical. Neste trabalho se analisou por PCR em tempo real o efeito do gás NO na expressão de genes relacionados à defesa em plantas selvagem e no mutante *nia1 nia2* infectados com uma linhagem avirulenta da bactéria *P. syringae*. Genes de defesa, como *PR1*, foram induzidos pela bactéria e a expressão destes foi maior no genótipo selvagem quando comparado ao *nia1 nia2*, o que é consistente com a susceptibilidade do mutante. A fumigação com NO também modulou genes relacionados à biossíntese de lignina (*CAD1*) e à sinalização de auxina (*TIR1*, *ILL1*, *GH3*) e etileno (*ACCS7*). Análises de quantificação de lignina mostraram uma pequena redução desse composto no genótipo mutante em relação ao selvagem, além de uma diferença em sua composição. Ademais, a fumigação com NO atenuou a expressão de *PR1* e outros genes relacionados à via do ácido salicílico em plantas inoculadas e preveniu o crescimento bacteriano em folhas *nia1 nia2*. Já foi demonstrado que a inoculação do patógeno no mutante induz uma baixa produção de NO e no presente trabalho observou-se uma alta produção de H₂O₂ comparado ao selvagem. O H₂O₂ potencializou o efeito microbicida do NO fumigado na suspensão de bactéria. Os resultados sugerem que um efeito microbicida direto do NO, em conjunto com H₂O₂, pode resultar na atenuação da resposta de defesa na planta, reduzindo o gasto de energia associado à transcrição de genes relacionados à defesa.

ABSTRACT

NO is an important signaling and versatile molecule which plays important roles in many processes in plants. One of its main actions is in cell signaling during defense response against pathogen attack. *Arabidopsis thaliana* plants of the *nia1 nia2* mutant genotype, deficient in the two structural genes encoding for the enzyme nitrate reductase (NR), are susceptible to the avirulent bacteria *Pseudomonas syringae*. It has been suggested that the impaired defense response in the NR-deficient mutant would result from their low NO levels when compared to those of the wild type. Indeed, in a recent study from our group, it was observed through a DNA microarray that fumigation of *nia1 nia2* mutant with NO gas was able to modulate many genes related to defense, some of which not previously documented as responsive to this radical. In this work we analyzed by real-time PCR the effect of NO gas on the expression of genes related to defense in the wild type and *nia1 nia2* mutant infected with an avirulent strain of *Pseudomonas syringae*. Defense genes such as *PR1* were induced by the bacteria and its expression was higher in wild type when compared to *nia1 nia2*, which is consistent with the susceptibility of the mutant. NO fumigation also modulated genes related to the biosynthesis of lignin (*CAD1*) and the auxin (*Tir1*, *ILL1*, *GH3*) and ethylene pathways (*ACCS7*). Analysis of lignin showed a reduction of this compound in the mutant genotype compared to wild type, and a difference in its composition. In addition, fumigation with NO attenuated the expression of *PR1* and other genes related to salicylic acid signaling in infected plants and prevented bacterial growth in *nia1 nia2* leaves. Furthermore, pathogen infection is known to induce a low production of NO in *nia1 nia2* and here we also observed that there is a higher production of H₂O₂ in the mutant compared to the wild type. H₂O₂ potentiated the microbicidal effect of NO fumigated in bacterial suspensions. The results suggest that a direct microbicidal effect of NO, together with H₂O₂, may result in attenuation of the defense response in the plant, reducing energy expenditure associated with the transcription of genes related to defense.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELA e FIGURAS.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A resposta de defesa nas plantas	1
1.2 NO como uma molécula sinalizadora.....	4
1.3 Função do NO na resposta de defesa	6
1.4 Mutante <i>nia1 nia2</i> como modelo de estudo	8
2 OBJETIVOS	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Cultivo das plantas.....	11
3.2 Cultivo da bactéria, inoculação e análise dos sintomas	11
3.3 Análise do crescimento bacteriano nas folhas	12
3.4 Fumigação das plantas com o gás NO	12
3.5 Fumigação das suspensões bacterianas com o gás NO	12
3.6 Quantificação de H ₂ O ₂	14
3.7 Extração e análise de lignina	14
3.8 Cortes histológicos e testes histoquímicos para determinação da lignina	15
3.9 Construção dos primers	15
3.10 Extração de RNA	16
3.11 Síntese de cDNA e tratamento com DNase	16

3.12	Análise da expressão gênica por PCR em tempo real	17
3.13	Análise dos resultados	17
4	RESULTADOS	18
4.1	Construção dos primers	18
4.2	Análise inicial da expressão gênica	22
4.3	Análise da expressão de genes relacionados à patogênese (<i>PR1</i>)	26
4.4	Análise da expressão de genes do metabolismo secundário importantes para defesa: <i>PAL1</i> e <i>CAD1</i>	34
4.5	Análise da expressão de genes da via de transdução de sinal da auxina (<i>TIR1</i> , <i>ILL1</i> e <i>GH3</i>) e do etileno (<i>ACC57</i>)	42
5	DISCUSSÃO	47
6	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCS: 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintase

AGI ("Arabidopsis genome initiative"): Iniciativa genoma *Arabidopsis*

AOX ("alternative oxidase"): oxidase alternativa

CAD : cinamil-álcool desidrogenase

CCR : cinamoil-CoA resutase

cfu("colony-forming units"): unidades formadoras de colônia

C_t ("threshold cycle"): ciclo limiar

HR ("hypersensitive response"): resposta hipersensitiva

JA ("jasmonic acid"): ácido jasmônico

LOX: lipoxigenase

NIMIN ("NIM interacting protein"): proteína que interage com NIM

NiR: nitrito redutase

NO ("nitric oxide"): óxido nítrico

NOS ("nitric oxide synthase"): óxido nítrico sintase

NPR ("nonexpressor of pathogenesis-related (PR) genes"): não expressa genes relacionados à patogênese

NR: nitrato redutase

PAL ("phenylalanine ammonia lyase"): fenilalanina amonia liase

PAMPs ou MAMPs ("pathogen- or microbe-associated molecular patterns"): padrões moleculares associados a micróbios ou patógenos

PCR ("polymerase chain reaction"): reação da polimerase em cadeia

PRRs ("pattern recognition receptors"): receptores de reconhecimento de padrões

PRs ("pathogenesis-related proteins"): proteínas relacionadas à patogênese

Pst: *Pseudomonas syringae pv. tomato*

qPCR : PCR quantitativo

Rn ("normalized raw fluorescence"): fluorescência normalizada bruta

RNS ("reactive nitrogen species"): espécies reativas de nitrogênio

ROS ("reactive oxygen species"): espécies reativas de oxigênio

SA ("salicylic acid"): ácido salicílico

SABP ("salicylic acid binding protein"): proteína ligante de ácido salicílico

SAR ("systemic acquired resistance"): resistência sistêmica adquirida

WT ("wild-type"): tipo selvagem

LISTA DE TABELA e FIGURAS

Tabela 1: Nome, seqüência e características dos primers construídos para realização dos experimentos de PCR em tempo real.....	19
FIGURA 1: Esquema representativo da redução de NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related (PR1) genes) no citossol e sua translocação para o núcleo. ...	8
FIGURA 2: Câmara de fumigação construída no laboratório para o tratamento das plantas com o gás NO.....	13
FIGURA 3: Esquema ilustrando todos os tratamentos aos quais as plantas dos genótipos selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> foram submetidas.....	13
FIGURA 4: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, de genes potencialmente regulados pelo NO durante a resposta do mutante <i>nia1 nia2</i> à bactéria <i>Pseudomonas syringae</i>	23
FIGURA 5: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, de genes de <i>Arabidopsis thaliana</i> do genótipo selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> não infectadas e tratadas com o gás NO (60 ppm) ou apenas com ar comercial por 12 horas.....	25
FIGURA 6: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, do gene <i>PR1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> nos genótipos selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i>	27
FIGURA 7: Efeito da fumigação com o gás NO no crescimento de Pst em folhas de plantas <i>nia1 nia2</i>	29
FIGURA 8: Efeito da fumigação com gás NO nos sintomas macroscópicos e crescimento bacteriano em folhas <i>nia1 nia2</i> infectadas com Pst e no crescimento de suspensões de Pst.	30
FIGURA 9: Quantificação de H ₂ O ₂ ao longo do tempo em folhas de plantas selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> inoculadas com a bactéria <i>P. syringae</i>	33
FIGURA 10: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, do gene <i>PAL1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> nos genótipos selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> ao longo do tempo.	35

FIGURA 11: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, da <i>CAD1</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> e esquema da via de biossíntese de lignina.	36
FIGURA 12: Quantificação de lignina total em folhas de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> determinada com ácido tioglicólico.	37
FIGURA 13: Secções transversais de pecíolos de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> coradas para lignina utilizando o corante azul de toluidina.	40
FIGURA 14: Secções transversais de bases de caules maduros de <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> coradas para lignina utilizando o reagente Maüle.....	41
FIGURA 15: Expressão relativa de genes da via de transdução de sinais da auxina em <i>A. thaliana</i>	43
FIGURA 16: Esquema representativo da via de transdução de sinal da auxina.	44
FIGURA 17: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, do gene <i>ACCS7</i> em <i>Arabidopsis thaliana</i> selvagem e mutante <i>nia1 nia2</i> e esquema da via de biossíntese de etileno.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 A resposta de defesa nas plantas

As plantas desenvolveram complexos mecanismos de defesa para responderem ao ataque dos diversos tipos de patógenos. Diferentemente dos animais, as plantas não possuem um sistema circulatório com células de defesa especializadas na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), como os macrófagos, e células de memória, como os linfócitos. Contudo no decorrer do processo evolutivo surgiram mecanismos de imunidade nas plantas que incluem o aumento da produção de ROS e óxido nítrico (NO) em resposta ao ataque de patógenos e o estabelecimento de resistência sistêmica adquirida (SAR), mediada pelo ácido salicílico (SA), que imuniza a planta, de um modo geral, contra uma nova infecção. As plantas também contam com uma ampla variedade de mecanismos de defesa induzidos, tal como a modulação da expressão de genes relacionados à defesa, a produção de compostos com atividade antimicrobiana como fitoalexinas, além de mecanismos não induzidos, como a proteção de barreiras físicas e químicas pré-formadas (van Loon et al. 2006b).

Toda planta é dotada do aparato molecular necessário para conter um patógeno em potencial. Para que estas respostas sejam desencadeadas é necessário o reconhecimento do patógeno pela planta, a qual possui receptores específicos que podem ser divididos em dois tipos. O primeiro mecanismo de reconhecimento funciona através de receptores de reconhecimento transmembrana (PRRs) que identificam organismos microbianos e padrões moleculares microbianos (MAMPs ou PAMPs) (Boller and He 2009), como a flagelina, por exemplo, comum a mais de uma espécie de patógeno. Esse reconhecimento leva a mecanismos de reconhecimento basal. Alguns patógenos, por sua vez, evoluíram no sentido de driblar esse reconhecimento da planta e desenvolveram um sistema para ejetar proteínas efetoras diretamente no interior da célula vegetal (Jones and Dangl 2006). Na resposta de defesa de *A. thaliana* à bactéria *P. syringae* a proteína efetora mais estudada e conhecida é a AvrRpt2. Essa proteína uma vez dentro da célula é capaz de suprimir as defesas basais do hospedeiro e alterar seu metabolismo em benefício do patógeno, o que evoluiu para o desenvolvimento da

doença e a susceptibilidade da planta. Contudo, algumas plantas coevoluíram de modo a expressar receptores celulares internos capazes de reconhecer essas proteínas efetoras providas do patógeno. Assim, ocorre o segundo tipo de reconhecimento do patógeno por parte da planta, a qual é capaz de desencadear seus mecanismos de defesa e se tornar resistente. A partir de então a célula hospedeira desencadeia uma cascata de transdução de sinais que resulta na modulação da transcrição gênica que aciona mecanismos de defesa (Kunkel et al. 1993). Esse tipo de interação é o que podemos chamar de uma interação incompatível entre planta e patógeno. Quando a proteína efetora da bactéria ou o gene de resistência da planta faltarem haverá uma interação compatível na qual ocorrerá o desenvolvimento da doença (Kazan and Manners 2009). Um exemplo de genes, cuja expressão é induzida após esse tipo de reconhecimento, são os genes relacionados à patogênese (*PRs*). A síntese de proteínas *PRs* é responsável pela rápida ativação da resposta de defesa. Atualmente, são conhecidas 17 famílias de proteínas *PRs* (PR-1 a PR-17) que são expressas em resposta a patógenos. A expressão dos diferentes genes *PR* e de membros de cada família *PR* é dependente do sinal indutor da resposta de defesa (Van Loon et al. 2006). Dentre as proteínas sintetizadas estão algumas quitinases, peroxidases e β -glucanases (De Wit 2007).

Após o reconhecimento do patógeno em potencial, uma série de mecanismos de defesa é disparada, tais como a mudança no estado redox da célula (Lamb and Dixon 1997). Ocorre o aumento de NO e ROS paralelamente que levam ao desenvolvimento da Resposta Hipersensitiva (HR). Essa resposta consiste na morte celular programada de células vegetais no local da infecção de modo a conter a progressão do patógeno (Mur et al. 2008). Sabe-se que as NADPH oxidases são responsáveis pela produção de ROS no apoplasto durante a resposta de defesa. A produção de ROS também pode resultar do desacoplamento mitocondrial e da inibição da fotossíntese. Ainda, algumas peroxidases externas e de parede também contribuem para o “burst” oxidativo durante a resposta de defesa (revisado por Yun et al. 2012). Por sua vez os mecanismos de produção de NO durante a resposta de defesa são ainda controversos (Loake 2001; Hong et al. 2008), conforme será discutido adiante.

Alguns produtos do metabolismo secundário também são importantes na defesa das plantas como as fitoalexinas, moléculas de baixo peso molecular com ação antimicrobiana (Ahuja et al. 2012) e a lignina que constitui uma barreira física resistente que pode conter a entrada do patógeno (Vorwerk et al. 2004). A lignina, assim como várias fitoalexinas, é um importante produto da via dos fenilpropanóides que tem a fenilalanina amônia liase (PAL) como a primeira enzima atuante da via de síntese (Besseau et al. 2007).

Os hormônios vegetais também são componentes fundamentais no estabelecimento das vias de sinalização de defesa em resposta a vários estresses bióticos e abióticos (Bari and Jones 2009; Robert-Seilaniantz et al. 2011) e vêm sendo descritas mudanças nos níveis de vários fitormônios em resposta a infecção da planta com diversos patógenos (Adie et al. 2007; Robert-Seilaniantz et al. 2007).

O acúmulo de ácido salicílico (SA) leva a resistência contra patógenos biotróficos ou hemibiotróficos. A indução basal de resistência no local da infecção também pode se estender para tecidos da planta distantes da região de invasão do patógeno, de modo a prevenir uma futura infecção (SAR) e esse processo é mediado por SA (Ryals et al. 1996).

Além do SA, o ácido jasmônico (JA) e etileno também são conhecidos como hormônios de defesa, além de atuar em uma série de processos do desenvolvimento. Outros hormônios tais quais giberelinas, auxinas e brassinosteróides, comumente reconhecidos como “reguladores de crescimento”, também atuam no processo de defesa da planta (Yamada 1993; Robert-Seilaniantz et al. 2007; Navarro et al. 2008). Já se mostrou, por exemplo, que a inibição da via de sinalização da auxina pode aumentar a resistência de *A. thaliana* contra *P. syringae* (Navarro et al. 2006). De fato, as vias da auxina e do SA atuam de forma antagônica durante a defesa da planta (Kazan and Manners 2009). O SA causa uma repressão global de genes relacionados à auxina, incluindo o gene receptor *TIR1*, resultando na estabilização de proteínas do repressor Aux/IAA e inibição da via de sinalização da auxina como sendo uma parte do mecanismo de resistência mediado por SA (Wang et al. 2007).

Em resumo, a indução de resistência é um mecanismo basal de defesa constituída pela percepção do patógeno e produção de efetores acionados pelo

hospedeiro em resposta a invasão. O desenvolvimento da resistência ou o estabelecimento da doença dependem da eficiência no reconhecimento e indução das respostas de defesa pelo hospedeiro contra o microrganismo invasor (Ryals et al. 1996; Durrant and Dong 2004; Spoel and Dong 2012). A célula vegetal é totalmente reprogramada durante a infecção para priorizar sua defesa ao invés de seu funcionamento normal. A análise da variação da expressão gênica em plantas resistentes e susceptíveis durante o processo de defesa consiste em uma ferramenta que pode ser utilizada para melhor compreender os mecanismos moleculares envolvidos na resposta de defesa das plantas.

1.2 NO como uma molécula sinalizadora

O NO é um radical livre gasoso envolvido em uma vasta série de processos biológicos em vários organismos. Sua ação como molécula sinalizadora foi primeiramente demonstrada em mamíferos como um fator de relaxamento de células musculares com os trabalhos de Furchgott, Murad e Ignarro (Arnold et al. 1977; Furchgott and Zawadzki 1980; Ignarro et al. 1987). Posteriormente os trabalhos nessa área foram intensificados e o papel dessa molécula como sinalizadora foi constatado em inúmeros outros processos fisiológicos como o controle da pressão sanguínea, a contração muscular, a atividade neuronal e a resposta imune (revisado por Gao 2010). Também foi demonstrado que o NO está envolvido em inúmeros processos da fisiologia vegetal, tais quais: a germinação de sementes, o crescimento de raízes, a expansão foliar, o movimento estomático, a floração, o crescimento do tubo polínico e a senescência foliar (revisado por Lamattina et al. 2003; del Río et al. 2004; Wilson et al. 2008). Além do seu papel fundamental em vias de transdução de sinais durante o crescimento e desenvolvimento vegetal, o NO também atua na resposta contra estresses bióticos e abióticos entre eles a resposta a estresses mecânicos, a proteção contra a radiação ultravioleta, a aclimação ao frio e a defesa ao ataque de patógenos (revisado por Mur et al. 2006; Qiao and Fan 2008).

Essas múltiplas ações do NO nos organismos vivos se devem às suas propriedades físico-químicas que o tornam uma molécula bastante flexível capaz de

atuar em diferentes sistemas biológicos. O NO é um radical livre gasoso sem carga elétrica, com uma meia-vida relativamente longa (aproximadamente 5 s) se comparada a de outros radicais (Stamler et al. 1992). Como uma das menores moléculas diatômicas, ele é altamente difusível e capaz de migrar facilmente por compartimentos hidrofóbicos e hidrofílicos das células como as membranas e o citossol (Stamler et al. 1992).

Um dos principais mecanismos responsáveis por essas ações do NO é a modificação pós traducional de proteínas (revisado por Leitner et al. 2009). Essas modificações incluem a formação de complexos nitrosil com metais de transição (Cooper 1999), a nitrosilação de resíduos de cisteína (Spoel and Loake 2011) e a nitração de resíduos de tirosina (Cecconi et al. 2009), as quais podem levar a uma regulação da atividade protéica. Isso ocorre, por exemplo, com a enzima guanilato ciclase, em que a nitrosilação de seu grupamento heme estimula a produção de GMP cíclico, um importante mensageiro secundário em diversos tipos celulares (Stamler 1994; Durner et al. 1998).

O NO, além de realizar modificações pós traducionais que regulam a atividade protéica, também participa da regulação da expressão gênica. Isso é possível porque a nitrosilação modifica proteínas diretamente relacionadas com controle da expressão gênica, como os fatores de transcrição. Conforme demonstrado por análises transcriptômicas em larga escala, o NO é capaz de modular a expressão de genes relacionados a transdução de sinal, a resposta a estresses, o transporte celular e o metabolismo básico (Parani et al. 2004; Ferrarini et al. 2008; Palmieri et al. 2008).

Ao atuar no controle da expressão gênica ou da atividade de proteínas, o NO atua como intermediário ou efetor na via de transdução de sinal de diversos hormônios vegetais (revisado por Lamattina et al. 2003). Em trabalho pioneiro realizado por nosso laboratório (Gouvêa et al. 1997), foi proposta a participação do NO na via de sinalização da auxina durante a indução do crescimento de segmentos de raízes de milho. O NO também foi demonstrado como sendo um intermediário no fechamento estomático induzido por ácido abscísico (Desikan et al. 2002) e nas respostas às citocininas (Tun et al. 2008). Por outro lado, o NO parece ter um efeito negativo sobre a via de sinalização do etileno, inibindo a síntese desse hormônio durante a maturação do fruto (Leshem et

al. 1998). Essa incrível habilidade do NO em interagir de diferentes maneiras com alvos distintos na célula pode explicar os papéis múltiplos desse radical em sistemas biológicos. Por essa razão, o interesse no estudo do NO como uma molécula sinalizadora em plantas tem aumentado exponencialmente nos últimos anos, trazendo novas perspectivas a diversos aspectos da (pato)fisiologia e do metabolismo vegetal.

1.3 Função do NO na resposta de defesa

Além dos hormônios vegetais outras moléculas têm papel importante na defesa das plantas. O NO, por exemplo, tem como uma de suas principais funções em vegetais desempenhar papel sinalizador durante a resposta de defesa ao ataque de diversos tipos de patógenos. Alguns trabalhos observaram que a redução dos níveis de NO *in planta*, obtida por diversas estratégias, leva a uma resposta de defesa deficiente (Zeidler et al. 2004; Zeier et al. 2004; Boccara et al. 2005; Modolo et al. 2006). Esses trabalhos sugeriram o envolvimento do NO nas vias de sinalização da resistência vegetal ao ataque patogênico.

O óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) têm papel essencial na imunidade inata da planta por atuarem na indução da resposta hipersensitiva da planta (HR). Foi mostrado que somente o NO ou H₂O₂ individualmente não induzem morte celular, mas que a ação conjunta dessas duas moléculas é fundamental para indução da resposta (Delledonne et al. 1998) e que uma produção balanceada de NO e H₂O₂ é fundamental para a indução da morte celular na HR (Delledonne et al. 2001).

O NO pode atuar também regulando a expressão de diversos genes envolvidos na resposta de resistência vegetal contra patógenos (Delledonne et al. 1998; Durner et al. 1998; Parani et al. 2004; Zeier et al. 2004; Ferrarini et al. 2008). Dentre os genes induzidos por NO, encontram-se aqueles que codificam isoformas da fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS), enzimas chave da via de síntese dos fenilpropanóides (Delledonne et al. 1998; Zeier et al. 2004). Contudo, os mecanismos de regulação dessas moléculas e suas funções na resposta de defesa da planta não estão ainda totalmente esclarecidos. Alguns trabalhos vêm mostrando que a via de sinalização de NO e ROS compreende modificações pós-traducionais em resíduos de

cisteína de proteínas (Sokolovski and Blatt 2004; Feechan et al. 2005; Tada et al. 2008; Yun et al. 2011). Dentre as modificações destacam-se a formação de pontes dissulfeto, S-nitrosilação (ligação covalente com o óxido nítrico) e S-glutationilação (ligação dissulfeto da glutathione) (Kim et al. 2002). Dessa forma os fatores de transcrição conseguem perceber mudanças no estado de oxidação da célula e ativam a transcrição de genes, como no caso da resposta de defesa em que os níveis de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são aumentados (Spoel et al. 2010).

Um exemplo de como o estado redox pode controlar a transcrição de genes baseado na modificação de cisteínas é no caso das PRs (Figura 1). O oligômero NPR1 (non expressor pathogenesis related), na ausência de SA, se encontra normalmente no estado polimerizado no citoplasma da célula. O SA provoca uma mudança no estado redox da célula (Mou et al. 2003) e os oligômeros são liberados no citoplasma que por sua vez atingem o núcleo e interagem com fatores de transcrição TGA responsáveis por reprimir a transcrição de genes, induzindo assim a expressão das proteínas PRs (Fan and Dong 2002). Recentemente, foi demonstrado que a S-nitrosilação de NPR1 na Cys156 facilita a oligomerização mediada por pontes dissulfeto, enquanto que a tioredoxina (TRX) promove a redução das pontes S-S liberando os monômeros de NPR1 e ambas, a oligomerização facilitada por SNO como a monomerização mediada por TRX, são necessárias para o estabelecimento da resistência a doença (Tada et al. 2008). Além disso, fatores de transcrição TGA também contêm resíduos de Cys formando dissulfetos que impedem a interação com NPR1. A redução de dissulfetos em TGA e subsequente S-nitrosilação (SNO) e S-glutationilação (S-SG) protegem TGA de oxidação adicional e permite-lhe interagir com o monômero de NPR1 reduzido no núcleo aumentando a sua atividade de ligação em promotores SA-responsivos (Spoel e Loake 2011), ativando a expressão dos genes de defesa, para produzir proteínas PR. Além de NPR1 outras moléculas envolvidas com a resposta de defesa são S-nitrosiladas como as atRBOHs, peroxiredoxinas e SABP3 (Romero-Puertas et al. 2007; Wang et al. 2009; Yun et al. 2011).

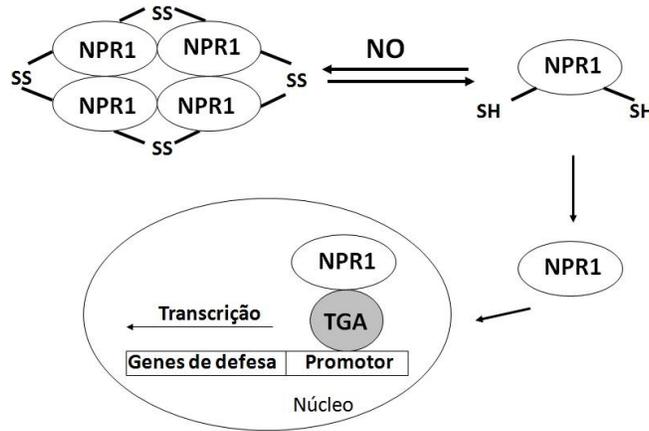


FIGURA 1: Esquema representativo da redução de NPR1 (nonexpressor of pathogenesis-related (PR1) genes) no citossol e sua translocação para o núcleo.

Sob o ataque de patógenos o oligômero de NPR1 é reduzido e o seu monômero NPR1 é translocado para o núcleo da célula onde interage com fatores de transcrição e ativa a transcrição de genes alvo. O NO é importante na regulação da conformação NPR1 oligômero/monômero e na ativação do fator de transcrição TGA (Adaptado de Spoel et al 2010).

1.4 Mutante *nia1 nia2* como modelo de estudo

O mecanismo de síntese de NO em plantas é ainda controverso. Em mamíferos é bem estabelecido que a principal via de síntese de NO se dá pela óxido nítrico sintase (NOS), cujas isoformas catalisam a oxidação de L-arginina para L-citrulina (Alderton et al. 2001). Entretanto um gene com homologia às NOS de origem animal ainda não foi descrito em plantas superiores (Gupta et al. 2011). Além da L-arginina, diversos mecanismos de síntese de NO a partir de NO_2^- têm sido propostos, incluindo processos não enzimáticos como sua redução nas condições ácidas do apoplasto (Bethke et al. 2004). Dentre os mecanismos enzimáticos, foi proposta a atividade redutora de NO_2^- da nitrato redutase (NR), que reduziria o NO_2^- a NO (Yamasaki and Sakihama 2000). Entretanto, a eficiência desta reação é muito baixa e requer baixa tensão de oxigênio e altos níveis de nitrito (Yamasaki and Sakihama 2000, Rockel et al. 2002). A observação de que, mesmo plantas de *Arabidopsis thaliana* duplo-deficientes para NR (*nia1 nia2*)

eram capazes de produzir NO quando nitrito era exogenamente fornecido a extratos foliares levou à proposição de que o papel da NR na síntese de NO seria o fornecimento de nitrito (Modolo et al. 2005). Ainda, a importância da NR para a produção de NO durante a resposta de defesa foi demonstrada quando se observou que o mutante *nia1 nia2* apresenta uma baixa emissão de NO e a resposta hipersensitiva (HR) prejudicada, sendo suscetível à bactéria *Pseudomonas syringae* (Modolo et al. 2005, Modolo et al. 2006). Ainda, quando folhas de *nia1 nia2* são infiltradas com nitrito, a emissão de NO é aumentada e a HR é restaurada (Modolo et al. 2006).

A principal atividade da NR é catalisar a redução do NO_3^- a NO_2^- , o qual é posteriormente reduzido a amônio (NH_4^+) pela nitrito redutase (NiR). O amônio por sua vez é posteriormente incorporado em aminoácidos, o que torna a NR uma proteína essencial para a assimilação de nitrogênio nas plantas (Lea 1993). De forma interessante o tratamento de *nia1 nia2* com glutamina mantém os níveis de aminoácidos em relação ao selvagem e o mutante permanece susceptível, excluindo assim a possibilidade da deficiência do metabolismo de nitrogênio haver acarretado a susceptibilidade da planta (Oliveira et al., 2009).

Resultados prévios mostraram que o tratamento de plantas *nia1 nia2* infectadas com a bactéria *Pseudomonas syringae* e fumigadas com o gás NO reduziu o crescimento bacteriano e os sintomas da infecção como a clorose (de Oliveira, 2010). Além disso, uma análise transcriptômica em larga escala utilizando microarranjos de DNA indicou vários genes regulados por NO (de Oliveira, 2010). Diante desses resultados considerou-se importante analisar com mais detalhes o efeito da fumigação das plantas *nia1 nia2* com o gás NO na expressão gênica e na resposta de defesa.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho de mestrado teve como objetivo principal avaliar a importância da produção de óxido nítrico (NO), dependente da atividade da nitrato redutase (NR), no mecanismo de resistência de plantas a doenças. Especificamente, foi analisado o efeito do tratamento com o gás NO na expressão gênica e no processo de defesa de plantas selvagem e do mutante duplo-deficiente para a nitrato redutase (*nia1 nia2*) de *A. thaliana* quando inoculado com a bactéria *P. syringae*.

Para tanto as seguintes abordagens foram realizadas:

- Avaliar por PCR em tempo real o efeito da fumigação com NO na expressão diferencial de genes potencialmente relacionados à defesa em folhas *nia1 nia2* infectadas com *P. syringae* selecionando alguns genes para posterior análise.
- Comparar a expressão dos genes selecionados em resposta à inoculação e ao NO, na planta selvagem e na mutante. Avaliar o efeito da concentração de NO e do tempo de exposição ao gás e à bactéria na expressão de alguns dos genes selecionados.
- Verificar os efeitos fenotípicos do tratamento com gás NO na resposta de defesa de *nia1 nia2*, incluindo os sintomas macroscópicos e o crescimento bacteriano nas folhas.
- Avaliar o efeito da infecção com a bactéria *P. syringae* na produção de H₂O₂ nas folhas dos dois genótipos e avaliar o efeito microbicida do H₂O₂ e do NO na cultura bacteriana.
- Analisar o teor e composição de lignina em folhas e caules de plantas de *A. thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cultivo das plantas

Foram utilizadas plantas de *Arabidopsis thaliana* L. ecótipo Columbia-0 dos genótipos selvagem e mutante duplo-deficiente para os genes *NIA1* e *NIA2* da enzima NR (mutante *nia1 nia2*), obtido por Wilkinson e Crawford (1993). As sementes foram germinadas em vermiculita:perlita (1:1) e mantidas em uma câmara de crescimento com fotoperíodo de 12 h de luz e 12 h de escuro, intensidade de luz de aproximadamente 80 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e temperatura controlada de 24°C. As plantas foram irrigadas três vezes por semana com meio contendo os macronutrientes KH_2PO_4 (5 mM), NH_4NO_3 (2,5 mM), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,5 mM), MgSO_4 (1mM), CaCl_2 (0.5 mM) e KCl (10 mM), e os micronutrientes descritos por Wilkinson e Crawford (1991). Para a recuperação dos níveis de aminoácidos, plantas *nia1 nia2* foram cultivadas com o mesmo meio contendo glutamina (10 mM). No caso de plantas do genótipo selvagem, KCl foi substituído por KNO_3 (10 mM), conforme Oliveira e colaboradores (2009). Plantas com 5 a 6 semanas de idade foram utilizadas nos experimentos.

3.2 Cultivo da bactéria, inoculação e análise dos sintomas

A linhagem da bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000, que carrega o gene de avirulência *AvrB*, foi cultivada em meio B de King sólido contendo rifampicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e kanamicina (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a uma temperatura de 28°C. Após 48 horas, a bactéria foi ressuspensa em MgCl_2 (10 mM) a concentração desejada de 5×10^6 cfu.mL⁻¹. Para a análise dos sintomas, a suspensão bacteriana foi infiltrada apenas em metade da superfície abaxial das folhas, utilizando uma seringa sem agulha. O acompanhamento dos sintomas macroscópicos foi registrado com uma câmera Sony DSC-W150 após 24 h de infecção. Para a extração de RNA e demais análises, toda a folha foi infiltrada com a suspensão bacteriana. Inoculações com MgCl_2 foram realizadas como controles.

3.3 Análise do crescimento bacteriano nas folhas

O crescimento bacteriano em folhas de *A. thaliana* foi estimado 12 e 24 horas após a inoculação homogeneizando em água discos foliares de áreas inoculadas. Após centrifugação, o sobrenadante foi plaqueado, a diferentes diluições, em meio B de King contendo os antibióticos apropriados. As colônias foram contadas 2-3 dias após o plaqueamento.

3.4 Fumigação das plantas com o gás NO

O tratamento com o NO gasoso foi realizado em uma câmara de fumigação, de acrílico (Trevisan Tec. LTDA), devidamente lacrada com uma tampa transparente contendo um tubo para entrada e outro para saída de gases (Figura 2). O gás NO (200 ppm diluído em N₂) e o ar comercial foram obtidos da Linde gases LTDA. O fluxo total de gases foi de 300 mL.min⁻¹ e este foi medido com o auxílio de um bolhômetro. Para o tratamento com NO foram mantidos fluxos apropriados de NO e ar comercial com o objetivo de obter as concentrações desejadas de NO (10 ou 60 ppm). Plantas fumigadas somente com ar comercial foram utilizadas como controle. Todo o procedimento foi realizado no interior de uma capela. Na figura 3 é possível visualizar o esquema dos tratamentos realizados com os dois genótipos: selvagem e mutante.

3.5 Fumigação das suspensões bacterianas com o gás NO

Suspensões bacterianas ($A_{600} = 0,05$) em meio de cultura líquido contendo os antibióticos apropriados foram mantidas num “erlenmeyer” a 25°C sob agitação constante a 150 rpm. A exposição a uma atmosfera de 60 ppm de NO se deu pelo borbulhamento de um fluxo contínuo de 90 mL.min⁻¹ de gás NO diluído e 210 mL.min⁻¹ de ar comercial diretamente na suspensão bacteriana. Em experimentos controle, um fluxo total de 300 mL.min⁻¹ de ar comercial puro foi borbulhado. O crescimento bacteriano foi acompanhado após 12 horas pela medida da absorbância a 600 nm.



FIGURA 2: Câmara de fumigação construída no laboratório para o tratamento das plantas com o gás NO.

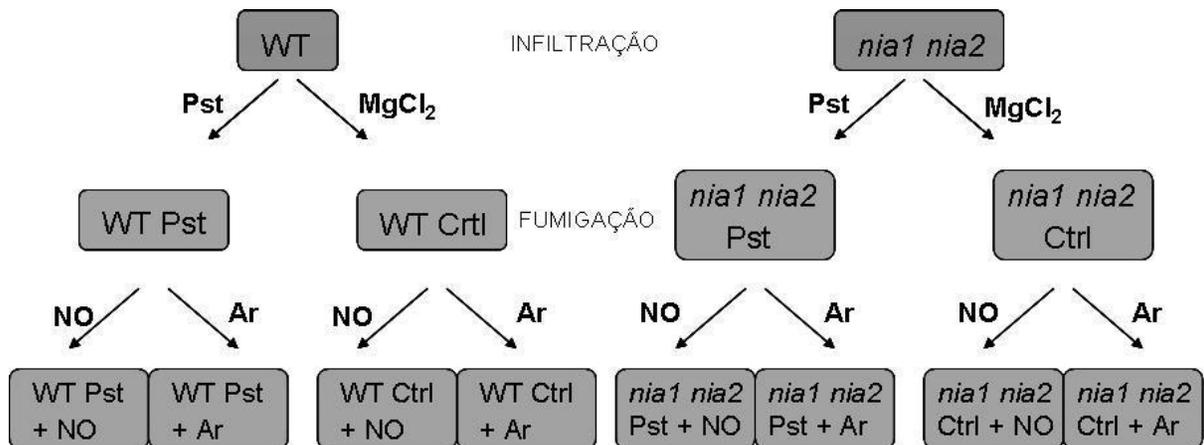


FIGURA 3: Esquema ilustrando todos os tratamentos aos quais as plantas dos genótipos selvagem e mutante *nia1 nia2* foram submetidas.

3.6 Quantificação de H₂O₂

A quantificação dos níveis de H₂O₂ nas células seguiu a metodologia descrita por Gay et al. (1999) e Hermes-Lima et al. (1995), com algumas modificações. O método baseia-se na oxidação do Fe²⁺ pelo H₂O₂ a Fe³⁺ em pH ácido, resultando na formação de complexos entre Fe³⁺ e o xilenol orange (XO) (Hermes-Lima et al. 1995). Após a exposição das plantas aos diferentes tratamentos, foi realizada a extração de 300mg de folhas em metanol a 0°C, na relação 1:5 (w/v) de mg de amostra para µL de metanol. Após a maceração em almofariz, as amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 5 minutos. Foi retirada uma alíquota de 100µL do sobrenadante, à qual foram adicionados 500µL de FeSO₄ 1mM e 200µL de H₂SO₄ 250mM. A mistura permaneceu em reação por 5 minutos sob condições de escuro. A seguir, adicionou-se 100µL de xilenol orange 1mM e a mistura foi novamente levada à condição de escuro por 20 minutos. O H₂O₂ presente nas amostras doa elétrons para o Fe e esse por sua vez liga-se ao xilenol formando um composto roxo. Os complexos (Fe-XO) foram formados durante um tempo de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 560 nm. Foi realizada uma curva padrão com concentrações conhecidas de H₂O₂: 0; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5 e 15µM H₂O₂.

3.7 Extração e análise de lignina

A dosagem de lignina foi realizada a partir do ácido tioglicólico de acordo com Barber & Ride (1988). Este ácido reage com a lignina na presença de HCl diluído formando o ácido ligno-tioglicólico (LTGA). O componente principal da lignina que participa desta reação é o álcool benzílico (reação de substituição nucleofílica). Para isso, 0,5 g de folhas, previamente macerado e liofilizado, foi homogeneizado com 1,5 mL de etanol 99,5% e em seguida centrifugado a 10.000 rpm por 15 min. Os precipitados secaram a temperatura ambiente e depois foram homogeneizados com 1,5 mL de água destilada e centrifugados a 12.000 rpm por 5 min. O precipitado foi seco novamente em estufa a 65°C e a 15 mg deste precipitado foram adicionados 1,5 mL de uma solução de 98% de ácido tioglicólico em HCL 2N (1: 10, v/v).

A solução permaneceu em banho-maria a aproximadamente 100° C por 4 h. Em seguida foi resfriada em gelo e centrifugada a 12.000 rpm por 10 min. O precipitado foi lavado com 1,5 mL de água destilada e centrifugado novamente a 10.000 rpm por 10 min. O precipitado foi solubilizado em 1,5 mL de NaOH 0,5N. Esta solução permaneceu sob agitação a 150 rpm na temperatura ambiente, por 12 horas para depois ser centrifugada (10.000 rpm por 10 min). Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de HCL concentrado. Após 4 horas em uma camara fria foi realizada uma última centrifugação (10.000 rpm por 10 min), o precipitado foi solubilizado em 2mL de NaOH 0,5N. A lignina obtida por ácido tioglicólico (TGA) teve sua absorbância lida em 280 nm e a concentração de LTGA foi expressa em mg/kg de tecido foliar seco utilizando-se lignin, alkali, 2- hydroxypropyl ether (Sigma-Aldrich) na construção da reta padrão.

3.8 Cortes histológicos e testes histoquímicos para determinação da lignina

Pecíolos de *A. thaliana* foram fixados em FAA₅₀ formaldeído / ácido acético/ etanol 50% (1:1:18, v/v/v) por 24 h, posteriormente desidratados em séries graduais de etanol (1h em etanol 50% e 24h em etanol 70%) e álcool butílico (48h em AB 70%, 85%, 95% e 100%) e embebidos em historesina. Foram feitas secções de 7 µm de espessura, utilizando um micrótomo. As secções foram coradas com azul de toluidina para marcar lignina, cuja coloração azul escura é alterada para azul piscina, mais claro, em testes positivos para lignina (Sakai 1973). Para determinar a composição da lignina cortes feitos a mão de material não fixado na base de caules maduros de *A. thaliana* foram corados com o reagente Maüle (Chen et al. 2002). As fotografias foram tiradas usando um microscópio Olympus BX51 com uma câmera Olympus DP71 acoplada.

3.9 Construção dos primers

As seqüências dos genes de interesse foram obtidas no “The Arabidopsis Information Resource” (<http://www.arabidopsis.org/>). Os primers específicos para os genes foram construídos com o auxílio dos programas Primer-BLAST e Gene Runner 3.05 (Hastings Software). Os primers foram construídos na região 3' do gene, com um

tamanho de 18 a 22 pares de bases e Tm entre 60 e 64°C, evitando-se primers cujas sequências poderiam formar estruturas secundárias.

3.10 Extração de RNA

Para a extração do RNA total, aproximadamente 100 mg de folha da roseta de plantas de cerca de 35 dias de idade foram coletados e imediatamente congelados em N₂ líquido. As amostras foram rapidamente maceradas e o RNA extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen) segundo as informações do fabricante. O RNA foi quantificado por meio de um Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technology) e sua pureza avaliada usando as razões A260/280. A integridade do RNA extraído foi avaliada utilizando um gel de agarose (1,2 %) desnaturante com formaldeído (0,85 M).

3.11 Síntese de cDNA e tratamento com DNase

O cDNA foi sintetizado utilizando o ImProm II Reverse Transcriptase System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para a análise de expressão de genes, cujos primers encontram-se no meio do éxon, o RNA foi previamente tratado com a DNase I Amplication Grade (Invitrogen) a fim de se eliminar DNA genômico. Todos os ensaios foram realizados na presença da RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen). Para síntese de cDNA, a reação de transcrição reversa foi realizada de acordo com o seguinte protocolo: a 1 µg de RNA foram adicionados 1,5 µL de oligo dT(18) 100 µM e água tratada com DEPC para um volume de 13,5 µL, sendo incubados a 70°C por 10 min para desnaturação do RNA. Em seguida, as amostras foram incubadas em gelo, sendo 11,5 µL da seguinte proporção de reagentes adicionados: 2 µL água tratada com DEPC, 3 µL de *ImPromII 5x buffer* (Promega), 3 µL de *ImPromII MgCl₂* (25 mM, Promega), 1,25 µL de uma mistura de dNTPs 10 mM cada (Fermentas), 1,25 µL de *RNaseOUT RNase Inhibitor* (40 U/µL Invitrogen) e 1,0 µL de *ImPromII reverse transcriptase* (Promega). A reação foi incubada a 42°C por 42 min para a transcrição reversa e, em seguida, a 70°C por 15 min para inativação da enzima.

3.12 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real

As reações de RT-qPCR foram realizadas com o sistema de detecção ABI PRISM 7500 HT (Applied Biosystems), utilizando SYBR Green (Invitrogen) como detector. As reações foram preparadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems), sendo conduzidas com 6,25 µL de Master Mix SYBR Green (Invitrogen), 0,25 µL de ROX (referência passiva), 200 nM de cada oligonucleotídeo, e 1 µL cDNA, totalizando 12,5 µL de reação. As condições para as reações foram as seguintes: passo inicial de 50°C por 2 min e 95°C por 10 min, seguidos de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min, ocorrendo a leitura da fluorescência a cada ciclo. Curvas de dissociação foram obtidas ao término de cada reação, através do aquecimento de 60°C para 95°C, subindo 1°C por min. Esse procedimento foi realizado para comprovar a ausência de contaminação ou de formação de dímeros de oligonucleotídeos. Esses experimentos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Michel Vincentz, do departamento de Biologia Vegetal da UNICAMP.

3.13 Análise dos resultados

Para os ensaios quantitativos, a coleta das folhas foi realizada de forma a se obter no mínimo 3 amostras por tratamento, cada uma consistindo no “pool” de 3 réplicas biológicas. Para a análise dos sintomas macroscópicos, por volta de 8 folhas de plantas de no mínimo 3 vasos foram inoculadas e as réplicas mais representativas foram apresentadas. Durante os ensaios da expressão gênica por PCR em tempo real, foram obtidas no mínimo 2 réplicas biológicas e 2 réplicas técnicas de 2 experimentos independentes. A análise das curvas de amplificação foi realizada com o auxílio do programa 7500 System Software. A linha de base foi coletada entre os ciclos 3 e 15, sendo todas as amplificações analisadas utilizando o *threshold* Rn em 0,02 para a obtenção dos valores de Ct. Os resultados foram normalizados pela expressão do RNA do controle interno *AT4G26410* que apresenta uma expressão bem constante em interações fitopatogênicas (Czechowski et al., 2005). A expressão relativa dos genes de interesse foi determinada por meio da equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta Ct = Ct$ gene de interesse – Ct controle endógeno e $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ tratamento - ΔCt referência.

4 RESULTADOS

4.1 Construção dos primers

A partir de uma análise transcriptômica prévia utilizando a técnica de microarranjo de DNA, realizada com folhas de *nia1 nia2* infectadas com a bactéria *P. syringae* e fumigadas com o gás NO ou com ar comprimido como controle (de Oliveira 2010), foram selecionados alguns genes de interesse potencialmente modulados por NO e envolvidos no processo de defesa da planta. Os genes selecionados estão listados na tabela 1 juntamente com as sequências dos pares de primers construídos para cada um deles.

Tabela 1: Nome, seqüência e características dos primers construídos para realização dos experimentos de PCR em tempo real.

Nome do gene	Abreviação	AGI	Direção	Seqüência (5'-3')	Tamanho do amplicon (bp)	Caracterização
<i>AT4G26410</i>	<i>END</i>	At4g26410	Forward	AGAGCGAAGAGGCACAATTCT	112	Controle endógeno
			Reverse	GCTAAAGCCGTCCTCTCAAG		
<i>PATHOGENESIS-RELATED GENE 1</i>	<i>PR1</i>	At2g14610	Forward	CTTACGGGGAAAACCTTAGCCT	122	Atividade antimicrobiana
			Reverse	ACCACAAACTCCATTGCACGT		
<i>PATHOGENESIS-RELATED PROTEIN2</i>	<i>PR2</i>	At3g57260	Forward	CGGTTTCTGGAGCAGGGCT	117	Atividade antimicrobiana
			Reverse	CGAGAAAGCTCTTATACTCATC		
<i>ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY</i>	<i>EDS1</i>	At3g48090	Forward	GGAGTGAGCACAAGAGGCAG	136	Via do ácido salicílico
			Reverse	CATCTTCTATCCATGCTAGTTTC		
<i>NIM1-INTERACTING 1</i>	<i>NIMIN1</i>	At1g02450	Forward	CGTAGACGAGAAGAGTTAGC	119	Via do ácido salicílico
			Reverse	GTACGACACTGAGAGAAATCCT		
<i>NIM1-INTERACTING 2</i>	<i>NIMIN2</i>	At3g25882	Forward	TGACGGTAACAGAGGGAAACC	95	Via do ácido salicílico
			Reverse	CGTGTACTCTCCGTAATATCTT		
<i>LIPOXYGENASE 2</i>	<i>LOX2</i>	At3g45140	Forward	CAAAGGGGGTTGGCTGAG	101	Síntese de ácido jasmônico
			Reverse	CATCCCACAATATTAGACCATC		

Continuação da tabela 1

<i>IAA-LEUCINE RESISTANT (ILR)- LIKE1</i>	<i>ILL1</i>	At5g56650	Forward	CATCCCTCAGCATACAATAGA	110	Via da auxina
			Reverse	CTGTGACCACCTTTGAATCCG		
<i>AUXIN F-BOX PROTEIN 5</i>	<i>TIR1</i>	At5g49980	Forward	CAGGGTTTAGAGAGTTGATGC	94	Via da auxina
			Reverse	AGAAATGTTAGCATAACTGAAGT		
<i>AUXIN UPREGULATED 3</i>	<i>G3H</i>	At4g37390	Forward	GAAGTGGCTGAGTTTTTGGTTG	104	Via da auxina
			Reverse	CCAGTAACAATCACGTCGAGG		
<i>1-AMINO- CYCLOPROPANE-1- CARBOXYLATE SYNTHASE 7</i>	<i>ACCS7</i>	At4g26200	Forward	TCCAGGATTCGATAGAGATTTG	117	Síntese de etileno
			Reverse	GTTTGGTACGCCGACTCTAG		
<i>PHE AMMONIA LYASE 1</i>	<i>PAL1</i>	At2g37040	Forward	ATGGCTTCTTATTGTTTCAGAGC	116	Metabolismo secundário
			Reverse	TTGCGAGACGAGATTAGTCC		
<i>CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE 1</i>	<i>CAD1</i>	At1g72680	Forward	TCAATCTTGGTATGAGAATGCTC	115	Metabolismo secundário (lignina)
			Reverse	GGAATCACCTCTATGTTTGGA		
<i>AT4G30470</i>	<i>CCR</i>	At4g30470	Forward	GGACGTTTCATATTAGAGCATTC	112	Metabolismo secundário (lignina)
			Reverse	AGACAAACTCTCCACTAGCTT		
<i>PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE 9</i>	<i>PDR9</i>	At3g53480	Forward	CAACTACCTTGCGATGTTCTCCT	131	Estresse oxidativo /Detoxificação de drogas
			Reverse	ACCCTGGTACTTGCGTTTGG		

Continuação da tabela 1

<i>CYTOCHROME P450 SUBFAMILY A</i>	<i>CITP450A</i>	At3g28740	Forward	CATACTTGTTATGATACTTGCC	112	Estresse oxidativo /Detoxificação de drogas
			Reverse	GATTCGGTCTTTGCCTTTCG		
<i>CYTOCHROME P450 SUBFAMILY B</i>	<i>CITP450B</i>	At2g34500	Forward	GTACACTATCCCAAAGGTAC	136	Estresse oxidativo /Detoxificação de drogas
			Reverse	GTTGCGTTTGAACACCTGGT		
<i>ALTERNATIVE OXIDASE 1A</i>	<i>AOX1a</i>	At3g22370	Forward	GAAGAAGCATCATGTTCCAACG	97	Cadeia respiratória/Estres se oxidativo
			Reverse	TCTCCTCTGGAAGAACAATCG		
<i>PLANT UNCOUPLING MITOCHONDRIAL PROTEIN 1</i>	<i>PUMP1</i>	At3g54110	Forward	TCTGCATCGGCTCTCCTGTC	114	Proteína desacopladora mitochondrial /Estresse oxidativo
			Reverse	CCATAGGACCGTCGCTCTTC		

4.2 Análise inicial da expressão gênica

Utilizando os primers descritos na Tabela I, foi realizada uma análise inicial de expressão gênica por PCR em tempo real em plantas *nia1 nia2* infectadas por *P. syringae* e fumigadas com NO para selecionar os genes modulados por NO nas condições de tratamento estabelecidas no nosso laboratório (Figura 4). Os genes selecionados são relacionados à defesa como proteínas relacionadas à patogênese (*PR1* e *PR2*), a via do ácido salicílico (*EDS1*, *NIMIN1* e *NIMIN2*) e do ácido jasmônico (*LOX2*), a primeira enzima da via de síntese dos fenilpropanoides (*PAL1*) e a biossíntese de lignina (*CCR* e *CAD1*), além de genes que codificam proteínas da cadeia respiratória (*AOX1a*) e de detoxificação celular (*CITP450A*, *CITP450B* e *PDR9*), envolvidos com o estresse oxidativo, proteína desacopladora da mitocôndria (*PUMP1*) e hormônios vegetais como etileno (*ACCS7*) e auxina (*TIR1*, *ILL1* e *GH3*). Como mostrado na Figura 4, o tratamento com o gás NO na planta mutante inoculada com a bactéria foi capaz de modular a expressão da maioria desses genes, com maior ou menor intensidade. Alguns se destacaram como sendo bastante estimulados, cerca de três vezes mais expressos, como *AOX1a*, *CITP450A* e *CAD1*. Outros genes foram bastante reprimidos como *PR1*, *PR2*, *TIR1*, *ACCS7*, *LOX2*, e *NIMIN2* (mais de duas vezes inibidos).

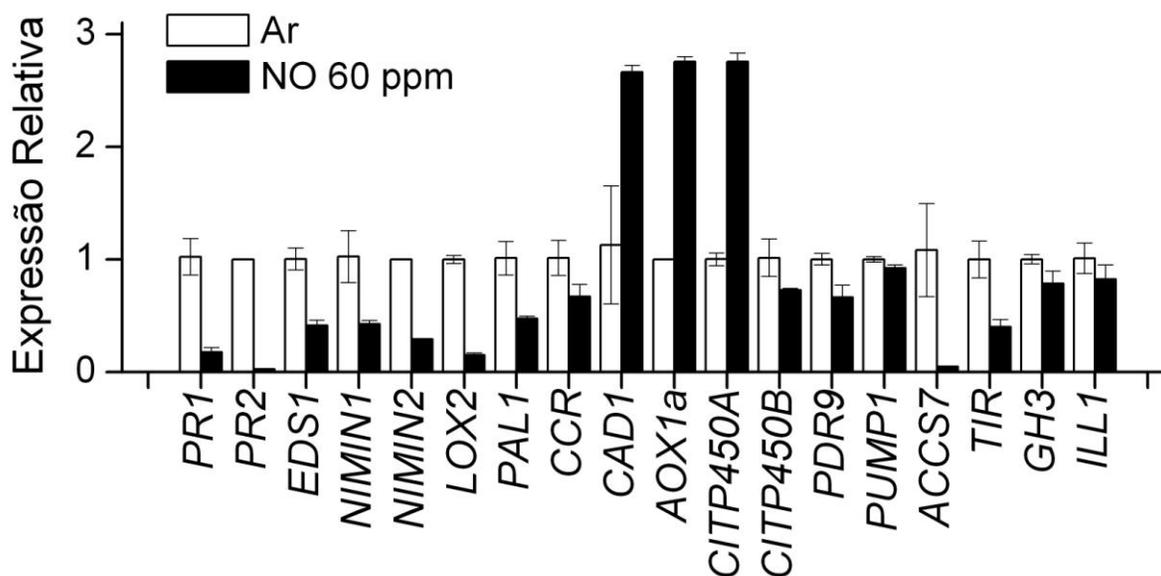


FIGURA 4: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, de genes potencialmente regulados pelo NO durante a resposta do mutante *nia1 nia2* à bactéria *Pseudomonas syringae*.

As plantas *nia1 nia2* inoculadas com 5×10^6 cfu.ml da bactéria foram fumigadas por 12 horas com o gás NO (60 ppm) ou com apenas ar em uma câmara de tratamento. As barras negras indicam o tratamento com NO e as barras brancas o tratamento controle com ar. Os genes analisados foram previamente selecionados a partir de um microarranjo de DNA. As barras indicam médias \pm SE (n=4).

A partir dos resultados da Figura 4 foram selecionados genes relacionados a diversos processos fisiológicos a fim de se compreender melhor o papel do NO na regulação da expressão gênica na resposta de defesa (Figura 5). Como na primeira análise foram utilizadas somente plantas mutantes *nia1 nia2* infectadas, foi imprescindível a análise da expressão em plantas não infectadas para verificar a interferência da bactéria e de todo o processo de defesa desencadeado quando da infecção nessa modulação gênica. Além disso, foi também analisada a resposta em plantas selvagens para avaliar a dependência do NO endógeno nesse processo de modulação pelo gás NO. Foram analisados genes relacionados à patogênese (*PR1*), genes envolvidos na via de síntese de lignina (*CAD1* e *CCR*), na via de transdução de sinais da auxina (*GH3*, *ILL1*, *TIR1*), via do ácido salicílico (*NIMIN1*), via dos fenilpropanóides (*PAL1*) e proteínas da mitocôndria (*AOX1a* e *PUMP1*). Assim como nas plantas infectadas, os genes escolhidos foram em sua maioria responsivos ao tratamento com o gás NO também em folhas não infectadas. Os genes *CAD1* e *AOX1a* mais uma vez tiveram sua expressão bastante estimulada, além do *GH3* e da *PUMP1*. Comparando-se o genótipo selvagem e *nia1 nia2* a modulação realizada pelo NO seguiu o mesmo padrão. Genes, cuja expressão foi inibida pelo NO nas plantas selvagens também apresentaram perfil de expressão similar no mutante, o que se repetiu com os genes estimulados. A intensidade dessa modulação é que variou em alguns casos. O gene *PR1* foi mais expresso no selvagem, enquanto os genes *CAD1* e *GH3* foram mais expressos no mutante em resposta ao NO. Em plantas infectadas e não infectadas, em geral, a modulação da expressão pelo NO no sentido de inibir ou estimular determinado gene se manteve constante. Uma notável exceção foi o gene *PR1* induzido pelo NO na planta não infectada (Figura 5), e inibido na planta infectada (Figura 4). Diante desses resultados encontra-se uma ampla gama de possibilidades de estudo, em diversas vias do metabolismo vegetal, potencialmente moduladas por NO. Para seguir adiante, com os estudos dos mecanismos de defesa envolvidos nessa interação fitopatogênica, foram selecionados genes importantes na resposta de defesa, cujos perfis de expressão gênica serão descritos a seguir.

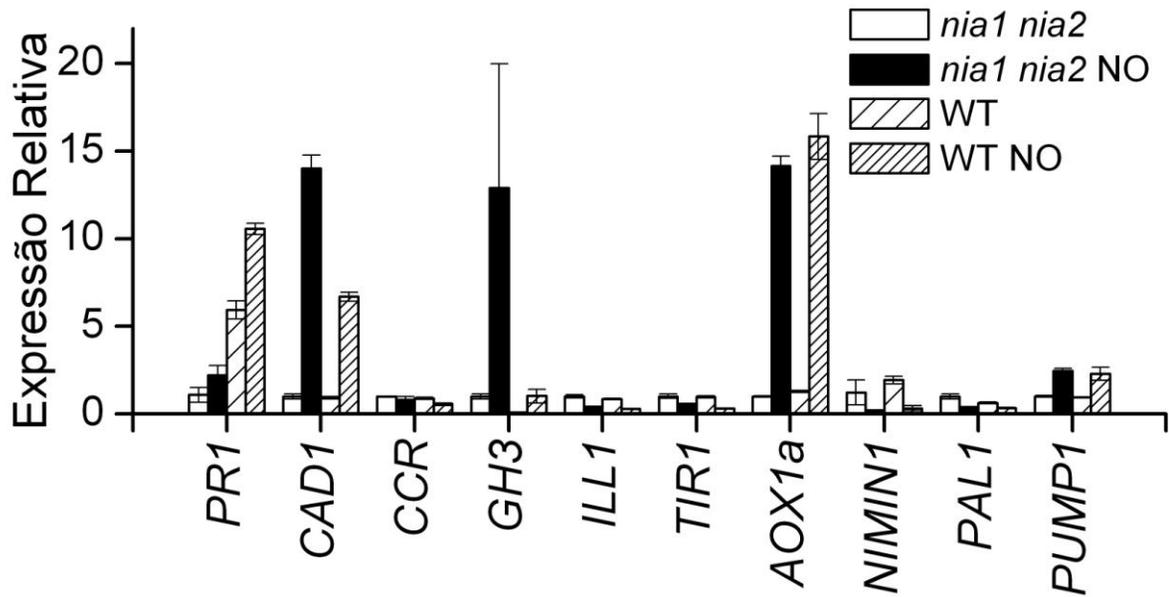


FIGURA 5: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, de genes de *Arabidopsis thaliana* do genótipo selvagem e mutante *nia1 nia2* não infectadas e tratadas com o gás NO (60 ppm) ou apenas com ar comercial por 12 horas.

Os genes analisados foram selecionados a partir da Figura 4. As barras indicam a média \pm SE (n=4).

4.3 Análise da expressão de genes relacionados à patogênese (*PR1*)

Os genes *PRs* codificam proteínas relacionadas à patogênese como quitinases, peroxidases, inibidores de proteínas entre outras (van Loon et al. 2006b) e são conhecidos na literatura como responsivos ao NO. Este radical seria um sinal para induzir a expressão desses genes durante a resposta de defesa (Durner et al 1998). Com o intuito de verificar se a susceptibilidade do mutante *nia1 nia2* seria devido a uma expressão reduzida desses genes em função dos baixos níveis de NO endógeno em comparação com a planta selvagem, foram analisados os níveis basais de expressão do gene *PR1* no mutante e no selvagem, bem como o efeito do NO e da inoculação da bactéria (Figura 6A e B). De acordo com o esperado esse gene foi mais expresso no selvagem, cujo nível de NO é maior que na mutante tanto em plantas infectadas como não infectadas (Modolo et al. 2005). Ainda, de acordo com a literatura (Durner et al, 1998) nas plantas não infectadas pode-se observar uma tendência do NO em estimular a expressão desse gene, de forma mais intensa no genótipo selvagem. Contudo ao analisar o padrão de expressão das plantas infectadas temos que a ação do NO é de diminuir a indução dos genes *PR1*, contrariando a tendência até então observada. Foram utilizadas duas concentrações diferentes de NO para confirmar essa inibição e descartar um possível efeito antagônico em concentrações diferentes. As duas concentrações de NO provocaram o mesmo efeito sendo este mais acentuado na concentração mais alta. Além do gene *PR1* outros genes da via do ácido salicílico como *PR2*, *EDS1*, *NIMIN1* e *NIMIN2* (Durrant and Dong 2004) também foram reprimidos pelo tratamento com o gás NO (Figura 4). Ainda a expressão diferencial dos genes *PR1* foi acompanhada ao longo do tempo para identificar uma possível alteração da expressão gênica anterior ao tempo de 12 horas de inoculação e tratamento com NO (Figura 6C). Realmente pode-se constatar picos com intensidades diferentes nos pontos analisados comparando-se os dois genótipos. Analisando três tempos distintos após a inoculação observou-se a indução de expressão de *PR1* até 6 horas após infecção com a bactéria seguida de um decréscimo dos níveis do transcrito em 12 horas. A mesma tendência foi observada com o mutante susceptível *nia1 nia2*, contudo o pico de expressão foi cinco vezes menor que no selvagem. Ou seja, apesar de, ao se analisar os resultados de

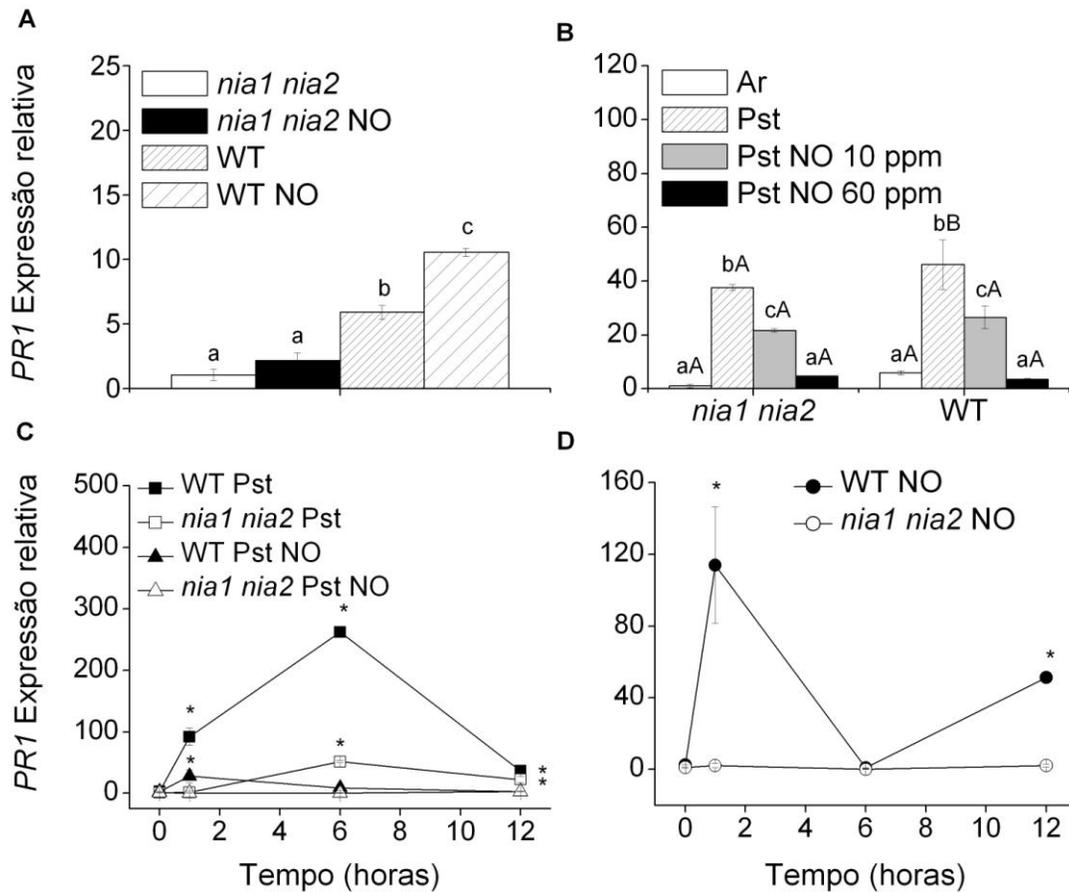


FIGURA 6: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, do gene *PR1* de *Arabidopsis thaliana* nos genótipos selvagem e mutante *nia1 nia2*.

(A) Plantas *nia1 nia2* e selvagem não infectadas foram submetidas a uma atmosfera de NO (60 ppm) ou ar comercial por 12 horas (B) Plantas *nia1 nia2* e selvagem infectadas com a bactéria *Pseudomonas syringae* foram fumigadas por 12 horas com duas concentrações de gás NO (10 e 60 ppm) ou ar comercial em uma câmara de tratamento. As barras brancas indicam plantas não infectadas (controle). (C) Expressão relativa do gene *PR1* ao longo do tempo de infecção e (D) em plantas não infectadas. Plantas *nia1 nia2* e selvagem infectadas ou não foram fumigadas com o gás NO 60 ppm por 0, 1, 6 e 12 horas. Os dados indicam a média \pm SE (n=4). Valores que diferem significativamente de acordo com one-way ANOVA ($P < 0,05$) seguido do teste Tukey estão marcados com letras diferentes ou asteriscos. Letras minúsculas indicam diferenças entre os diferentes tratamentos dentro do mesmo genótipo. Letras maiúsculas indicam diferenças entre os diferentes genótipos dentro de um mesmo tratamento.

12 h após inoculação, a mutante conseguiu induzir a expressão dos genes *PR1*, esse aumento não possui a mesma intensidade e rapidez que ocorre no selvagem. Já as plantas selvagem controle não infectadas têm sua expressão induzida pelo tratamento com NO com um pico 1h após inoculação, o que não ocorre na planta mutante (Figura 6D). Para compreender esse efeito de inibição dos genes *PRs* provocada pelo NO em plantas infectadas foi analisada a evolução dos sintomas da doença e o crescimento bacteriano nas folhas de plantas *nia1 nia2*. Comparando-se o crescimento bacteriano 48 h após a infecção entre selvagem e mutante, constata-se que em *nia1 nia2* a proliferação do patógeno é significativamente maior, o que está de acordo com dados anteriores de nosso laboratório (Oliveira et al. 2009). O tratamento com o gás NO reduziu em cerca de 7 vezes o crescimento bacteriano em folhas *nia1 nia2*, aproximando-o dos níveis encontrados no genótipo selvagem (Figura 7).

Analisando a evolução dos sintomas 48 h após a infecção em plantas *nia1 nia2*, observamos que as plantas controle submetidas a uma atmosfera de ar comercial apresentaram-se retorcidas, desidratadas e com clorose severa (Figura 8A), o que é consistente com a susceptibilidade de *nia1 nia2* a essa linhagem bacteriana. Por outro lado, as plantas infectadas submetidas a uma atmosfera de 60 ppm de NO por 12 h apresentaram sintomas muito mais amenos, com leve clorose pontual no local da inoculação (Figura 8B). A análise do crescimento bacteriano utilizando extratos de folha *nia1 nia2* infectadas controle e submetidas ao NO 60 ppm mostrou que houve a morte de mais de 90% da bactéria em função da exposição ao gás NO em relação às folhas mantidas no ar (Figura 8C). Dessa forma, a fumigação com NO foi capaz de reduzir o crescimento bacteriano e a evolução dos sintomas da doença em folhas *nia1 nia2*, ao mesmo tempo em que atenuou a expressão de genes de defesa como *PR1*, *PR2*, *NIMIN1*, *NIMIN2* e *EDS1*.

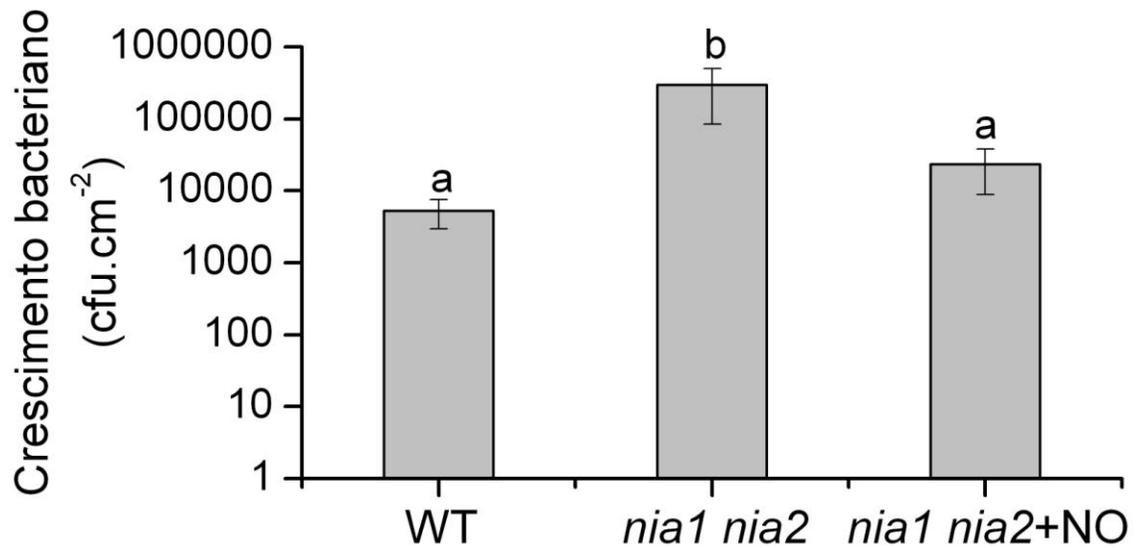


FIGURA 7: Efeito da fumigação com o gás NO no crescimento de Pst em folhas de plantas *nia1 nia2*.

Folhas de *nia1 nia2* inoculadas com 5×10^5 cfu.mL⁻¹ de Pst foram expostas a uma atmosfera de gás NO 60 ppm durante 12 horas. Após 48 h o crescimento bacteriano em plantas *nia1 nia2* tratadas com NO (*nia1 nia2* + NO) foi comparado ao observado em plantas *nia1 nia2* e selvagem infectadas e mantidas na câmara com fluxo de ar comercial puro. Os dados representam média \pm SE (n = 7). Valores que diferem significativamente de acordo com one-way ANOVA (P<0,05) seguido do teste Tukey estão marcados com letras diferentes.

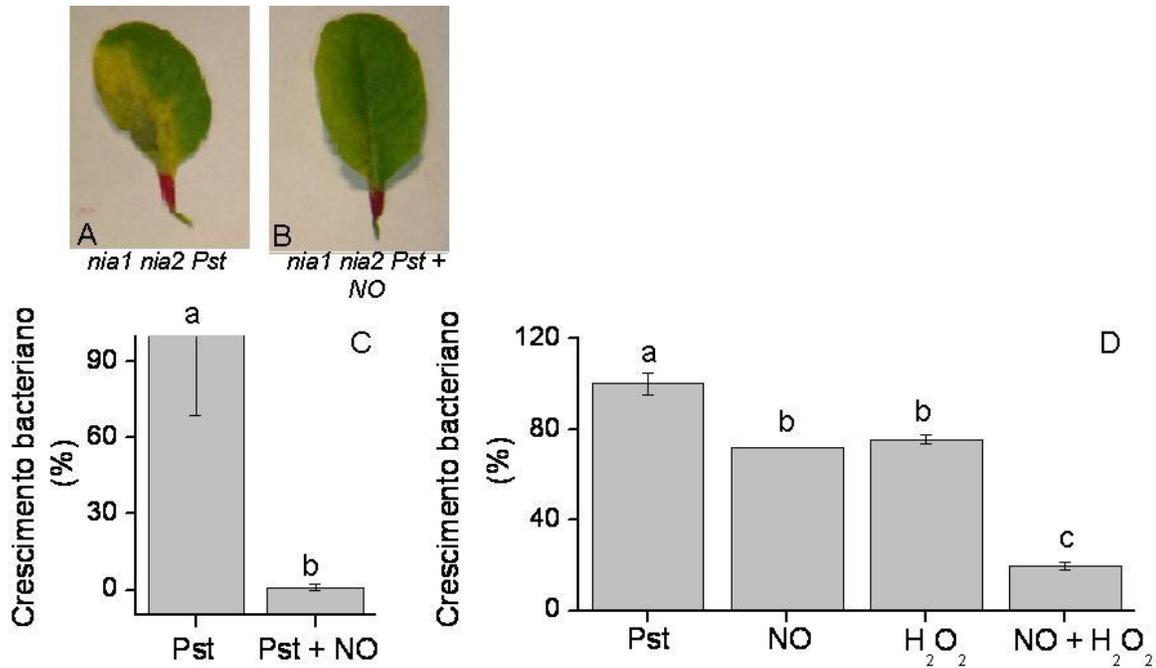


FIGURA 8: Efeito da fumigação com gás NO nos sintomas macroscópicos e crescimento bacteriano em folhas *nia1 nia2* infectadas com Pst e no crescimento de suspensões de Pst.

(A, B) Folhas de *nia1 nia2* inoculadas com 5×10^6 cfu.mL⁻¹ de Pst e submetidas a uma atmosfera de ar comercial puro (*nia1 nia2* Pst) ou a uma atmosfera de 60 ppm de NO (*nia1 nia2* Pst + NO) por 12 h. Após 48 h os sintomas macroscópicos da doença foram comparadas nos dois tratamentos. (C) Análise do crescimento bacteriano em folhas de *A. thaliana nia1 nia2* inoculadas com a bactéria *P. syringae* logo após o tratamento controle de 12 horas de exposição ao ar comercial puro e ao NO. (D) Crescimento de suspensões bacterianas de Pst em meio líquido B de King ($A = 0,05$) mantidas sob agitação constante de 150 rpm. O crescimento das suspensões após 12 horas de exposição ao gás NO (60ppm), ao H₂O₂ (30μM) e a ambos os tratamentos anteriores, foram comparados ao crescimento de suspensão mantida sob fluxo de ar comercial puro mediante o aumento da medida de absorbância a 600 nm. As barras representam a média \pm SE (n=3). Valores que diferem significativamente de acordo com one-way ANOVA (P<0,05) seguido do teste Tukey estão marcados com letras diferentes.

É importante ressaltar que esse último dado difere do resultado da Figura 7, pois o crescimento bacteriano foi analisado imediatamente após 12 h de exposição ao gás NO, com o intuito de avaliar um possível efeito microbicida direto causado pela fumigação com NO. Isso, pois uma hipótese para explicar esses resultados seria a existência desse efeito direto do NO em matar a bactéria, conforme já descrito em animais (John MacMicking et al. 1997). Para verificar essa possibilidade, foi realizado um controle avaliando o crescimento bacteriano em uma suspensão da bactéria exposta diretamente a uma atmosfera de 60 ppm de NO também por 12 horas. Neste caso ocorreu morte de menos de 28% da suspensão bacteriana (Figura 8D), bem menor que a redução do crescimento de mais de 90% induzida pelo NO nas folhas (Figura 8C). Estes resultados indicam que o efeito microbicida do NO é mais intenso na planta do que na cultura da bactéria, sugerindo que outro agente microbicida poderia estar atuando sinergicamente junto ao NO na planta infectada. Assim, foi avaliado o efeito de H₂O₂ (30 µM) no crescimento da suspensão bacteriana, já que essa molécula também é produzida em grandes quantidades em resposta a estresses bióticos (Grant and Loake 2000). O tratamento com 30 µM de H₂O₂ provocou morte de 25% da bactéria em suspensão (Figura 8D). Já, quando as suspensões foram tratadas simultaneamente com NO e H₂O₂, a porcentagem de morte da bactéria se elevou para 80%. Esses resultados sugerem uma ação microbicida conjunta e sinérgica do NO com o H₂O₂ na planta.

A produção de peróxido de hidrogênio nas plantas selvagem e mutante em função do tempo de infecção foi acompanhada e comparada com aquela das plantas controle. Conforme mostra a Figura 9A, no selvagem foi detectado um aumento de H₂O₂ em resposta a inoculação com a bactéria ao longo de 24 horas, com um pico de produção nas primeiras 3 h. O mesmo padrão de produção de H₂O₂, porém com menor intensidade, foi observado na planta controle, infiltrada apenas com MgCl₂. Realmente, já é conhecido que a planta responde a ferimentos e ao ataque de patógenos produzindo H₂O₂ (Grant and Loake 2000). Contudo, no mutante foi observado um padrão distinto de produção de H₂O₂: o primeiro pico de produção de H₂O₂ em resposta ao estresse de ferimento foi menos intenso e a produção de H₂O₂ em função da infecção com a bactéria aumentou significativamente após 12 horas de infecção (Figura

9B). Para avaliar a resposta da planta específica à infecção, a produção de H_2O_2 produzida em resposta ao ferimento foi subtraída daquela produzida na planta inoculada com a bactéria. Na Figura 9C fica evidente que na planta selvagem há um pico rápido de produção de H_2O_2 enquanto que no mutante a indução da produção é tardia e se mantém elevada após 12 horas de inoculação. Apesar dessa elevada produção de H_2O_2 , o mutante *nia1 nia2* é susceptível a bactéria.

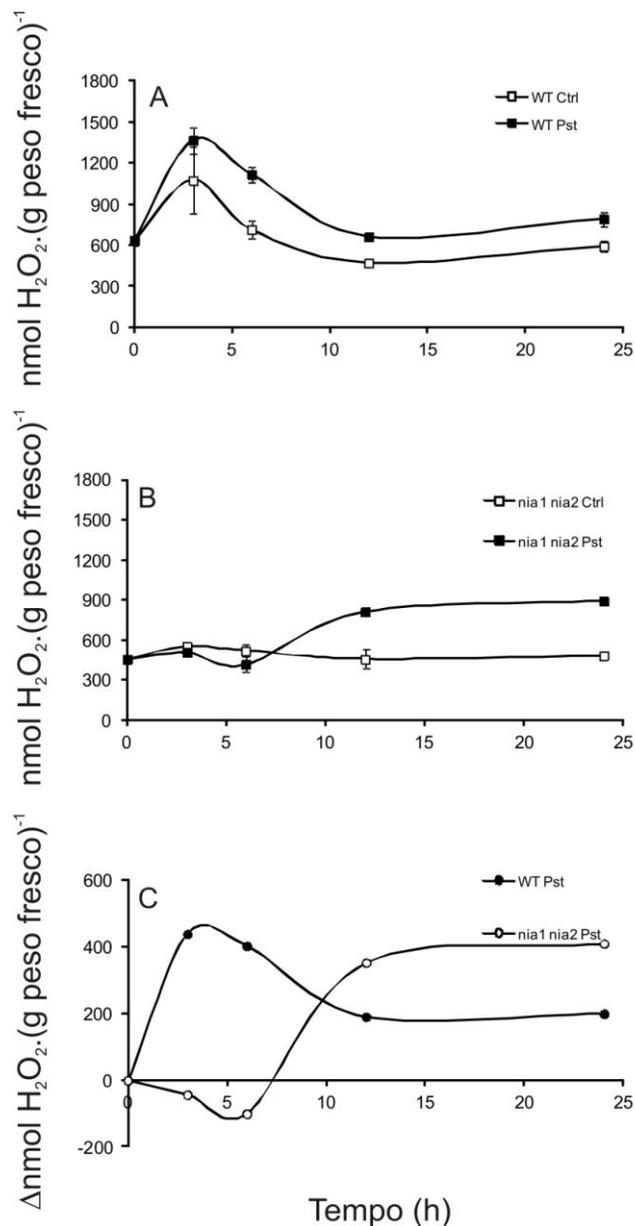


FIGURA 9: Quantificação de H₂O₂ ao longo do tempo em folhas de plantas selvagem e mutante *nia1 nia2* inoculadas com a bactéria *P. syringae*.

Plantas selvagens (A) e mutantes (B) foram infectadas com a bactéria 5×10^6 cfu.ml⁻¹ e após 0, 3, 6, 12 e 24 h suas folhas foram coletadas e os níveis de H₂O₂ quantificados e comparados com os níveis de folhas inoculadas apenas com MgCl₂ em seu tempo correspondente. (C) gráfico da variação de H₂O₂ após a infecção com bactéria obtido subtraindo-se dos valores de quantificação de H₂O₂ de plantas infectadas o seu respectivo valor do controle com MgCl₂. Os dados representam a média \pm SE (n=9).

4.4 Análise da expressão de genes do metabolismo secundário importantes para defesa: *PAL1* e *CAD1*

Além da PR, a PAL também é uma enzima importante para as respostas de defesa da planta, pois é a primeira enzima da via de síntese dos fenilpropanóides que origina importantes compostos para a defesa celular (Besseau et al. 2007). Analisando o resultado da expressão de *PAL1* não se observou distinção entre o perfil de expressão encontrado no selvagem e no mutante (Figura 10). Em ambos os genótipos a expressão foi induzida pela bactéria. Foi observado um pico de expressão de *PAL1* com 6 horas decorridas da infecção, e após 12 horas os níveis de expressão caíram e se assemelharam ao basal. Sob o tratamento com NO houve indução da expressão somente na planta inoculada e durante a primeira hora. Essa indução foi menor que a provocada somente pela infecção após 6h, talvez devido a diminuição do inóculo em função do efeito microbicida do NO. Não foi observado efeito significativo do NO em plantas não inoculadas.

Um importante produto da via dos fenilpropanóides é a lignina e o gene *CAD1* codifica uma enzima que participa dos últimos passos na via de síntese dos monolignóis os quais constituem o polímero da lignina (Raes et al. 2003). A lignina está relacionada aos mecanismos de defesa da planta, pois funciona como uma barreira física rígida que ajuda a evitar a penetração de patógenos no tecido da planta (Vorwerk et al. 2004). A inoculação com *Pseudomonas syringae* provocou aumento da expressão do gene (cinco vezes) nos dois genótipos (Figura 11). O tratamento com NO também provocou aumento da expressão gênica tanto em plantas não infectadas como infectadas nos dois genótipos, contudo a indução da expressão pelo NO foi duas vezes maior em plantas do genótipo mutante. Quanto à expressão basal de *CAD1*, esta foi somente cerca de 10% maior no selvagem em relação ao mutante. Esses resultados sugerem um efeito do NO em estimular a síntese de lignina, o que precisa ser estudado com mais detalhes.

Foi realizada uma análise quantitativa de lignina em folhas selvagem e *nia1 nia2*. De fato constatou-se uma diferença significativa no conteúdo de lignina entre esses dois genótipos. O selvagem apresentou um maior conteúdo de lignina em relação ao

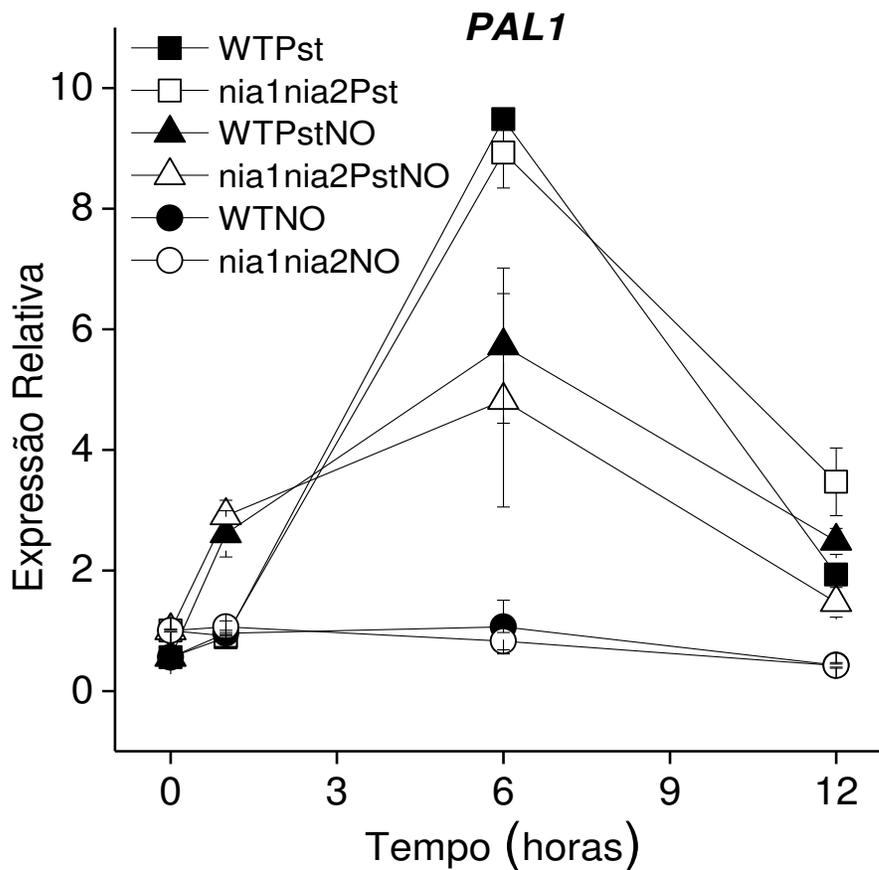


FIGURA 10: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, do gene *PAL1* de *Arabidopsis thaliana* nos genótipos selvagem e mutante *nia1 nia2* ao longo do tempo.

Folhas de plantas selvagem e mutante foram inoculadas com a bactéria *P. syringae* ou seu controle $MgCl_2$ e fumigadas com gás NO (60 ppm) ou ar comercial puro. A expressão gênica foi analisada após 1, 6 e 12 h. O tempo 0 constitui a média dos controles nos diferentes tempos. Os dados indicam médias \pm SE (n=4).

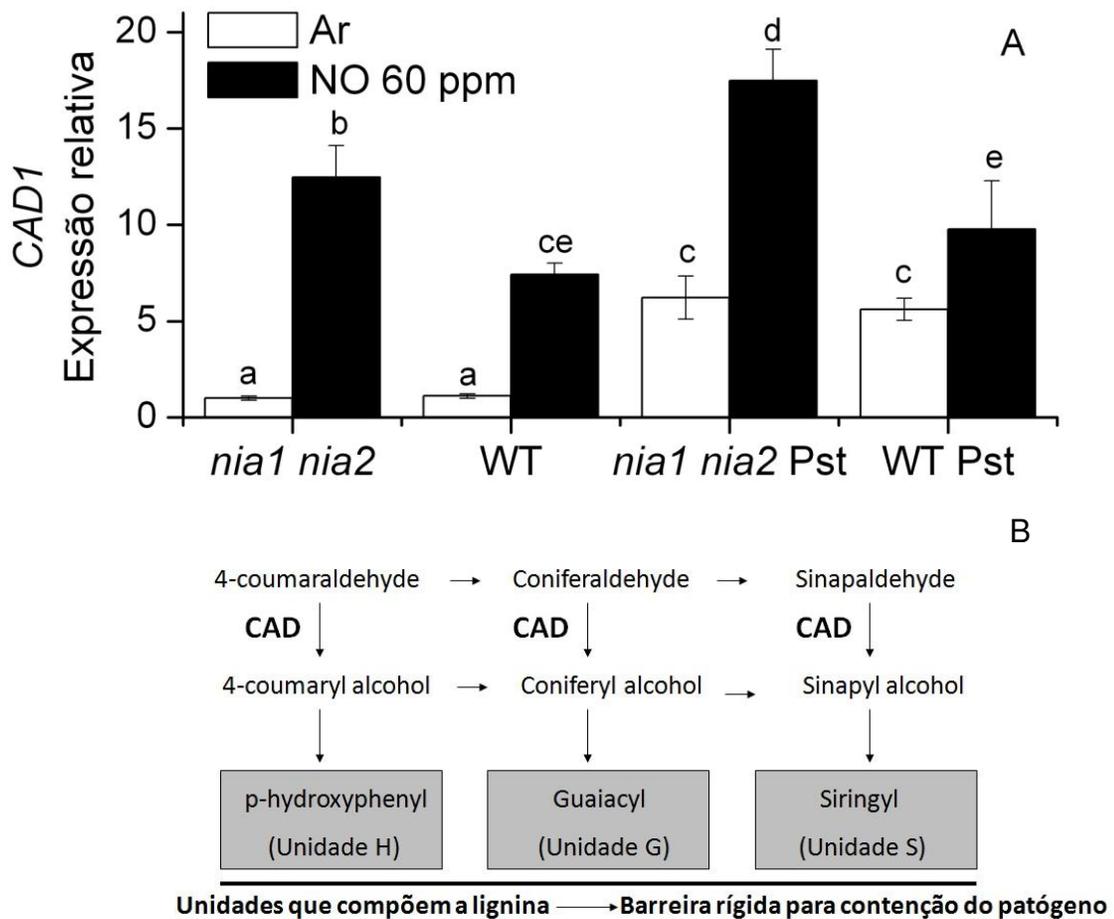


FIGURA 11: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, da *CAD1* em *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* e esquema da via de biossíntese de lignina.

(A) Folhas de plantas selvagem e mutante foram inoculadas com a bactéria *P. syringae* ou seu controle $MgCl_2$ e fumigadas com gás NO (60 ppm) ou ar comercial puro. A expressão gênica foi analisada após 12 h de tratamento. **(B)** Esquema representativo da via de biossíntese da lignina. As barras indicam médias \pm SE (n=4). Valores que diferem significativamente de acordo com one-way ANOVA ($P < 0,05$) seguido do teste Tukey estão marcados com letras diferentes.

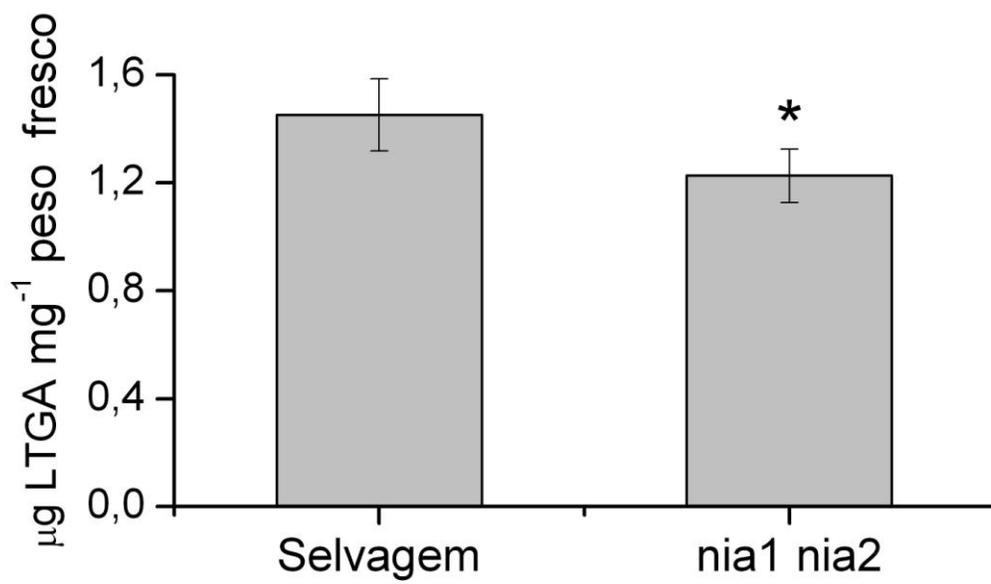


FIGURA 12: Quantificação de lignina total em folhas de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* determinada com ácido tioglicólico.

Folhas da roseta de plantas de cerca de 35 dias foram coletadas e seu conteúdo de lignina total analisado. As barras indicam médias \pm SE (n=4). Valores diferem significativamente de acordo com teste t (P<0,05).

mutante (Figura 12). Também foram analisados cortes histológicos da região do pecíolo, em função da dificuldade de padronização de uma região na folha, para avaliar as células do xilema, que são ricas em lignina (Figura 13). Com o teste de azul de toluidina pôde-se observar um maior número de células lignificadas no selvagem em comparação ao mutante. Ao analisar as mesmas imagens com luz polarizada, a qual origina imagens com regiões de claro e escuro, apropriada para identificar moléculas orientadas em um único plano, como as fibras de lignina, por exemplo, observa-se que os feixes vasculares do selvagem parecem mais desenvolvidos e com maior número de células que os do mutante.

Adicionalmente foram realizados testes histoquímicos com o reagente de Maüle para detectar diferenças na composição da lignina entre os dois genótipos. O polímero da lignina é composto por três subunidades distintas (S, G e H) (Figura 11B), as quais podem variar em sua proporção de acordo com o grupo de plantas como monocotiledôneas e dicotiledôneas ou até mesmo com o tipo celular em uma mesma planta (Peter and Neale 2004; Weng and Chapple 2010; Delaux et al. 2012). Foram realizados cortes a mão dos caules e pecíolos, mas devido a dificuldade em cortar pecíolos a mão somente os cortes dos caules foram apresentados (Figura 14). A coloração vermelha indica um polímero de lignina cuja constituição revela uma maior porcentagem de unidades S, ao passo que uma coloração marrom indica maior porcentagem de unidades G em sua composição. De acordo com a Figura 14 o selvagem apresenta na região das células que compõem o xilema lignina com uma composição mais rica em unidades G, enquanto as células que se encontram na região das fibras apresentam lignina com maior proporção de unidades S. De modo interessante, foi observado um padrão de composição de lignina diferente no mutante. Nas células que compõem o xilema houve uma aparente diferença no tom de marrom apresentado, mais escuro no mutante, contudo na região das fibras, ocorreu uma intensa diferença na coloração, que foi marrom no mutante, indicando um maior conteúdo de unidades G, o que difere bastante com o observado no selvagem. Cabe ressaltar que houve grande variação nas amostras do mutante, pois essa diferença tão contrastante foi observada em apenas 50% dos mutantes analisados (n=4). Dessa

forma é importante realizar uma análise quantitativa da composição dessa lignina com cromatografia gasosa, por exemplo, para confirmar esses resultados.

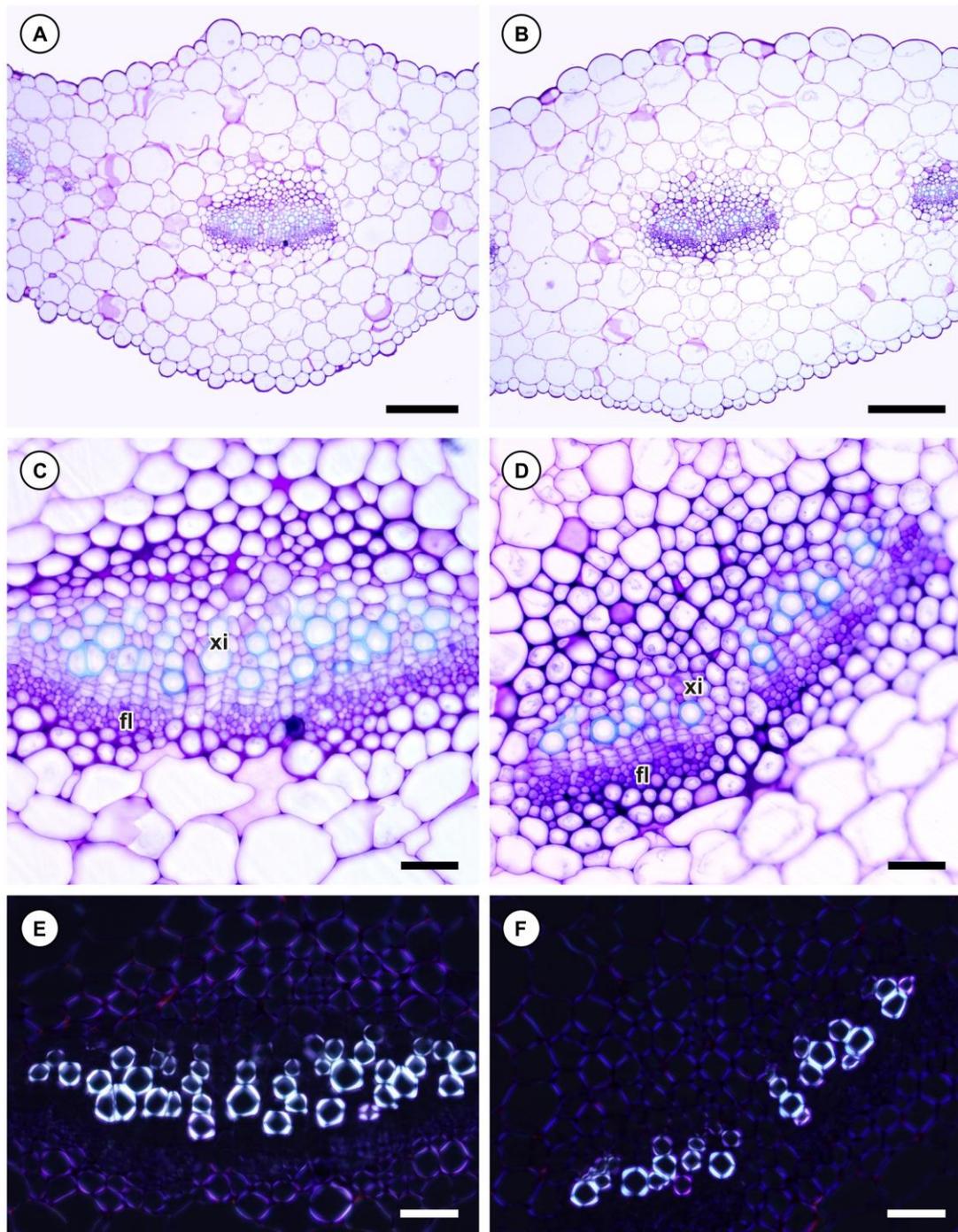


FIGURA 13: Secções transversais de pecíolos de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* coradas para lignina utilizando o corante azul de toluidina.

As secções (A,C e E) correspondem ao selvagem e (B,D e F) ao mutante – (E-F) Imagens utilizando luz polarizada. As barras indicam 100 μ m (A-B) e 20 μ m (C-F). xi: xilema, fl: floema.

Teste Maüle

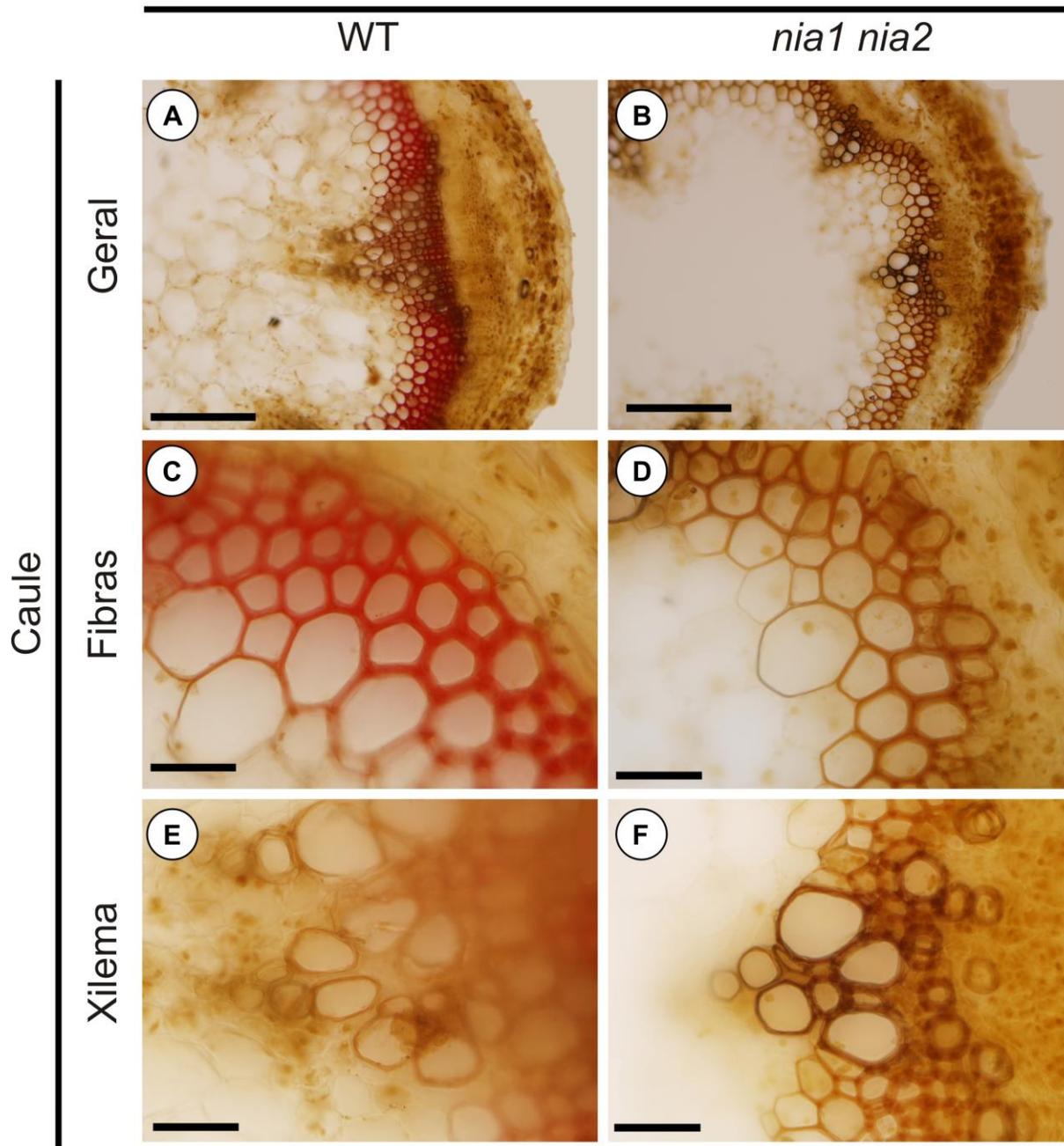


FIGURA 14: Secções transversais de bases de caules maduros de *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* coradas para lignina utilizando o reagente Maüle.

As secções (A,C e E) correspondem ao selvagem e (B,D e F) ao mutante – (A-B) Caules maduros, (C-D) região que contém as fibras e (E-F) células do xilema. As barras indicam 100 μm (A-B) e 20 μm (C-F).

4.5 Análise da expressão de genes da via de transdução de sinal da auxina (*TIR1*, *ILL1* e *GH3*) e do etileno (*ACC7*)

A expressão de três genes envolvidos na via de transdução de sinais da auxina foi analisada em plantas do genótipo selvagem (resistente) e mutante (susceptível) infectadas ou não com a bactéria (Figura 15). O gene *GH3* atua na conjugação de AIA a aminoácidos reduzindo os níveis desse hormônio livre, o qual tem a capacidade de se ligar a receptores e desencadear respostas celulares (Woodward and Bartel 2005). A expressão desse gene foi estimulada pela infecção e pelo NO nos dois genótipos (Figura 15A). O aumento da expressão com o tratamento de NO ocorreu tanto em plantas não infectadas como nas infectadas na mesma proporção, ou seja, o aumento da expressão em plantas infectadas tratadas com NO foi a soma do estímulo causado pelo NO e pela infecção separadamente. Tanto a indução da expressão causada pela infecção quanto a causada pelo NO foram mais evidentes do genótipo mutante.

O gene *ILL1* tem função antagônica ao *GH3* e codifica uma enzima responsável por hidrolisar a auxina conjugada ao aminoácido tornando-a livre (Woodward and Bartel 2005). A expressão desse gene foi inibida em ambos os genótipos tanto pela infecção com a bactéria quanto pelo tratamento com NO (Figura 15B). A inibição provocada pelo tratamento com NO ocorreu em plantas infectadas e não infectadas sendo que nesta última a inibição foi mais acentuada (cerca três vezes menos expresso), enquanto nas plantas infectadas a inibição foi aproximadamente de duas vezes.

O padrão de expressão do gene *TIR1*, um receptor de auxina, foi bastante similar ao do *ILL1* (Figura 15C). *TIR1* também foi inibido pela infecção e pelo tratamento com NO em plantas controle não infectadas e infectadas e a inibição foi mais evidente em plantas não infectadas (seis vezes menos expresso ao passo que na planta infectada a expressão é três vezes menor). O esquema da Figura 16 ilustra como a regulação desses genes interfere no processo de sinalização da auxina.

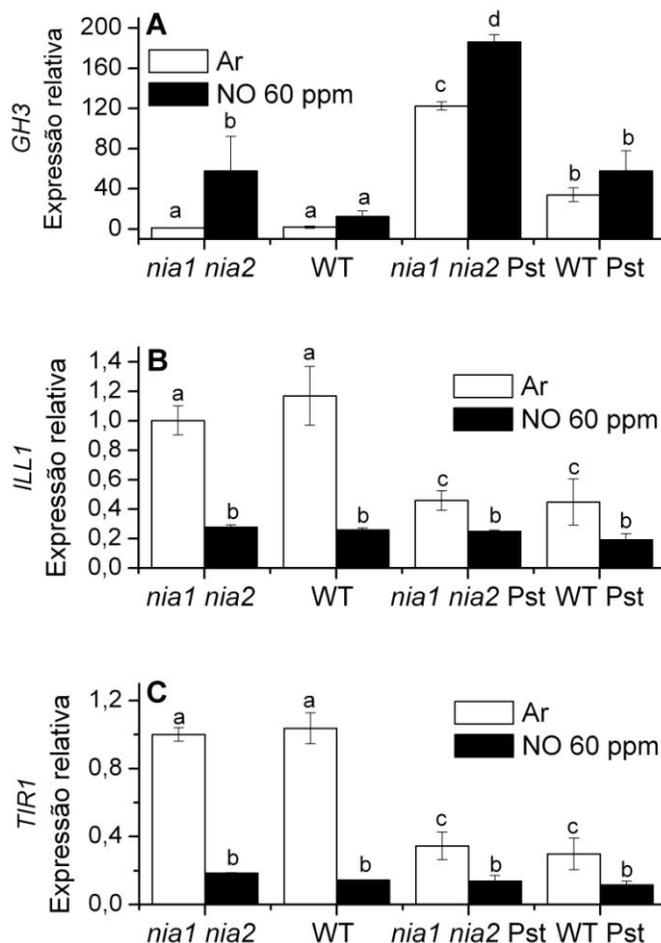


FIGURA 15: Expressão relativa de genes da via de transdução de sinais da auxina em *A. thaliana*.

Folhas do genótipo selvagem e mutante *nia1 nia2* controle ($MgCl_2$) e infectadas com a bactéria *Pseudomonas syringae* (5×10^6 cel.mL⁻¹) e fumigadas com o gás NO (60ppm) ou com ar comercial (controle) por 12 horas tiveram sua expressão gênica avaliadas. **(A)** Expressão relativa do gene *GH3*, que codifica uma enzima responsável pela conjugação da auxina a aminoácidos, **(B)** expressão relativa de *ILL1*, o qual codifica uma enzima responsável por hidrolisar auxinas conjugadas a aminoácidos e formar auxina livre e **(C)** expressão relativa de *TIR1* gene que codifica uma proteína do complexo receptor de auxina. As barras indicam médias \pm SE (n=4). Valores que diferem significativamente de acordo com one-way ANOVA (P<0,05) seguido do teste Tukey estão marcados com letras diferentes.

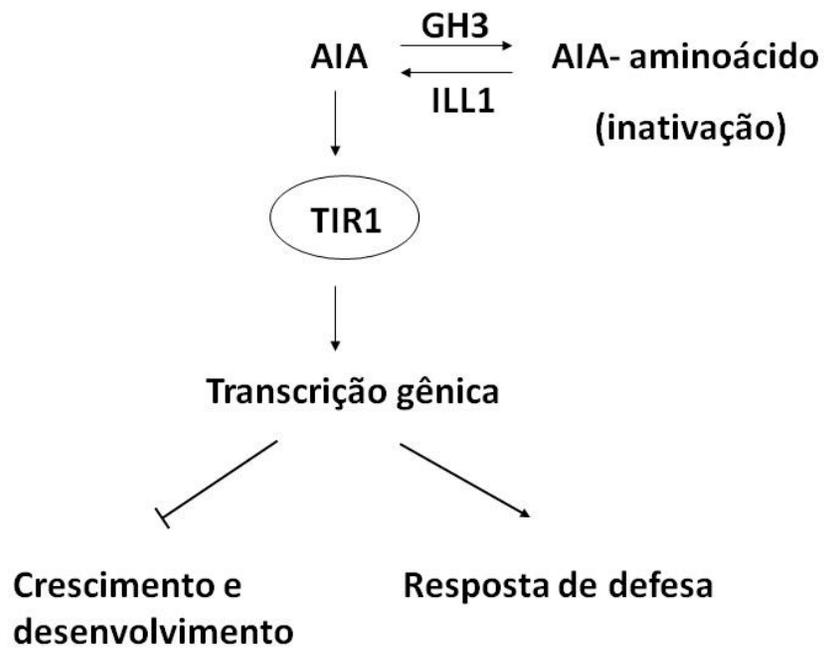


FIGURA 16: Esquema representativo da via de transdução de sinal da auxina.

Nesta figura está representada a inibição da via, segundo os resultados de expressão gênica obtidos, que favorece o processo de defesa da planta ao reduzir seu crescimento e desenvolvimento.

A enzima ACC Sintase atua na síntese do ácido 1-carboxílico-1-amino ciclopropano que por sua vez, mediante ação da enzima ACC Oxidase, produzirá o etileno (Figura 17B). Além dos tratamentos anteriores, os níveis de expressão do gene *ACCS7* também foram analisados utilizando-se uma concentração menor de NO com o objetivo de descartar uma possível ação antagônica desse gás comparando-se uma concentração baixa com outra mais alta (Figura 17). A expressão do *ACCS7* foi bastante estimulada pela infecção, por volta de cinquenta vezes no mutante e dezessete vezes no genótipo selvagem. Por sua vez o NO inibiu a expressão desse gene em ambos os genótipos tanto em plantas infectadas como não infectadas com uma inibição mais evidente no mutante, principalmente no mutante infectado. O aumento da concentração de NO não acarretou nenhum efeito antagônico ou tóxico para a planta, apenas evidenciou o efeito produzido na concentração mais baixa, seguindo exatamente a mesma tendência.

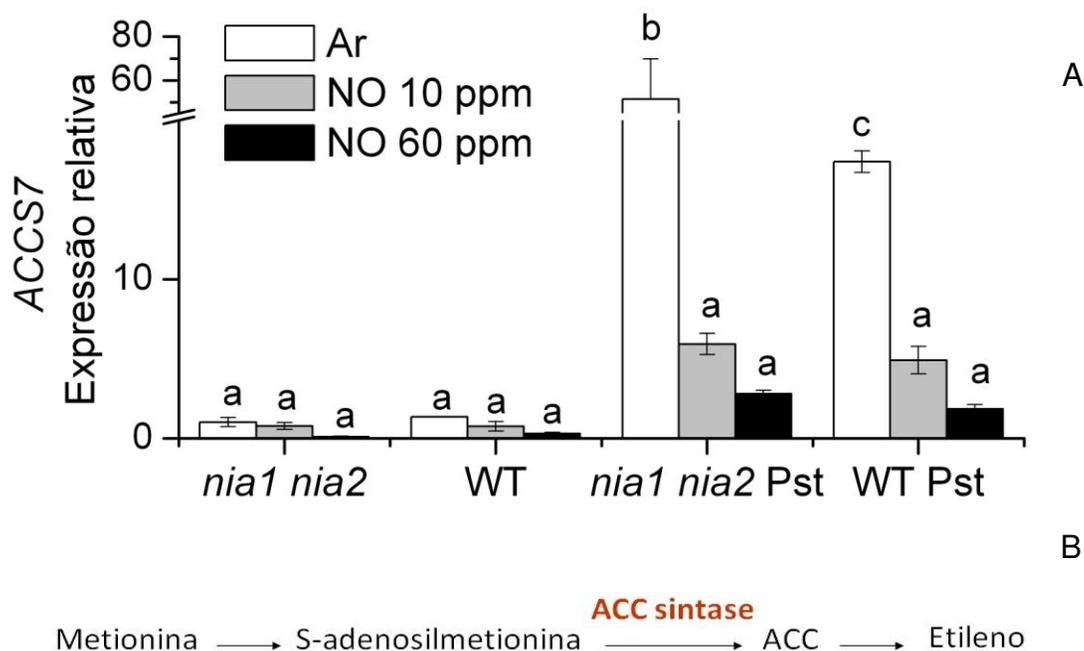


FIGURA 17: Expressão relativa, determinada por qRT PCR, do gene *ACCS7* em *Arabidopsis thaliana* selvagem e mutante *nia1 nia2* e esquema da via de biossíntese de etileno.

(A) Folhas de plantas selvagem e mutante foram inoculadas com a bactéria *P. syringae* ou seu controle $MgCl_2$ e fumigadas com gás NO (10 e 60 ppm) ou ar comercial puro. A expressão gênica foi analisada após 12 h de tratamento. **(B)** Esquema representativo da via de biossíntese de etileno. As barras indicam médias \pm SE (n=4). Valores que diferem significativamente de acordo com one-way ANOVA ($P < 0,05$) seguido do teste Tukey estão marcados com letras diferentes.

5 DISCUSSÃO

O NO vem despontando como um radical sinalizador essencial para os vegetais e sua relevância na defesa da planta contra o ataque de patógenos está sendo cada vez mais reconhecida (Delledonne et al. 1998; Romero-Puertas et al. 2004). Um evento chave na ativação da imunidade da planta é a alteração transiente da transcrição gênica e da homeostase redox da célula. NO vem emergindo como um elemento chave na coordenação dessas alterações necessárias para o estabelecimento da resistência (Delledonne et al. 1998; Parani et al. 2004; Ferrarini et al. 2008).

Trabalhos anteriores de nosso laboratório mostraram que o mutante de *A. thaliana* duplo-deficiente para a NR (*nia1 nia2*) é susceptível à bactéria *P. syringae*, apresentando HR prejudicada (Modolo et al 2006), e que essa susceptibilidade não é devida à síntese deficiente de aminoácidos (Oliveira et al, 2009), mas sim de NO (Modolo et al. 2005, 2006). No presente trabalho, a fumigação de plantas *nia1 nia2* com o gás NO reduziu os sintomas da evolução da doença e o crescimento bacteriano a níveis semelhantes ao do selvagem, tornando o mutante capaz de resistir a infecção (Figuras 7 e 8). Desse modo reforçamos que o NO é essencial para a resposta de defesa no mutante de *A. thaliana nia1 nia2*.

A capacidade do mutante *nia1 nia2* em responder à infecção da bactéria através da alteração na transcrição de genes relacionados à defesa foi avaliada e comparada com a resposta do selvagem e da fumigação com o gás NO. O mutante *nia1 nia2* foi capaz de alterar a expressão de diversos genes relacionados à defesa, embora em alguns casos a intensidade de resposta tenha sido menor em relação à resposta da planta selvagem. A inoculação da bactéria aumentou de forma significativa a expressão de genes de defesa da via do ácido salicílico (SA), *PR1*, embora a indução de *PR1* tenha sido muito mais intensa e rápida na planta selvagem (Figura 6). Os resultados mostraram que a inoculação da bactéria leva a um aumento na indução de *PR1* muito maior no selvagem do que na planta mutante após 6 horas de inoculação (250 versus 50 vezes) (Figura 6C). Todavia, quando as plantas infectadas foram fumigadas com NO houve uma diminuição na expressão de *PR1* em ambos os genótipos (Figura 6B), além de outros genes da via do SA que também foram reprimidos em plantas *nia1 nia2*

infectadas (Figura 4). Mesmo assim, a planta mutante foi capaz de reduzir os sintomas da infecção demonstrando resistência ao patógeno (figura 8 A e B).

O efeito atenuador do NO na expressão de genes de defesa deve resultar de sua ação bactericida, diminuindo o inóculo efetivo da bactéria na planta (Figura 8C). Analisando os resultados da figura 8D podemos sugerir que esse efeito bactericida do NO seria em conjunto com o H₂O₂. Interessantemente, folhas do mutante *nia1 nia2* foram capazes de produzir H₂O₂ em resposta ao patógeno, apesar de o padrão temporal de produção desse composto ter sido diferente do observado em plantas do genótipo selvagem (Figura 9). Todavia, o crescimento bacteriano nas folhas *nia1 nia2* só foi prevenido após a fumigação com NO (Figura 7). Assim, somente o aumento da produção de H₂O₂ não é suficiente para tornar a planta resistente, sendo necessário também o NO. Esses resultados estão de acordo com trabalhos que mostram que somente o aumento de ROS não é suficiente para induzir a resistência na planta (Grant and Loake 2000). É importante dizer que esse balanço de NO e H₂O₂ já foi mostrado ser crucial para causar morte da célula vegetal (HR) durante a resposta de defesa da planta (Delledone et al. 2001). Contudo, no presente trabalho foi observada a ação conjunta dessas duas moléculas para provocar a morte direta da bactéria, o que já foi observado em animais (MacMicking 1997), e não somente da célula do hospedeiro.

Estes resultados são bastante interessantes, pois demonstram que na presença de NO, a expressão dos genes de defesa são atenuados, o que deve ter um efeito benéfico para a planta que evitaria desperdício energético durante a resposta de defesa. Essa hipótese está de acordo com dois importantes trabalhos da literatura (Tada et al. 2008; Wang et al. 2009), que sugeriram que o NO induz mecanismos que levariam a um controle por “feedback” negativo da resposta de defesa, evitando a depleção de recursos e maiores prejuízos para processos essenciais do crescimento e desenvolvimento vegetal e da adaptação das plantas ao meio onde vivem. Em seu estudo, Tada e colaboradores (2008) demonstraram que a S-nitrosilação de NPR1 favorece a oligomerização dessa proteína, atenuando a transcrição de genes de defesa. Já Wang e colaboradores (2009) verificaram que a S-nitrosilação de SABP3, uma proteína ligante de ácido salicílico, também contribui para a atenuação da resposta de defesa em *A. thaliana*.

A expressão de genes como *PAL1* e *CAD1* também foram induzidas pela bactéria nos dois genótipos (Figuras 10 e 11), reforçando a idéia de que a suscetibilidade da *nia1 nia2* não se deve a expressão prejudicada desses genes de defesa. A expressão de *PAL1* foi induzida pelo patógeno e pelo NO (Figura 10), o que é consistente com o papel dos compostos derivados da via dos fenilpropanóides na defesa das plantas (Dixon and Paiva 1995). Além disso, o NO antecipou a expressão de *PAL1* em resposta ao patógeno. Na presença de NO sua expressão é estimulada decorrida apenas 1 h após a infecção, o que evidencia a importância do NO em ativar a via dos fenilpropanóides. Entretanto, diferentemente do observado para *PR1*, não houve diferença na expressão de *PAL1* entre selvagem e mutante (Figura 10).

O NO e o patógeno também tiveram o interessante efeito de estimular a expressão de *CAD1* (Figura 11), o que sugere que esses tratamentos poderiam estimular a síntese de lignina, para criar uma barreira mais rígida e seus monolignóis precursores, os quais poderiam funcionar como defesas químicas (Vorwerk et al. 2004; Naoumkina et al. 2010). Consistente com esta hipótese folhas do genótipo selvagem apresentaram um conteúdo de lignina maior em relação ao mutante (Figuras 12 e 13), sugerindo um possível papel do NO oriundo da atividade NR em estimular a biossíntese desse composto, talvez mediante regulação de expressão gênica. Seria necessária a análise do conteúdo de lignina em plantas tratadas com o gás NO para confirmar esse resultado. Ainda, de modo bastante interessante o NO pode possuir um papel importante não somente na quantidade de lignina total produzida, mas interferindo na composição desse composto, uma vez que plantas *nia1 nia2* apresentaram maior proporção de unidades G em sua composição (Figura 14). Trabalho recente de nosso grupo (Santos-Filho et al. 2012) mostrou que a conversão de sinapoilglicose (SG) em sinapoilmalato (SM), catalisada pela enzima sinapoilglicose:malato sinapoiltransferase (SMT) é prejudicada no mutante *nia1 nia2*. A atividade prejudicada da SMT no mutante *nia1 nia2* foi atribuída aos baixos níveis de NO na planta. Como consequência, o SM, que é um dos produtos finais da via dos fenilpropanóides em *A. thaliana*, é acumulado na planta selvagem, mas não no mutante. Em vista dos presentes resultados sobre a composição de lignina, é possível que a deficiência na via dos

sinapaldeídos no mutante *nia1 nia2*, provoque um desvio para a formação de lignina a partir de outros precursores, como o coniferaldeído.

Já foi demonstrado que em trigo o aumento de lignina em resposta ao ataque de um patógeno biotrófico, é devido somente ao acúmulo de subunidades siringil, sugerindo um papel importante do tipo de composição da lignina para uma resposta de defesa eficaz (Menden et al. 2007). São necessários estudos com outras técnicas que confirmem esses resultados, de modo a reforçar a hipótese de que o NO interfere na biossíntese de lignina. Além disso o gene *CAD1* faz parte de uma família multigênica composta por 9 genes, cujas funções ainda não estão muito bem elucidadas (Raes et al. 2003; Sibout et al. 2003) e já foi mostrado que há redundância de expressão entre alguns genes (Sibout et al. 2005). Ainda o silenciamento de um único gene que codifica para uma das enzimas atuantes na via de biossíntese de lignina não resulta em diferenças na quantidade de lignina total (Eudes et al. 2006), sendo assim, uma vez que a via de biossíntese de lignina constitui uma rede bastante complexa e interligada (Figura 11B), seria interessante analisar a expressão do conjunto de *CADs* para avaliar mais profundamente como esses genes são alterados no mutante *nia1 nia2* e qual o efeito do NO nessa regulação.

Atualmente sabe-se que a resposta ao estresse biótico envolve também a sinalização hormonal e que as cascatas são ativadas de maneira diferente na resposta a patógenos biotróficos e necrotróficos. Assim, na resposta de resistência a patógenos biotróficos as vias de sinalização SA, ABA, GA, BR regulam de maneira positiva enquanto que as vias de JA, ET, AUX, CK regulam negativamente a resistência da planta (Bari and Jones 2009). De acordo com isto, a inoculação de *P. syringae* alterou a expressão de genes da via da auxina (*TIR1*, *GH3*, *ILL*) de modo a inativar a sinalização do hormônio (Figura 16), uma forma de a planta reduzir o crescimento na folha infectada e poupar energia que será investida na ativação de mecanismos de defesa. Já foi mostrado que plantas deficientes na produção de auxina poderiam se tornar mais resistentes a patógenos (Navarro et al. 2006) e o fato do NO também inibir a via das auxinas está de acordo com o papel do NO no estabelecimento da resistência da planta. Já em raízes observou-se que o NO parece atuar regulando positivamente a via da auxina e estimulando a formação de pelos radiculares (Lombardo et al. 2006). Esses

resultados sugerem que o papel do NO em estimular ou inibir a via da auxina depende do órgão da planta, folha ou raiz, em que exercerá sua função reguladora. Outro hormônio importante na resposta de defesa é o etileno (Van Loon et al. 2006a; Leon-Reyes et al. 2009), um importante hormônio vegetal envolvido no processo de senescência foliar e responsável pelo aspecto amarelado de folhas senescentes (Chen et al. 2012). A inoculação da bactéria induziu a expressão de genes da síntese de etileno, enquanto a fumigação com NO reprimiu sua expressão tanto na selvagem como na mutante (Figura 17). Existem na literatura resultados discrepantes em relação à função do etileno durante a interação planta-patógeno. O aumento na produção de etileno no local da infecção pode estar associado a ativação da percepção do patógeno pela planta e contribuir para o estabelecimento da resistência, mas também há resultados em que plantas mutantes incapazes de produzir etileno ficam mais resistentes a bactéria *Pseudomonas syringae*. O etileno quando aplicado antes da infecção promove a resistência da planta, contudo se aplicado durante ou após a infecção favorece a proliferação do patógeno. Em se tratando de um gás que pode se difundir facilmente entre as células é possível que o aumento do etileno no local da infecção se espalhe para as células vizinhas o que as ajudaria a conter a infecção (Revisado por Van loo 2006). O NO através da inibição da síntese de etileno pode prevenir que um processo de senescência descontrolado se espalhe através de folhas não infectadas. De fato, a clorose observada em *nia1 nia2* infectadas foi prevenida nas plantas tratadas com NO (Figura 8A e B), então o NO parece modular o efeito do etileno durante a resposta de defesa da planta opondo-se ao efeito senescente do etileno em folhas infectadas. Outros trabalhos já mostraram que o NO possui o papel de inibir o etileno em frutos e em folhas, retardando seu amadurecimento e senescência (Manjunatha et al. 2010)

Esses resultados sugerem também que o nível basal de NO mantido pela atividade NR, seria importante em atenuar gastos energéticos associados a modulação das vias de sinalização de hormônios relacionadas com SA para o estabelecimento da resistência (Spoel and Dong 2008). Ainda, a expressão de *ACCS7* em resposta a infecção foi mais intensa em *nia1 nia2* (Figura 17). O mesmo padrão foi observado no gene da via da auxina *GH3*, cuja indução foi mais intensa em *nia1nia2* (Figura 15).

Em resumo, as análises de expressão gênica mostraram que vários dos genes envolvidos na resposta de defesa tiveram sua expressão modulada em folhas de *A. thaliana* selvagem e NR-deficiente de maneira a induzir a resistência à infecção de *P. syringae*. Apesar disto, a inoculação da bactéria no mutante resulta numa evolução dos sintomas muito mais intensa que no selvagem, ocorrendo espalhamento do patógeno na planta. Quando a *nia1 nia2* é infectada e fumigada com o gás NO, ainda que apresentando sintomas reduzidos da doença, a expressão dos genes *PRs* é inibida. A atenuação da resposta de defesa mediada por SA pode estar relacionada a um efeito microbicida direto do NO em conjunto com o H₂O₂, além do papel regulatório da S-nitrosilação (Spoel and Loake, 2011). Ainda, na planta selvagem a expressão de outros genes de defesa relacionados a vias hormonais foi atenuada, sugerindo que a manutenção da atividade NR e, conseqüentemente, de níveis basais de NO mais elevados (Modolo et al. 2005), resulta num menor gasto energético durante a resposta de defesa. Em conjunto, os resultados demonstram o importante papel da NR na modulação dos mecanismos de resistência das plantas a patógenos, mediados por NO.

6 CONCLUSÕES

- O presente trabalho demonstrou que a susceptibilidade de plantas de *Arabidopsis thaliana nia1 nia2* é devida a seus baixos níveis de NO, uma vez que a fumigação com NO conferiu resistência a planta infectada.
- O NO é importante para modular a expressão de vários genes independentemente da infecção por *P. syringae* como no caso da *PR1*, *CAD1* e *PAL1*.
- Em plantas inoculadas com *P. syringae* o NO exerce um efeito microbicida juntamente com H₂O₂ que diminui o inóculo. Esse efeito sinérgico do NO com H₂O₂ na indução de morte celular durante a HR é bem estabelecido, mas neste trabalho foi demonstrado que o NO possui um efeito microbicida direto que permite a atenuação da expressão dos genes relacionados à defesa *PR1* e *PAL1*. Essa resposta pode ser importante para prevenir o desperdício de energia durante a resposta de defesa.
- O NO modulou a expressão de genes envolvidos na via de sinalização da auxina, de modo a inibi-la, o que poderia prevenir o gasto de energia, que seria utilizado para o crescimento, durante a resposta de defesa.
- O NO também inibiu a expressão de gene relacionado a biossíntese de etileno. Esse hormônio é conhecido por atuar no processo de senescência foliar induzindo o envelhecimento de folhas o que pode favorecer o processo de infecção. A inibição desse hormônio poderia retardar o processo de envelhecimento celular e também o desenvolvimento da infecção.

- O mutante *nia1 nia2*, que possui níveis endógenos mais baixos de NO, apresentou menor quantidade de lignina total em suas folhas e diferença em sua composição nos caules, reforçando a hipótese de envolvimento do NO na biossíntese de lignina, talvez mediante a regulação da expressão gênica.

REFERÊNCIAS

- Adie BA, Pérez-Pérez J, Pérez-Pérez MM, Godoy M, Sánchez-Serrano JJ, Schmelz EA, Solano R (2007) ABA is an essential signal for plant resistance to pathogens affecting JA biosynthesis and the activation of defenses in Arabidopsis. *Plant Cell* 19: 1665-1681
- Ahuja I, Kissen R, Bones AM (2012) Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci* 17: 73-90
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* 357: 593-615
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 3203-3207
- Barber MS, Ride JP (1988) A quantitative assay for induced lignification in wounded wheat leaves and its use to survey potential elicitors of the response. *Physiol. Mol Plant Pathol.* 32:185-197
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol* 69: 473-488
- 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. *Plant Cell* 19: 148-162
- Bethke PC, Badger MR, Jones RL (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16: 332-341
- Boccardo M, Mills CE, Zeier J, Anzi C, Lamb C, Poole RK, Delledonne M (2005) Flavohaemoglobin HmpX from *Erwinia chrysanthemi* confers nitrosative stress tolerance and affects the plant hypersensitive reaction by intercepting nitric oxide produced by the host. *Plant J* 43: 226-237
- Boller T, He SY (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742-744
- Cecconi D, Orzetti S, Vandelle E, Rinalducci S, Zolla L, Delledonne M (2009) Protein nitration during defense response in *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 30: 2460-2468
- Chen L, Auh C, Chen F, Cheng X, Aljoe H, Dixon RA, Wang Z (2002) Lignin deposition and associated changes in anatomy, enzyme activity, gene expression, and ruminal degradability in stems of tall fescue at different developmental stages. *J Agric Food Chem* 50: 5558-5565
- Chen GH, Chan YL, Liu CP, Wang LC (2012) Ethylene response pathway is essential for ARABIDOPSIS A-FIFTEEN function in floral induction and leaf senescence. *Plant Signal Behav* 7: 457-460

- Cooper CE (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochim Biophys Acta* 1411: 290-309 del Río LA, Corpas FJ, Barroso JB (2004) Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783-792
- Czechowski T, Stitt M, Altman T, Udvardi MK, Scheible WR (2005) Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 139:5-17
- de Oliveira, H.C. (2010) Tese de doutorado em Biologia Funcional e Molecular, Campinas, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- de Wit, P.J. (2007) How plants recognize pathogens and defend themselves. *Cell and Mol Life Sci* 64: 2726-2732.
- Delaux P-M, Nanda AK, Mathé C, Sejalon-Delmas N, Dunand C (2012) Molecular and biochemical aspects of plant terrestrialization. *Persp in Plant Eco, Evo and Syst* 14: 49-59
- Delledonne M, Xia Y, Dixon RA, Lamb C (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588
- Delledonne M, Zeier J, Marocco A, Lamb C (2001) Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13454-13459
- Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S (2002) A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 16314-16318
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 10328-10333
- Durrant WE, Dong X (2004) Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* 42: 185-209
- Eudes A, Pollet B, Sibout R, Do CT, Séguin A, Lapierre C, Jouanin L (2006) Evidence for a role of AtCAD 1 in lignification of elongating stems of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 225: 23-39
- Fan W, Dong X (2002) In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 1377-1389
- Feechan A, Kwon E, Yun BW, Wang Y, Pallas JA, Loake GJ (2005) A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8054-8059
- Ferrarini A, De Stefano M, Baudouin E, Pucciariello C, Polverari A, Puppo A, Delledonne M (2008) Expression of *Medicago truncatula* genes responsive to nitric oxide in pathogenic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 781-790
- Furchgott RF, Zawadzki JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373-376

- Gao Y (2010) The multiple actions of NO. *Pflugers Arch* 459: 829-839
- Gay C, Collins J, Gebicki JM (1999) Determination of hydroperoxides by the ferric-xylenol orange method. *Redox Rep* 4: 327-328
- Gouvêa CMCP, Souza JF, Magalhães ACN, Martins IS (1997) NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regul* 21:183-87
- Grant JJ, Loake GJ (2000) Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiol* 124: 21-29
- Gupta KJ (2011) Protein S-nitrosylation in plants: photorespiratory metabolism and NO signaling. *Sci Signal* 4: jc1
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT (2011) On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci* 16: 160-168
- Hermes-Lima M, Willmore WG, Storey KB (1995) Quantification of lipid peroxidation in tissue extracts based on Fe(III)xylenol orange complex formation. *Free Radic Biol Med* 19: 271-280
- Hong JK, Yun BW, Kang JG, Raja MU, Kwon E, Sorhagen K, Chu C, Wang Y, Loake GJ (2008) Nitric oxide function and signalling in plant disease resistance. *J Exp Bot* 59: 147-154
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 9265-9269
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Kazan K, Manners JM (2009) Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci* 14: 373-382
- Kim SO, Merchant K, Nudelman R, Beyer WF, Keng T, DeAngelo J, Hausladen A, Stamler JS (2002) OxyR: a molecular code for redox-related signaling. *Cell* 109: 383-396
- Kunkel BN, Bent AF, Dahlbeck D, Innes RW, Staskawicz BJ (1993) RPS2, an Arabidopsis disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*. *Plant Cell* 5: 865-875
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 54: 109-136
- Lamb C, Dixon RA (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 251-275
- Lea, PJ (1993) Nitrogen Metabolism. In: Lea PJ, Leegood RC (Eds.) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. New York, USA. Wiley. pp. 155-180.
- Leitner M, Vandelle E, Gaupels F, Bellin D, Delledonne M (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signalling in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12: 451-458

- Leon-Reyes A, Spoel SH, De Lange ES, Abe H, Kobayashi M, Tsuda S, Millenaar FF, Welschen RA, Ritsema T, Pieterse CM (2009) Ethylene modulates the role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in cross talk between salicylate and jasmonate signaling. *Plant Physiol* 149: 1797-1809
- Leshem YY, Wills RBH, Ku VV (1998) Evidence for the function of the free radical gas nitric oxide (NO[•]) as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 36:825–826
- Loake G (2001) Plant cell death: unmasking the gatekeepers. *Curr Biol* 11: R1028-1031
- Lombardo MC, Graziano M, Polacco JC, Lamattina L (2006) Nitric oxide functions as a positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 1: 28-33
- MacMicking JD (2009) Recognizing macrophage activation and host defense. *Cell Host & Microbe* 5:405-407
- Manjunatha G, Lokesh V, Neelwarne B (2010) Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnol Adv* 28: 489-499
- Menden B, Kohlhoff M, Moerschbacher BM (2007) Wheat cells accumulate a syringyl-rich lignin during the hypersensitive resistance response. *Phytochemistry* 68: 513-520
- Modolo LV, Augusto O, Almeida IM, Magalhaes 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 Science* 171: 34-40
- Mou Z, Fan W, Dong X (2003) Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 113: 935-944
- Mur LA, Carver TL, Prats E (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* 57: 489-505
- Mur LA, Kenton P, Lloyd AJ, Ougham H, Prats E (2008) The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J Exp Bot* 59: 501-520
- Naoumkina MA, Zhao Q, Gallego-Giraldo L, Dai X, Zhao PX, Dixon RA (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Mol Plant Pathol* 11: 829-846
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006) A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312: 436-439

- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008) Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321: 964-967
- 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 Sci* 176:105-111
- Palmieri MC, Sell S, Huang X, Scherf M, Werner T, Durner J, Lindermayr C (2008) Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J Exp Bot* 59: 177-186
- Parani M, Rudrabhatla S, Myers R, Weirich H, Smith B, Leaman DW, Goldman SL (2004) Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol J* 2: 359-366
- Peter G, Neale D (2004) Molecular basis for the evolution of xylem lignification. *Curr Opin Plant Biol* 7: 737-742
- Qiao W, Fan LM (2008) Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* 50: 1238-1246
- Raes J, Rohde A, Christensen JH, Van de Peer Y, Boerjan W (2003) Genome-wide characterization of the lignification toolbox in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1051-1071
- Robert-Seilaniantz A, Navarro L, Bari R, Jones JD (2007) Pathological hormone imbalances. *Curr Opin Plant Biol* 10: 372-379
- Robert-Seilaniantz A, Grant M, Jones JD (2011) Hormone crosstalk in plant disease and defense: more than just jasmonate-salicylate antagonism. *Annu Rev Phytopathol* 49: 317-343
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M (2004) Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cell Microbiol* 6: 795-803
- Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte 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. *Plant Cell* 19:4120-4130.
- Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD (1996) Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* 8: 1809-1819
- Sakai WS (1973) Simple method for differential staining of paraffin embedded plant material using toluidine blue o. *Stain Technol* 48: 247-249
- Santos-Filho_PR, Vitor SC, Frungillo L, Saviani EE, Oliveira HC, Salgado I (2012) Nitrate reductase- and nitric oxide-dependent activation of sinapoylglucose:malate sinapoyltransferase in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 53:1607-16

- Sibout R, Eudes A, Pollet B, Goujon T, Mila I, Granier F, Séguin A, Lapierre C, Jouanin L (2003) Expression pattern of two paralogs encoding cinnamyl alcohol dehydrogenases in *Arabidopsis*. Isolation and characterization of the corresponding mutants. *Plant Physiol* 132: 848-860
- Sibout R, Eudes A, Mouille G, Pollet B, Lapierre C, Jouanin L, Séguin A (2005) *CINNAMYL ALCOHOL DEHYDROGENASE-C* and *-D* are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 2059-2076
- Sokolovski S, Blatt MR (2004) Nitric oxide block of outward-rectifying K⁺ channels indicates direct control by protein nitrosylation in guard cells. *Plant Physiol* 136: 4275-4284
- Spoel SH, Dong X (2008) Making sense of hormone crosstalk during plant immune responses. *Cell Host Microbe* 3: 348-351
- Spoel SH, Dong X (2012) How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nat Rev Immunol* 12: 89-100
- Spoel SH, Loake GJ (2011) Redox-based protein modifications: the missing link in plant immune signalling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 358-364
- Spoel SH, Tada Y, Loake GJ (2010) Post-translational protein modification as a tool for transcription reprogramming. *New Phytol* 186: 333-339
- Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78: 931-936
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J (1992) Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258: 1898-1902
- Tada Y, Spoel SH, Pajerowska-Mukhtar K, Mou Z, Song J, Wang C, Zuo J, Dong X (2008) Plant immunity requires conformational changes [corrected] of NPR1 via S-nitrosylation and thioredoxins. *Science* 321: 952-956
- Tun NN, Livaja M, Kieber JJ, Scherer GF (2008) Zeatin-induced nitric oxide (NO) biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants of NO biosynthesis and of two-component signaling genes. *New Phytol* 178: 515-531
- van Loon LC, Geraats BP, Linthorst HJ (2006a) Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* 11: 184-191
- van Loon LC, Rep M, Pieterse CM (2006b) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162
- Vorwerk S, Somerville S, Somerville C (2004) The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* 9: 203-209
- Wang YQ, Feechan A, Yun BW, Shafiei R, Hofmann A, Taylor P, Xue P, Yang FQ, Xie ZS, Pallas JA, Chu CC, Loake GJ (2009) S-nitrosylation of AtSABP3 antagonizes the expression of plant immunity. *J Biol Chem* 284: 2131-2137

- Weng JK, Chapple C (2010) The origin and evolution of lignin biosynthesis. *New Phytol* 187: 273-285
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1991) Identification of the *Arabidopsis CHL3* gene as the nitrate reductase structural gene *NIA2*. *Plant Cell* 3: 461-471
- Wilkinson JQ, Crawford NM (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes *NIA1* and *NIA2*. *Mol Gen Genet* 239(1-2): 289-297
- Wilson ID, Neill SJ, Hancock JT (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell Environ* 31: 622-631
- Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Ann Bot* 95: 707-735
- Yamada T (1993) The role of auxin in plant-disease development. *Annu Rev Phytopathol* 31: 253-273
- 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
- Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang JG, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake GJ (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478: 264-268
- Yun BW, Spoel SH, Loake GJ (2012) Synthesis of and signalling by small, redox active molecules in the plant immune response. *Biochim Biophys Acta* 1820: 770-776
- Zeidler D, Zähringer U, Gerber I, Dubery I, Hartung T, Bors W, Hutzler P, Durner J (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15811-15816
- Zeier J, Delledonne M, Mishina T, Severi E, Sonoda M, Lamb C (2004) Genetic elucidation of nitric oxide signaling in incompatible plant-pathogen interactions. *Plant Physiol* 136: 2875-2886