

JULIANA KUROIWA ZERLIN

**Influência do óxido nítrico nos processos de
embebição e mobilização de reservas durante a
germinação e o desenvolvimento inicial de
plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e
Hymenaea courbaril L.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo

2011

JULIANA KUROIWA ZERLIN

**Influência do óxido nítrico nos processos de
embebição e mobilização de reservas durante a
germinação e o desenvolvimento inicial de
plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e
Hymenaea courbaril L.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. MARÍLIA GASPAR

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Zerlin, Juliana Kuroiva

Z58i Influência do óxido nítrico nos processos de embebição e mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e *Hymenaea courbaril* L. -- São Paulo, 2011.
101 p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2011
Bibliografia.

1. Germinação. 2. Óxido nítrico. 3. Reservas. I. Título

CDU: 581.142

DEDICO

Aos meus pais, Dorival e Julieta,

e ao meu irmão, Danilo.

*"A verdadeira viagem de descobrimento não
consiste em procurar novas paisagens,
e sim em ter novos olhos".*

(Marcel Proust)

Agradecimentos

À toda minha família, especialmente meus pais e meu irmão pelo apoio, carinho e amor durante todos os momentos da minha vida e por sempre incentivar os meus estudos e sonhos.

Ao meu namorado Roberto que participou durante toda esta etapa e que com toda a sua compreensão, amor e companheirismo sempre esteve ao meu lado me dando forças e apoio nos momentos mais difíceis.

À minha amada afilhada Giovanna que faz a minha vida mais feliz!

À Dra. Rosemeire A. Bom Personi que com o seu amor a ciência me serviu de inspiração e me ensinou o caminho da ciência.

À Pós-graduação do Instituto de Botânica pela oportunidade de realizar este trabalho.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica e ao Núcleo de Pesquisa em Sementes pelas facilidades oferecidas para a realização deste trabalho.

À Dra. Marília Gaspar, minha orientadora, por todo carinho, auxílio e aprendizado obtido durante esta etapa, mas principalmente pela confiança depositada em mim que possibilitou a realização deste sonho.

Ao pós doc. Danilo da Cruz Centeno pela colaboração em relação às análises do perfil metabólico das duas espécies e principalmente por todo o auxílio durante o mestrado.

Ao Dr. Luciano Freshi do Departamento de Botânica da USP pela colaboração nas extrações e quantificações de ABA.

Ao Dr. Eduardo Purgatto do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP pelo uso do CG e pelas quantificações de ABA.

À Dra. Patrícia Pinho Tonini pelo auxílio nas extrações da α -galactosidase.

Ao Dr. Cláudio José Barbedo e aos doutorandos João Paulo Naldi Silva e Edmir Vicente Lamarca pelo auxílio nas análises das taxas respiratórias.

À Dra. Sonia Machado de Campos Dietrich, ao Dr. Cláudio José Barbedo e ao Dr. Luciano Freshi pelas valiosas sugestões no exame de qualificação.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Ana Alice, Maria Aparecida e Mary Monteiro por todo auxílio durante o mestrado.

A todos os pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica por todo auxílio durante o mestrado.

À Dra. Márcia Regina coordenadora do projeto “Carboidratos de plantas tropicais como moduladores de processos ecofisiológicos e indicadores de respostas a estresses ambientais”.

Ao doutorando João Paulo Naldi Silva pela ajuda na curva de embebição, por todos os outros inúmeros auxílios durante o mestrado e pela amizade dedicada.

À doutoranda Vanessa Fátima de Oliveira por todos os auxílios, conversas e amizade durante este período. Muito Obrigada!

À doutoranda Ludmila Raggi pelas conversas, caronas, auxílios e amizade durante todos os momentos. Muito Obrigada pelo carinho!

À mestranda Emanuela de Oliveira Joaquim que com o seu jeitinho calmo de ser se tornou uma amiga muito especial. Obrigada pelo carinho, companhia e amizade dedicados!

À minha querida amiga, Bárbara Celeste Messa por todas as conversas, almoços, ajudas, companhia, preocupações, carinho e principalmente pela amizade durante todos os momentos. Espero sempre ter você ao meu lado!

Aos colegas e amigos do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, Alexandre, Aline, Ana Paula, Anderson, Athos, César, Cynthia, Daiane, Denise, Fabinho, Fernanda K., Fernanda M., Flávio, Glauco, Giulliana, Ivan, Janaina, Juliana Ruiz, Juliana Iura, Kássia, Kelly, Marina, Maura, Maurício, Raíssa, Rodrigo Cabral, Rodrigo Caccere, Rodrigo Sanches, Vanessa Costa e Vanessa Fuentes pelos momentos de alegria e pela agradável convivência e apoio.

A todas as minhas queridas amigas pelo apoio e amizade mesmo nos momentos de ausência. Amo vocês!

À FAPESP, pela bolsa de mestrado concedida e pelo financiamento do Projeto “Carboidratos de plantas tropicais como moduladores de processos ecofisiológicos e indicadores de respostas a estresses ambientais” (Processo: 05/04139-7), do qual este trabalho faz parte.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABA – Ácido abscísico

AIA – Ácido indol acético

BSTFA – Bis(Trimetilsilil)trifluoroacetamida

cDNA – DNA complementar

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CG-EM-MSI – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, com monitoramento seletivo de íons

CN – Cianeto

CO₂ – Gás carbônico

cPTIO – 2-[4-carboxifenil]-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

DMSO – Dimetilsulfóxido

GA₃ e GAs – Ácido giberélico

GSH – Glutationa

GSNO – S-nitroglutationa

IVG – Índice de Velocidade de Germinação

NAD(P)H – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida

NO – Óxido nítrico

NO₂ – Dióxido de nitrogênio

NO₂⁻ – Nitrito

NO₃⁻ – Nitrato

NOS – Óxido nítrico sintase

NR – Nitrato redutase

O₂ – Oxigênio

PAL – Enzima fenilalanina amônia-liase

POD – Enzima peroxidase

PRPC – Polissacarídeos de reserva de parede celular

PTIO – 2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido

QR – Quociente respiratório

RAS – Regras para Análise de Sementes

RFOs – Oligossacarídeos da série rafinose

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RSNO – S-nitrosotióis

SNAP - S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SNP – Nitroprussiato de sódio

λ – Comprimento de onda

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO GERAL

1. Óxido Nítrico: a molécula multifuncional.....	1
2. Biossíntese de NO em plantas.....	2
3. O papel do NO na germinação e crescimento inicial.....	4
4. O papel do NO na mobilização de reservas das sementes.....	7
5. <i>Sesbania virgata</i> e <i>Hymenaea courbaril</i> como modelos de estudo para entender a interação NO x PRPC.....	8
5.1. <i>Sesbania virgata</i>	8
5.2. <i>Hymenaea courbaril</i>	10

II. CAPÍTULO 1: Efeito de diferentes doadores de óxido nítrico sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e *Hymenaea courbaril* L.

1. Resumo.....	13
2. Introdução.....	14
3. Objetivo geral.....	16
3.1. Objetivos específicos.....	16
4. Materiais e métodos.....	16
4.1. <i>Sesbania virgata</i>	16
4.1.1. Material biológico.....	16
4.1.2. Padronização inicial.....	17
4.1.3. Forma de aplicação da solução doadora de NO.....	17
4.1.4. Efeito de diferentes soluções doadoras e concentrações das soluções na degradação das reservas.....	18
4.1.5. Efeito do número de aplicações das soluções de nitroprussiato de sódio sobre a degradação das reservas.....	19
4.2. <i>Hymenaea courbaril</i>	19
4.2.1. Material biológico.....	19
4.2.2. Padronização inicial.....	20
4.2.3. Efeito de diferentes soluções doadoras e concentrações das soluções sobre a germinação.....	20
4.2.4. Efeito do número de aplicações das soluções doadoras sobre a germinação.....	20
5. Resultados.....	21
5.1. <i>Sesbania virgata</i>	21
5.1.1. Efeito de diferentes concentrações e doadores de NO sobre sementes de <i>Sesbania virgata</i>	22
5.2. <i>Hymenaea courbaril</i>	30
5.2.1. Efeito de diferentes doadores e concentrações de NO sobre sementes de <i>Hymenaea courbaril</i>	30
6. Discussão.....	33
7. Conclusões.....	34

III. CAPÍTULO 2: Influência do óxido nítrico nos processos de embebição e mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de <i>Sesbania virgata</i> (Cav.) Pers.	
1. Resumo.....	37
2. Introdução.....	38
3. Objetivo geral.....	42
3.1. Objetivos específicos.....	42
4. Materiais e métodos.....	42
4.1. Material biológico.....	42
4.2. Condições de germinação e coleta do material.....	42
4.3. Análise da embebição de sementes de <i>S. virgata</i>	44
4.4. Testes de respiração das sementes.....	44
4.5. Extração e determinação das proteínas totais e atividade de α -galactosidase..	45
4.6. Extração e quantificação de ABA por CG-EM-MSI.....	46
4.7. Análise do perfil metabólico.....	47
4.8. Análise estatística.....	47
5. Resultados.....	48
5.1. Caracterização fisiológica.....	48
5.2. Degradação das reservas.....	50
5.3. Perfil metabólico.....	53
5.4. Conteúdo de ABA.....	55
6. Discussão.....	57
7. Conclusões.....	62
IV. CAPÍTULO 3: Influência do óxido nítrico sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de <i>Hymenaea courbaril</i> L.	
1. Resumo.....	64
2. Introdução.....	65
3. Objetivo geral.....	66
3.1. Objetivos específicos.....	67
4. Materiais e métodos.....	67
4.1. Material biológico.....	67
4.2. Efeito do NO sobre a germinação e desenvolvimento de raízes de <i>H. courbaril</i>	67
4.3. Quantificação do teor de celulose.....	67
4.4. Análise do perfil metabólico.....	68
4.5. Efeito do NO sobre a germinação de sementes de lotes diferentes.....	69
4.6. Análise estatística.....	69
5. Resultados.....	69
5.1. Efeito do NO sobre a germinação e desenvolvimento radicular.....	69
5.2. Efeito do NO na germinação de sementes de lotes com diferentes tempos de armazenamento.....	73
6. Discussão.....	74
7. Conclusões.....	77
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
VI. RESUMO.....	81

VII. ABSTRACT.....	83
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

I. INTRODUÇÃO GERAL

1. Óxido Nítrico: a molécula multifuncional

O óxido nítrico (fórmula $N=O$, abreviadamente NO) é um radical livre gasoso que se difunde rapidamente através das membranas, devido ao seu baixo peso molecular e qualidades lipofílicas. Por um longo período, o NO e o dióxido de nitrogênio (NO_2) foram considerados como sendo produzidos principalmente por descargas elétricas na atmosfera. Cerca de 30 a 40 anos atrás, o NO passou a ser reconhecido como um poluente atmosférico dos complexos NO_x (NO_2 e NO) produzidos por motores de carros e usinas de energia (Delledonne 2005).

Entre o final dos anos 80 e início da década de 90, houve uma revolução nas pesquisas com NO, devido a descoberta do seu papel fundamental na sinalização em células de mamíferos e na regulação de diversos processos fisiológicos (Ignarro *et al.* 1987, Palmer *et al.* 1987, Culotta & Koshland 1992). Em 1992, o NO foi reconhecido pela revista Science como a "molécula do ano" (Koshland 1992). Desde então, um grande número de trabalhos têm se dedicado a investigar as propriedades biológicas desta molécula presente em animais e plantas. Em 1998, três cientistas pioneiros (Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro e Farid Murrad) ganharam o Prêmio Nobel em Medicina por suas descobertas que demonstraram o papel do NO como molécula de sinalização no sistema cardiovascular.

O NO atua como uma molécula sinalizadora em humanos e animais e está envolvido em diferentes processos biológicos, tais como vasodilatação do sistema cardiovascular (Furchgott & Zawadzki 1980, Palmer *et al.* 1987), proteção contra a trombose e aterogênese através da inibição de monócitos e da adesão plaquetária (Radomski *et al.* 1987), proliferação de células musculares lisas (Garg & Hassid 1989), adesão de leucócitos (Salvemini *et al.* 1996), preservação da impermeabilidade vascular (Moncada 1997), manutenção do tônus vascular (Schmidt & Walter 1994) e reposta a infecções (Mayer & Hemmens 1997).

Trabalhos recentes têm demonstrado o envolvimento do óxido nítrico na sinalização hormonal (Guo *et al.* 2003) e em muitos outros processos biológicos em plantas, como fotomorfogênese (Pagnussat *et al.* 2003), resposta de defesa ao ataque de patógenos (Delledonne *et al.* 1998, Modolo *et al.* 2005, 2006) e orientação e crescimento do tubo polínico (Prado *et al.* 2004). O NO exerce um papel crucial na proteção das plantas contra diferentes estresses abióticos, como resposta de defesa ao poluente ozônio (Velikova *et al.* 2005, Ederli *et al.* 2006), redução da toxicidade do alumínio (Wang & Yang 2005) e salinidade (Zhao *et al.* 2007). Diversos experimentos nos quais plantas ou tecidos vegetais foram tratados com doadores de óxido nítrico apontam para a importância do NO em

processos como tropismos (Hu *et al.* 2005), floração (He *et al.* 2004), movimento estomático (Neill *et al.* 2008), senescência de folhas e cotilédones (Hung & Kao 2004, Jasid *et al.* 2009), crescimento vegetativo da parte aérea (Zhang *et al.* 2003), formação e diferenciação do xilema (Gabaldón *et al.* 2005), lignificação da parede celular (Ferrer & Ros-Barceló 1999, Bohm *et al.* 2010), formação de raiz (Pagnussat *et al.* 2003, Correa-Aragunde *et al.* 2004), crescimento de raízes adventícias (Tewari *et al.* 2008) e desenvolvimento de pelos radiculares (Lombardo *et al.* 2006). Vários estudos também têm focado na participação do NO durante processos que requerem a síntese de componentes da parede celular, como a divisão e expansão celular (Gouvêa *et al.* 1997, Pagnussat *et al.* 2002, Hu *et al.* 2005, Otvos *et al.* 2005, Correa-Aragunde *et al.* 2006) e diferenciação (Gabaldón *et al.* 2005, Lombardo *et al.* 2006).

2. Biossíntese de NO em plantas

Existem diversas vias propostas para a síntese de NO endógeno em plantas, sendo que a contribuição de cada via para a produção de NO é dependente da espécie, fase de desenvolvimento e do ambiente no qual as plantas são cultivadas (Neill *et al.* 2003). Nos mamíferos, a produção de NO é mediada principalmente pela enzima óxido nítrico sintase (NOS, EC. 1.14.13.39), que catalisa a conversão de L-arginina em L-citrulina e NO (Furchgott 1995) (Figura 1).

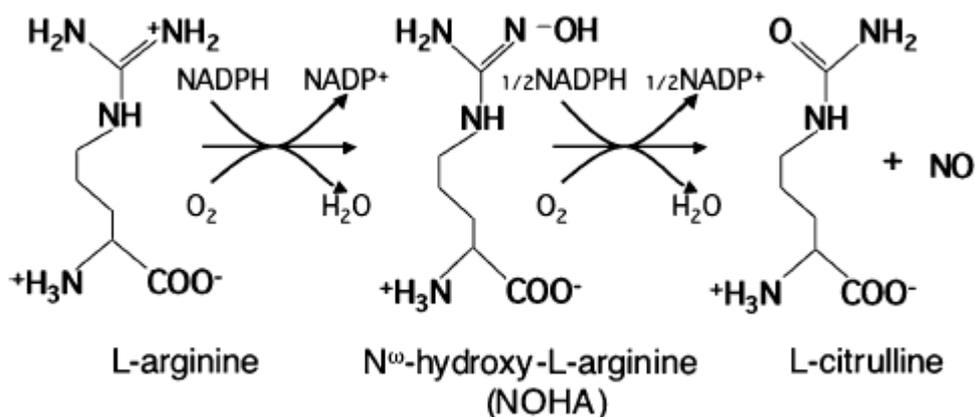


Figura 1. Reação catalisada pela NO sintase a partir de arginina, formando citrulina e óxido nítrico. Fonte: Crawford 2006.

A existência de enzimas de plantas ortólogas às NOS de animais tem sido postulada com base em ensaios bioquímicos com extratos vegetais, em que ocorre síntese de citrulina e NO dependente de arginina, que pode ser inibida pelos inibidores clássicos da NOS de mamíferos (Crawford 2006). Além da produção de NO, estes inibidores bloqueiam algumas respostas mediadas por NO, como o fechamento estomático induzido por ABA. Experimentos

com anticorpos anti-NOS de mamíferos que apresentaram reação com proteínas vegetais reforçam a hipótese da existência de enzimas NOS em plantas (Ribeiro *et al.* 2009). No entanto, análises proteômicas mostraram que estas proteínas não estão relacionadas às NOS de animais e sim com proteínas do tipo “heat shock” e enzimas glicolíticas (Butt *et al.* 2003). Além disso, nenhum gene ou proteína com similaridade de sequência com as NOS de animais foi identificado até o momento em plantas. O gene *AtNOS1*, isolado de *Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.* 2003), codifica uma proteína com atividade do tipo NOS, envolvida nos processos de sinalização hormonal, crescimento, floração (He *et al.* 2004) e respostas de defesa (Zeidler *et al.* 2004). No entanto, o fato da sequência desta proteína não apresentar similaridade com isoformas isoladas de animais tem suscitado dúvidas e críticas por parte dos pesquisadores da área. Por esta razão, Crawford e colaboradores (2006) sugeriram que esta proteína fosse designada como *AtNOA1* (de “nitric oxide associated”).

Além da arginina, a geração de NO a partir do nitrito pode ocorrer por vias enzimáticas e não enzimáticas (Fig. 2). A síntese não-enzimática do NO a partir de nitrito ocorre em pH ácido, na presença de agentes redutores, como o ácido ascórbico (Yamasaki *et al.* 1999). Este mecanismo foi evidenciado no apoplasto das camadas de aleurona de sementes de cevada (Bethke *et al.* 2004a). Recentemente, Modolo *et al.* (2005) demonstraram a produção de NO em extratos foliares de plantas mutantes de *Arabidopsis thaliana nia1nia2*, deficientes na síntese de NO, através do fornecimento exógeno de nitrito marcado radioativamente ($^{15}\text{NO}_2$).

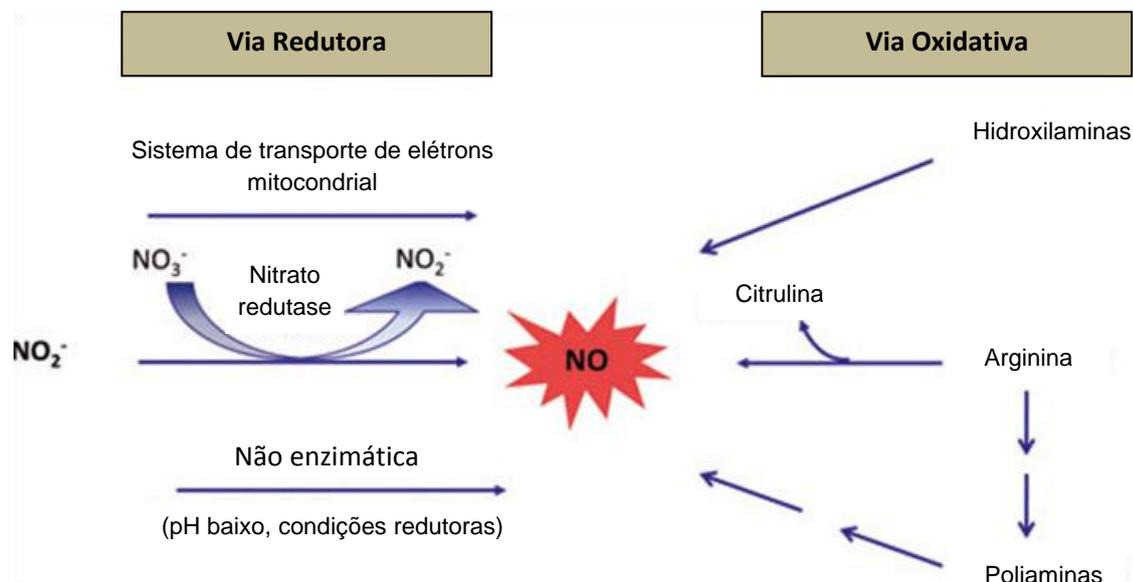


Figura 2. Principais vias de formação de NO em plantas. Evidências indicam a existência de uma via redutora e uma via oxidativa para a síntese de NO em plantas. O elétron necessário para reduzir o nitrito (NO_2^-) à NO pode ser fornecido pelo sistema de transporte de elétrons da mitocôndria, pelo NAD(P)H através da nitrato redutase ou em um ambiente ácido redutor. Também existem evidências, principalmente indiretas, alegando a existência de uma forma oxidativa de produção de NO em plantas. Embora vários substratos já tenham sido propostos

para a produção de NO por uma via enzimática, nenhuma enzima foi identificada até agora (Modificado de Moreau *et al.* 2010).

Outra fonte de NO em plantas resulta da atividade da enzima nitrato redutase (NR, EC 1.7.1.3), que está normalmente associada com a assimilação de nitrogênio, mas que pode gerar NO a partir de nitrito em uma reação dependente de NAD(P)H (Dean & Harper 1988, Klepper 1990, Rockel *et al.* 2002). A redução do nitrito a NO pela NR parece ser favorecida em condições anaeróbicas, na presença de altas concentrações de nitrito (Yamasaki *et al.* 1999, Yamasaki 2000). Além disso, estudos com o duplo mutante *nia1nia2* de *A. thaliana*, que possui apenas 0,5% de atividade de NR em relação às plantas selvagens, mostraram que estas plantas apresentam baixos níveis endógenos de NO, devido ao conteúdo reduzido dos substratos requeridos para sua síntese, nitrito e arginina (Modolo *et al.* 2006). Nestes mutantes, não há síntese de NO nas células-guarda e o fechamento estomático mediado por nitrito ou ABA é alterado (Desikan *et al.* 2002). Além disso, estes mutantes possuem maior susceptibilidade à infecção por *Pseudomonas syringae* (Modolo *et al.* 2006) e floração precoce devido à deficiência de NO na fase vegetativa (Seligman *et al.* 2008). A análise destes mutantes demonstra a importância da molécula de NO no desenvolvimento vegetal.

3. O papel do NO na germinação e crescimento inicial

A germinação das sementes é uma etapa crucial no ciclo de vida da planta, que se inicia com a absorção de água pela semente quiescente e termina com a protusão da radícula e o alongamento do eixo embrionário (Bewley 1997). O processo de germinação compreende diversos eventos como embebição, reativação do metabolismo, aumento na atividade respiratória, atividade enzimática e de organelas, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, hidratação das proteínas, mudanças estruturais e alongamento celular, que de modo integrado transformam a semente com baixo teor de água e metabolismo reduzido em uma semente com metabolismo vigoroso, culminando no crescimento do embrião (Bewley & Black 1994). A ausência de germinação em condições ambientais adequadas é denominada dormência e esta pode estar presente em diversos graus, na maioria das sementes de Angiospermas (Bewley 1997, Koornneef *et al.* 2002).

Os processos de quebra de dormência e germinação são modulados por diversos estímulos endógenos e externos. Alguns fatores ambientais, como a intensidade luminosa e baixas temperaturas (Holdsworth *et al.* 2008), e reguladores de crescimento vegetal, como ácido giberélico (GA₃), ABA e etileno (Bewley 1997, Nakajima *et al.* 2006, Carrera *et al.* 2008, Holdsworth *et al.* 2008) são conhecidos por influenciar o estado de dormência das

sementes. Muitos compostos exógenos reduzem a dormência das sementes, tais como o nitrato, nitrito, azida, cianeto e voláteis (Roberts 1972, Hendricks & Taylorson 1974, Hilhorst & Karssen 1992, Debeaujon *et al.* 2000, Flematti *et al.* 2004). Várias moléculas sinalizadoras, como o NO e algumas espécies reativas de oxigênio (ROS), também já foram relatadas como participantes destes processos (Batak *et al.* 2002, Bethke *et al.* 2004b, 2006a, Sarath *et al.* 2007). NO (Caro & Puntarulo 1999, Simontacchi *et al.* 2004), radicais hidroxila e radicais superóxido (Schopfer *et al.* 2001) são acumulados durante a germinação de sementes de várias espécies. No entanto, o local exato de síntese destas espécies reativas durante a germinação ainda não é conhecido, sendo que o eixo embrionário, o tegumento e a camada de aleurona foram considerados os prováveis locais de síntese destes compostos.

O NO e óxidos de nitrogênio relacionados já foram reportados como estimuladores da germinação de sementes. Sementes de *Paulownia tormentosa* necessitam de longos períodos na presença de luz para germinar. No entanto, um único pulso de luz vermelha foi suficiente para induzir a germinação destas sementes na presença de 10 mM de nitrato de potássio (Grubišić & Konjevic 1990). O nitroprussiato de sódio (SNP) e outros nitratos em sua forma orgânica e inorgânica também foram capazes de estimular a germinação, em concentrações ótimas variando entre 1 e 10 mM (Grubišić & Konjevic 1990, Grubišić *et al.* 1992). Estes autores sugerem que o efeito de compostos nitrogenados se deve a sua redução a NO e ao fato da quebra de dormência regulada pelo fitocromo estar fortemente relacionada ao estado redox. Batak e colaboradores (2002) demonstraram que o efeito do nitrato e/ou nitrito (precursores da síntese de NO) na germinação de sementes é mediado pelo fitocromo.

Os mecanismos pelos quais o NO estimula os processos de quebra de dormência e germinação ainda não foram completamente elucidados. O estímulo da germinação pelo NO foi demonstrado em sementes de alface (Beligni & Lamattina 2000). Na faixa de temperatura entre 26°C e 32°C, as sementes de alface precisam de luz para germinar. A dormência imposta pelo escuro foi quebrada pela aplicação de 100 µM de SNP ou SNAP, dois doadores de NO, assim como pela aplicação de GA₃ na mesma concentração. Os doadores de NO se mostraram mais eficazes na quebra de dormência de sementes de alface, tendo em vista que a embebição em concentrações inferiores de SNP (10 µM) induziu 50% de germinação, sendo que somente 2% das sementes germinaram na presença de GA₃ 10 µM. A dormência de sementes de alface não pôde ser quebrada em temperaturas acima de 34°C, sugerindo que o NO influencia somente a germinação mediada pela luz, sem efeito nos demais tipos de dormência. Estes autores também sugerem uma possível relação entre NO, luz e vias de sinalização de estresse em plantas (Beligni & Lamattina 2000).

A aplicação de compostos doadores de NO também estimula a germinação e crescimento radicular de tremoço (*Lupinus luteus*) (Kopyra & Gwozdz 2003) e induz a quebra de dormência em sementes de *Arabidopsis* e cevada (Bethke *et al.* 2004b, 2006a). Além disso, a concentração endógena de NO atinge seu máximo em eixos embrionários de sorgo de 24 a 30 horas após o início da embebição, o que coincide com o início da germinação (Simontacchi *et al.* 2004).

Outra hipótese seria o efeito direto do NO no teor endógeno de ABA. Bethke e colaboradores (2004b, 2006b) demonstraram que o NO é provavelmente um componente da via de sinalização que promove a quebra de dormência, diminuindo a sensibilidade das sementes ao ABA e reduzindo a dormência imposta pelo hormônio. Sarath e colaboradores (2006) demonstraram que a aplicação de SNP reverte parcialmente os efeitos inibitórios da aplicação de ABA sobre a germinação, o alongamento da radícula e a emergência do coleótilo em *Panicum virgatum*. Os autores sugerem que o NO pode ser um desencadeador endógeno direto do processo de quebra de dormência em algumas espécies de gramíneas. Além de seu papel como molécula sinalizadora, o NO atua como regulador transcricional, modulador da atividade de algumas proteínas e de canais iônicos em células vegetais, aumentando o teor de cálcio (Ca^{2+}) intracelular, que influencia a cascata de fosforilação de proteínas (Sokolovski *et al.* 2005). No caso específico de proteínas envolvidas no processo de germinação, o papel do NO ainda não foi esclarecido.

Proteínas de parede celular também estão envolvidas no processo de germinação de sementes, contribuindo com o desmonte da parede associado ao enfraquecimento do endosperma (mananases, galactosidases, etc) e com o processo de alongamento dos eixos embrionários (expansinas, celulose sintases) (Hernández-Nistal *et al.* 2006). Diversos autores postularam que espécies reativas de oxigênio (ROS) estariam envolvidas diretamente na extensão da parede celular durante o crescimento da plântula, por provocarem a cisão oxidativa dos polissacarídeos (Fry 1998, Schweikert *et al.* 2000, 2002, Schopfer *et al.* 2002, Liskay *et al.* 2003). Em trabalho recente, Correa-Aragunde e colaboradores (2008) demonstraram que o NO modula a síntese de celulose em raízes de tomate e que seu efeito é dose-dependente. Análises histológicas indicam que as modificações podem estar relacionadas com a síntese de parede primária. O nível de transcritos de dois genes de celulose sintase (*CesA*) foi reduzido na presença de NO, mas ainda não há uma distinção clara sobre a participação dessas proteínas no processo de síntese de celulose durante a germinação e de sua regulação pelo óxido nítrico.

4. O papel do NO na mobilização de reservas das sementes

Os principais carboidratos de reserva encontrados em sementes são a sacarose, os oligossacarídeos da série rafínosica (RFOs), o amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Buckeridge *et al.* 2004a).

Os RFOs possuem múltiplas funções em plantas. Eles atuam como carboidrato de transporte no floema (Ayre *et al.* 2003), como molécula crioprotetora (Sprenger & Keller 2000) e são acumulados durante o amadurecimento das sementes, tendo importante papel na aquisição de tolerância à dessecação e no armazenamento, sendo utilizados posteriormente como carboidratos de reserva no início da germinação (Horbowicz & Obendorf 1994). Relatos de efeitos diretos do NO sobre a mobilização de RFOs não estão disponíveis na literatura relacionada.

A sacarose é o principal carboidrato transportado dos órgãos fotossintéticos até a semente em desenvolvimento, e pode ser acumulada em grandes quantidades ao final do processo de maturação. Parte desta sacarose pode ser utilizada como substrato para a síntese de RFOs. Além disso, em altas concentrações a sacarose pode ter efeito crioprotetor direto sobre as membranas celulares, contribuindo para a tolerância à dessecação e ao congelamento em sementes de algumas espécies (Uemura & Steponkus 2003). Não são encontrados na literatura trabalhos que relatem o efeito do NO especificamente sobre a mobilização de sacarose em sementes, sendo este açúcar geralmente relacionado à mobilização de outros tipos de reserva. No entanto, Ganjewala *et al.* (2010) analisaram o efeito do NO na atividade das invertases ácida e alcalina, que hidrolizam sacarose, em plantas de *Cymbopogon flexuosus*. Os resultados mostraram rápida e substancial inibição da atividade das duas isoformas de invertase, sendo que o grau de inibição variou conforme a concentração de doador de NO utilizada.

O amido é particularmente bem adaptado à função de reserva, sendo mobilizado por hidrólise ou por mecanismos que envolvem a fosforilação direta de resíduos de glucose terminais (Bewley & Black 1994). O papel direto do NO em enzimas hidrolíticas que mobilizam amido foi demonstrado em trigo, sendo que na presença de solução doadora de NO foi observado um aumento de atividade da β -amilase (Zhang *et al.* 2005). A modulação da atividade da β -amilase pelo NO também foi observada em sementes de outras espécies, sendo que em cevada, milho, arroz e melancia este aumento de atividade foi relacionado à síntese de novas isoformas de β -amilase, enquanto em soja e *Arabidopsis* houve aumento de atividade de isoformas pré-sintetizadas nas sementes. Em contrapartida, o tratamento com GA₃ não induziu alterações na atividade da β -amilase. Embora um aumento da atividade de α -amilase

não tenha sido observado nas mesmas condições (Zhang *et al.* 2005), quando sementes de cevada previamente tratadas com GA₃ foram incubadas com doadores de NO, a taxa de síntese e secreção de α -amilase foi maior do que em sementes tratadas somente com GA₃ (Beligni *et al.* 2002).

Os polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) ocorrem principalmente em sementes e podem ser classificados em três grupos distintos: os mananos (mananos puros, glucomananos e galactomananos), os xiloglucanos e os galactanos (Buckeridge *et al.* 2000b). Estas substâncias são mobilizadas após a germinação, durante o desenvolvimento das plântulas, e seus produtos de degradação são usados para diferentes propósitos, tais como a geração de energia e a produção de proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e lipídeos utilizados na construção de novos tecidos e células (Mayer & Poljakoff-Mayber 1975).

Os PRPC, além da função de reserva de carbono, também desempenham funções secundárias sendo relacionados com a dureza do endosperma (mananos em endospermas), com o controle da embebição de água pela semente (xiloglucanos em cotilédones e galactomananos em endospermas) e com a regulação da expansão celular (galactanos nos cotilédones) (Buckeridge *et al.* 2000b).

Com relação às sementes que acumulam polissacarídeos de reserva de parede celular, o efeito do NO sobre as enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de degradação destas reservas, durante a germinação e o início do desenvolvimento, ainda não foi estudado.

5. *Sesbania virgata* e *Hymenaea courbaril* como modelos de estudo para entender a interação NO x PRPC

Nos biomas Cerrado e Mata Atlântica, as espécies apresentam diversas estratégias de adaptação e muitas delas envolvem os carboidratos de reserva. Diversas leguminosas arbóreas da Mata Atlântica, entre elas *Sesbania virgata* (Faboideae) e *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae), apresentam altas proporções de polissacarídeos de parede celular como reserva em suas sementes, que são mobilizados após a germinação, fornecendo carbono e energia para o crescimento inicial da plântula (Buckeridge *et al.* 2000a).

5.1. *Sesbania virgata*

Sesbania virgata (Cav.) Pers., pertence à família Leguminosae (Fabaceae), sub-família Faboideae (Papilionoideae) (Lavin 1987, Judd *et al.* 1999, Kissmann & Groth 1999) e possui alguns sinônimos como *Aeschynomene virgata* (Cav.), *Coronilla virgata* (Cav.) Willd. e *Sesbania marginata* Benth. (Kissmann & Groth 1999). A espécie é conhecida popularmente como sarazinho, mãe-josé e feijão-do-mato e distribui-se pelas regiões Sul, Sudeste e Centro-

Oeste do Brasil, além do Paraguai, Uruguai, norte e nordeste da Argentina (Kissmann & Groth 1999, Lisboa 2003). *S. virgata* é uma espécie pioneira, infestante, perene, reproduzida por semente, com hábito arbustivo que pode atingir de 2 a 4 m de altura (Fig. 3). Ocorre em matas de galerias de regiões tropicais e está associada com os estágios iniciais da sucessão ecológica (Potomati & Buckeridge 2002).

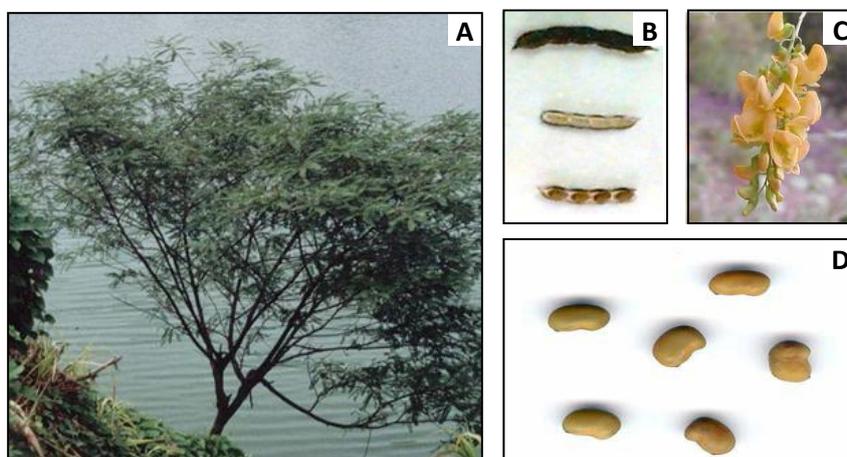


Figura 3. Arbusto (A), fruto maduro com sementes (B), flores (C) e sementes (D) de *Sesbania virgata*.

Esta espécie também é encontrada em locais muito úmidos ou alagados, principalmente em solos modificados e, apesar de não ser espécie predominante em suas áreas de ocorrência, desequilíbrios no manejo destas áreas podem determinar um aumento no número de espécimes (Kissmann & Groth 1999). Além disto, devido a sua alta tolerância a condições de baixa oxigenação e deficiências minerais do solo, ao seu crescimento rápido e sua propagação por sementes, esta espécie apresenta grande potencial para revegetação de áreas degradadas sujeitas a inundações periódicas (Zayat 1996).

As sementes de *S. virgata* (Fig. 3D) apresentam dormência tegumentar e endosperma que acumula galactomanano como polissacarídeo de reserva de parede celular. O processo germinativo em sementes de *Sesbania virgata* ocorre até o segundo ou terceiro dias após a embebição (Buckeridge & Dietrich 1996, Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2007). A mobilização do galactomanano ocorre após a germinação e envolve três enzimas hidrolíticas (α -galactosidase, endo- β -mananase e exo- β -manosidase) (Buckeridge *et al.* 2000a). A presença deste polissacarídeo em *S. virgata* já foi associada às propriedades mecânicas do endosperma e protrusão da radícula e com o controle da embebição nos estágios iniciais da germinação (Tonini *et al.* 2006, 2007).

S. virgata se apresenta como bom modelo de estudo para avaliar os efeitos do NO devido à grande disponibilidade de sementes e germinação rápida, além de amplo conhecimento do processo de degradação das reservas da semente (Buckeridge & Dietrich

1996, Tonini *et al.* 2006, 2007). Além disso, a germinação destas sementes é bastante homogênea, algo pouco comum entre sementes de plantas nativas.

5.2. *Hymenaea courbaril*

Hymenaea courbaril L. var. *stilbocarpa*, popularmente conhecido como jatobá ou jataí é uma espécie pertencente à família Leguminosae (Fabaceae), subfamília Caesalpinoideae. O jatobá é uma espécie arbórea que pode atingir até 30 metros de altura e que apresenta ampla distribuição geográfica neotropical, relatada desde o sul do México até a Venezuela. No Brasil a espécie pode ser encontrada desde o Piauí até o norte do Paraná, sendo típica de floresta madura e primária, e considerada espécie secundária tardia (ou clímax) na sucessão florestal (Langenheim *et al.* 1973, Lee & Langenheim 1975). A sua madeira é empregada na construção civil, para acabamentos internos e fabricação de móveis, e seus frutos contêm uma farinha comestível muito nutritiva, consumida tanto pelo homem como pelos animais silvestres (Lorenzi 1992).

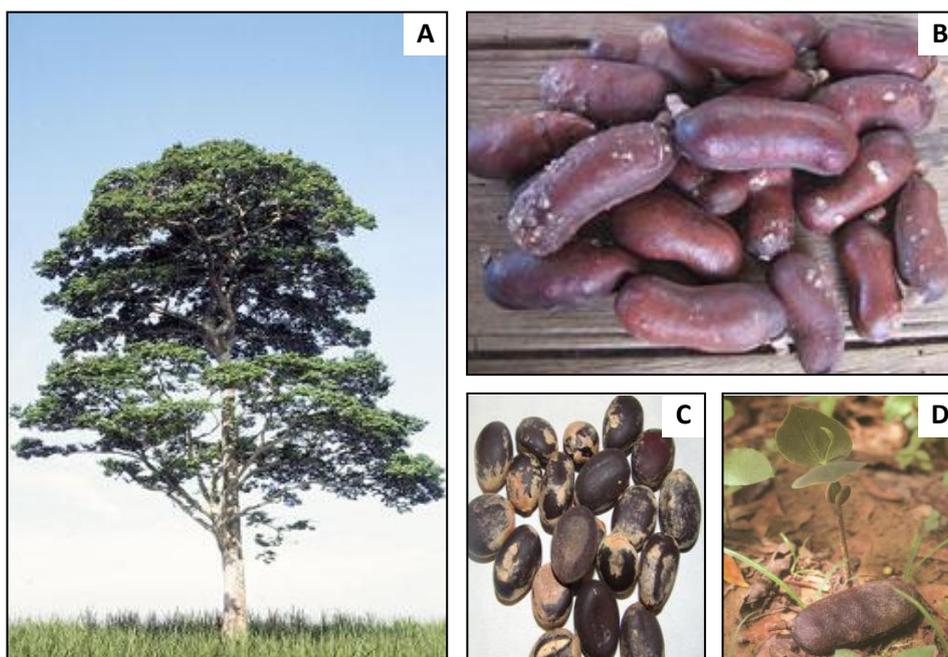


Figura 4. Árvore (A), frutos (B), sementes (C) e plântula (D) de *Hymenaea courbaril*.

As sementes de *H. courbaril* são grandes e possuem cotilédones globóides não-fotossintetizantes ricos em reservas (Buckeridge & Dietrich 1990). Estas sementes também apresentam dormência por impermeabilidade do tegumento, que garante maior longevidade, permitindo a sua germinação mesmo após ter decorrido muito tempo da dispersão. As sementes de *H. courbaril* são compostas por aproximadamente 40% de xiloglucano, 20% de proteína e 2-4% de rafinose/sacarose (Tiné *et al.* 2000). A mobilização do xiloglucano dos

cotilédones de *H. courbaril* acontece entre 40 e 70 dias após a germinação, juntamente com o desenvolvimento da plântula, configurando uma reserva pós-germinativa (Tiné *et al.* 2000).

A espécie em estudo tem grande importância florestal e ambiental pelo potencial que tem como fixadora e armazenadora de carbono, além de sua beleza paisagística e importância econômica.

S. virgata e *H. courbaril* são espécies nativas que vem sendo estudadas há muitos anos pelos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica. Vale ressaltar que, diferentemente de espécies modelo como arroz, milho, *Populus* e *Arabidopsis*, que são amplamente estudadas e possuem seu genoma completamente seqüenciado, são raras as informações acerca do comportamento fisiológico, do perfil bioquímico e dos genomas das espécies nativas. Dentro deste contexto, estudos multidisciplinares que contemplem a caracterização de parâmetros fisiológicos e bioquímicos podem fornecer subsídios para estudos futuros de conservação, visto que a expressão do genoma está diretamente relacionada com o ambiente no qual as espécies se desenvolvem.

CAPÍTULO 1

Efeito de diferentes doadores de óxido nítrico sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. e *Hymenaea courbaril* L.

1. RESUMO

O óxido nítrico é um radical livre inorgânico e um mensageiro biológico extremamente versátil. A aplicação de NO exógeno através da utilização de compostos doadores de NO pode reduzir ou eliminar a dormência e estimular a germinação de sementes de diversas espécies. Os doadores de NO mais comumente utilizados são o SNP (nitroprussiato de sódio) e os S-nitrosotióis, como SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) e GSNO (S-nitrosoglutationa). No entanto, a qualidade e a magnitude da resposta biológica ao NO aplicado exogenamente é determinada em grande parte pela concentração e o tempo de exposição ao NO produzido, que são variáveis nos diferentes doadores. Além disso, a maioria dos doadores de NO geram produtos de decomposição, que podem ter efeitos tóxicos sobre as células. Tendo em vista que os doadores possuem características distintas de liberação de NO e que os trabalhos com sementes não detalham a utilização destes doadores, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de diferentes doadores de óxido nítrico, assim como de diferentes concentrações e modo de aplicação, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de *Sesbania virgata* e *Hymenaea courbaril*. Sementes de *S. virgata* e jatobá foram embebidas em água destilada e em diferentes concentrações das soluções doadoras de NO nitrito de sódio (NaNO_2), nitroprussiato de sódio (SNP) e S-nitrosoglutationa (GSNO). Também foi testado o número de aplicações de cada doador. Os efeitos do NO sobre as taxas de germinação e crescimento da plântula (massa e comprimento da radícula) foram avaliados. Os diferentes doadores de NO, aplicados em uma gama de concentrações entre 50 e 500 μM , não apresentaram efeito significativo sobre a germinação de sementes de *S. virgata* e *H. courbaril*. No entanto, aplicações consecutivas de solução SNP ou GSNO 200 μM apresentaram efeito sobre a massa do endosperma de *S. virgata* e sobre o comprimento das raízes de *H. courbaril*, respectivamente. Estes resultados sugerem um papel sinalizador do NO no desenvolvimento inicial de *S. virgata* e *H. courbaril*.

2. INTRODUÇÃO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre inorgânico, e um mensageiro biológico extremamente versátil (Megson 2000). Os principais fatores que determinam seu efeito biológico são a sua concentração e fonte (Wink & Mitchell 1998). A molécula de NO, em grandes concentrações, é tóxica para bactérias, fungos, células tumorais, vírus, animais e plantas (Zumft 1997). A toxicidade desta molécula está relacionada à sua alta reatividade com as proteínas contendo metais, assim como à sua capacidade de formar produtos com aminas e tióis (Van der Vliet *et al.* 1996). Em baixas concentrações ($<1 \mu\text{M}$) predominam os efeitos diretos, enquanto em altas concentrações ($>1 \mu\text{M}$) prevalecem os efeitos indiretos mediados por espécies reativas de nitrogênio (Davis *et al.* 2001). Os efeitos diretos do NO, na maioria das vezes, envolvem sua interação com complexos metálicos, sendo que seus efeitos indiretos, produzidos através da interação do NO com O_2 ou $\text{O}_2 \bullet^-$, incluem a nitrosação (quando NO^+ é adicionado a uma amina tiol, ou grupo hidroxil aromático), oxidação (quando um ou dois elétrons são removidos de um substrato), ou nitração (quando NO_2^+ é adicionado a uma molécula) (Wink & Mitchell 1998). Além disso, quando presente em soluções aquosas, o NO pode sofrer autooxidação (ou seja, reação com O_2) para produzir N_2O_3 (trióxido de dinitrogênio ou anidrido nitroso) e este composto pode sofrer hidrólise para formar nitrito (Ford *et al.* 1993, Goldstein & Czapski 1996).

As abordagens utilizadas para tratamento com NO exógeno são a utilização de compostos doadores de NO e a aplicação direta de gás NO. Devido às dificuldades associadas à aplicação do gás NO e à sua toxicidade, os pesquisadores têm predominantemente utilizado os doadores de NO, que geram NO em solução (Feelisch 1998). No entanto, a qualidade e a magnitude da resposta biológica ao NO aplicado exogenamente é determinada em grande parte pela concentração e o tempo de exposição ao NO produzido (Feelisch 1998). A quantidade e a duração da liberação do NO também variam de acordo com o doador aplicado (Feelisch 1998). Além disso, a maioria dos doadores de NO geram produtos de decomposição, além do NO (incluindo NO^+ ou NO^-), e estes podem ter efeitos sobre as células. Alguns doadores de NO utilizam superóxidos endógenos para formar peroxinitrito (ONOO^-) e liberar NO (Lamarque & Whittle 1995). O peroxinitrito é um oxidante prejudicial, produzido *in vivo*, que pode ser responsável pela citotoxicidade atribuída ao NO (Yamamoto & Bing 2000). Os danos gerais e permanentes causados pelo peroxinitrito nos tecidos podem estar relacionados à apoptose (Villa *et al.* 1994, Estévez *et al.* 1995).

O nitrito de sódio é um óxido de nitrogênio que quebra a dormência das sementes (Hendricks & Taylorson 1974, Bewley & Black 1994, Bethke *et al.* 2004b), e seus efeitos estimulantes sobre a germinação podem ser mediados por NO. A produção de NO a partir de nitrito ou nitrato pode ocorrer através da enzima nitrato redutase (Yamasaki & Sakihama 2000) ou em condições ácidas através de uma via não-enzimática, capaz de produzir NO a partir de nitrito em sementes (Bethke *et al.* 2004a).

O doador de óxido nítrico mais comumente utilizado em trabalhos sobre germinação é o nitroprussiato de sódio (SNP), um complexo inorgânico, onde o ferro se encontra no estado ferroso (Fe^{2+}), ligado a cinco ânions cianeto (CN^-) e um íon nitrosila (NO^+) (Feelisch 1998, Yamamoto & Bing 2000). O nitroprussiato de sódio é um sal cristalino vermelho acastanhado, que pode ser armazenado por muitos anos à temperatura ambiente quando mantido seco e protegido da luz (Feelisch 1998). A sua interação com agentes redutores, como os tióis, leva a formação de NO. No entanto, apesar dos estudos intensivos de sua reatividade química, o mecanismo de liberação do NO permanece incompreendido (Bates *et al.* 1991). O SNP em solução é extremamente fotossensível, no entanto ligeira acidificação (pH 3-5) e a exclusão de oxigênio podem aumentar a sua estabilidade (Feelisch 1998). A luz é uma condição essencial para a liberação de NO a partir de soluções de SNP, pois esta liberação ocorre através de reações fotoquímicas (Harrison & Bates 1993, Feelisch 1998). Desta forma, as soluções aquosas de SNP devem ser preparadas imediatamente antes da utilização e mantidas no escuro.

Os S-nitrosotióis (fórmula geral RS-N=O) constituem outra classe de drogas doadoras de óxido nítrico. A síntese dos RSNOs, que são sólidos ou líquidos coloridos, envolve a S-nitrosação dos tióis primário e secundário (rosa ou vermelho) ou terciário (verde) (Stamler *et al.* 1992). A estabilidade destes compostos em solução é variável, assim como a sua meia-vida, que pode durar de milésimos de segundo a horas, dependendo do grupo-R. Os S-nitrosotióis podem decompor-se espontaneamente em solução para a sua forma dissulfeto e liberar NO neste processo (Williams 1985).

Dentre os S-nitrosotióis, os doadores de NO mais utilizados em plantas são a S-nitrosoglutationa (GSNO) e a S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). O GSNO possui relativa estabilidade em solução e pode ser formado *in vivo* através da nitrosação do resíduo de cisteína do tripeptídeo glutationa (GSH) por óxidos de nitrogênio e peroxinitrito (Moro *et al.* 1995). O GSNO libera NO no escuro, embora a luz seja necessária para iniciar o processo de decomposição (Floryszak-Wieczorek *et al.* 2006). O GSNO também pode induzir respostas biológicas por mecanismos que não envolvem a liberação de NO, tais como transnitrosilação dos grupos tióis presentes nas proteínas, modificando assim a sua atividade

(Hogg 2000). Já a liberação de NO pelo SNAP é bastante variável, devido em grande parte a sua sensibilidade apurada para íons de cobre (Cu (I)) (Dicks *et al.* 1996, Al-Sa'doni *et al.* 1997).

Os doadores SNP e GSNO apresentam diferentes curvas de liberação de NO, sendo que a liberação pelo GSNO é rápida e transitória (entre 30 e 60 minutos), enquanto o SNP em solução libera concentrações mais elevadas de NO (cerca de seis vezes maiores), com um pico de liberação 3 horas após a aplicação e mantém os níveis mais altos por um período maior (Ederli *et al.* 2009).

Tendo em vista que os doadores possuem características distintas de liberação de NO e que os trabalhos com sementes não especificam o modo de aplicação destes doadores, torna-se necessário analisar os efeitos dos diferentes doadores de óxido nítrico, assim como as suas concentrações e forma de aplicação, para avaliar os efeitos do NO sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de sementes de *Sesbania virgata* e *Hymenaea courbaril*.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito de diferentes doadores de óxido nítrico nos processos de germinação e desenvolvimento inicial em *Sesbania virgata* e *Hymenaea courbaril*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar o efeito de diferentes soluções doadoras de NO sobre a germinação das sementes e desenvolvimento inicial;
- Determinar a forma mais adequada de aplicação das soluções doadoras de NO;
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações das soluções doadoras;
- Determinar o número adequado de aplicações das soluções doadoras de NO.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. *Sesbania virgata*

4.1.1. Material biológico

Sementes de *Sesbania virgata* foram coletadas de 15 matrizes situadas em Lavras, MG, em março de 2009 e foram armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente.

4.1.2. Padronização inicial

Inicialmente foi testada a melhor forma de escarificação das sementes de *S. Virgata*. A escarificação mecânica foi realizada com lixa e a escarificação química com ácido sulfúrico concentrado (densidade 1,84 Kg/L) por 40 minutos. As sementes de *S. virgata* foram embebidas em placas de Petri (9 cm), contendo 2 folhas de papel de filtro umedecido em água, sendo que para cada forma de escarificação foram utilizadas três placas com 10 sementes cada. O parâmetro avaliado foi a porcentagem de germinação, registrando-se o número de sementes que emitiram raiz primária (maior que 2 mm). Apesar das sementes de *S. virgata* apresentarem faixa ótima de germinação entre 31 e 34,6°C (Zayat 1996), as sementes foram incubadas em câmaras de germinação do tipo BOD sob condições de 12h de luz e temperatura de 26°C, para que em temperaturas infra-ótimas o processo de germinação e degradação dos galactomananos ocorresse de forma mais lenta (Tonini 2004) e desta forma, fosse possível analisar todas as etapas dos processos de germinação e pós-germinação de forma mais detalhada, além de permitir a comparação com os demais trabalhos do grupo.

4.1.3. Forma de aplicação da solução doadora de NO

Após o estabelecimento da escarificação mecânica como a mais adequada, foram testadas as formas de aplicação da solução doadora de NO. Para o tratamento com vapores de NO, quatro placas de Petri com 5 cm de diâmetro foram colocadas abertas dentro de uma placa de Petri de 15 cm. Três das placas de 5 cm continham 5 sementes cada escarificadas por abrasão e embebidas em água e na quarta placa foi colocada a solução doadora (200 µM de SNP) (Fig. 1). Para o tratamento por embebição em NO, as sementes das três placas foram embebidas diretamente em solução 200 µM de SNP e na quarta placa foi colocada água. Como controle, as sementes foram embebidas em água e na quarta placa também foi adicionado água. Em cada tratamento foram utilizadas três placas de Petri (15 cm), totalizando 3 repetições de 15 sementes cada, e o efeito de cada tratamento foi avaliado sobre a taxa de germinação.

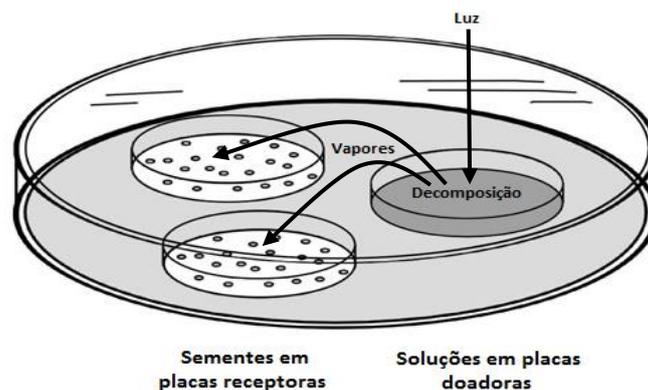


Figura 1. Ilustração do sistema experimental utilizado para aplicar os vapores de SNP (soluções em placas doadoras) em sementes presentes em placas receptoras. Fonte: Bethke *et al.* 2006a.

4.1.4. Efeito de diferentes soluções doadoras e concentrações das soluções na degradação das reservas

Para avaliar o efeito de diferentes doadores de NO na germinação, as sementes de *S. virgata* foram embebidas em placas de Petri, contendo 2 folhas de papel de filtro umedecido com diferentes concentrações das soluções doadoras de NO, nitroprussiato de sódio (SNP), S-nitrosoglutationa (GSNO) ou nitrito de sódio (NaNO_2) e em água (controle). Em cada tratamento foram utilizadas 12 placas de Petri (9 cm) contendo 5 sementes cada, embebidas em 3,5 mL de solução aquosa do tratamento determinado, sendo 3 placas para cada dia de coleta. As sementes foram coletadas e dissecadas separando-se o endosperma e a raiz (Fig. 2), do primeiro ao quarto dia após a embebição. Os parâmetros avaliados foram a taxa de germinação registrando-se os números de sementes que emitiram raiz primária (maior que 2 mm), a massa fresca das sementes intactas, a massa fresca da raiz, e a massa fresca e seca do endosperma dessas sementes.

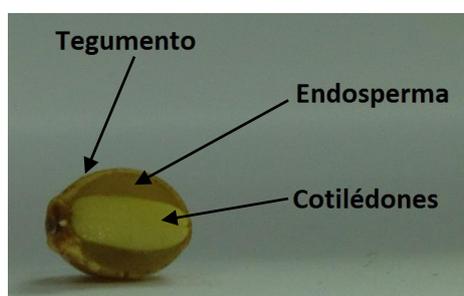


Figura 2. Secção transversal de semente de *Sesbania virgata*.

4.1.5. Efeito do número de aplicações das soluções de nitroprussiato de sódio sobre a degradação das reservas

Como nos trabalhos sobre germinação, que utilizam o SNP como doador de NO, não há especificação sobre o modo e o número de aplicações deste doador, neste trabalho foram avaliados os efeitos de aplicações seqüenciais do doador SNP (constante, 1x, 2x ou 3x). Para isto as sementes de *S. virgata* escarificadas por abrasão foram embebidas em placas de Petri (9 cm), contendo 2 folhas de papel de filtro umedecido em solução 200 µM de SNP e em água (controle). Neste ensaio, foram testadas diferentes quantidades de aplicações da solução doadora SNP (tab. 1):

- a) solução aplicada somente no primeiro dia (1x);
- b) solução aplicada no primeiro e segundo dias (2x);
- c) solução aplicada nos três primeiros dias (3x), sendo depois substituída por água nos tratamentos a, b e c;
- d) solução aplicada no primeiro dia e deixada até o final do ensaio (constante), sendo a água adicionada ao papel contendo a solução doadora.

As sementes foram coletadas e dissecadas separando-se o endosperma e a raiz, do primeiro ao quarto dia após a embebição. Os parâmetros avaliados foram a porcentagem de germinação, a massa fresca das sementes intactas, a massa fresca da raiz, e a massa fresca e seca do endosperma, sendo que para cada teste foram utilizadas três placas de Petri com 5 sementes cada.

Tabela 1. Representação das soluções aplicadas em cada tratamento até 72 horas após a embebição.

Tratamento	Horas após a embebição			
	0	24	48	72
Controle	Água	Água	Água	Água
Constante	SNP	Água adicionada ao SNP	Água adicionada ao SNP	Água adicionada ao SNP
1x	SNP	Água	Água	Água
2x	SNP	SNP	Água	Água
3x	SNP	SNP	SNP	Água

■ Água adicionada ao SNP
■ Água
■ SNP

4.2. *Hymenaea courbaril*

4.2.1. Material biológico

Sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá) foram adquiridas do Instituto Florestal, SP. As sementes são procedentes da Floresta Estadual de Assis e foram coletadas em 10/12/2008.

O lote apresentava 100% de pureza e 75% de germinação na data da aquisição e foram armazenadas em caixas plásticas a 4°C até a sua utilização.

4.2.2. Padronização inicial

Inicialmente as sementes de *H. courbaril* foram pesadas e após determinado o peso médio (3,85 g) foi estabelecida uma faixa média de trabalho com sementes entre 3,35 g e 4,35 g. Em todos os experimentos foram utilizadas sementes que estavam dentro desta faixa pré-estabelecida. As sementes de jatobá foram colocadas em hipoclorito de sódio puro por 30 minutos e lavadas exaustivamente em água corrente. Após toda a polpa aderida ter sido retirada, as sementes foram colocadas para secar em bandejas contendo 2 folhas de papel de filtro. As sementes escarificadas por abrasão (com lixa) foram embebidas em caixas do tipo gerbox contendo duas folhas de papel de germinação umedecido nas soluções dos diferentes tratamentos. As sementes foram germinadas em câmaras do tipo BOD a 26°C com luz constante, sendo que para cada tratamento foram utilizadas três repetições de seis sementes cada. As avaliações foram feitas registrando-se o número de sementes que emitiram raiz primária (maior que 2 mm) e a medição do comprimento das raízes.

4.2.3. Efeito de diferentes soluções doadoras e concentrações das soluções sobre a germinação

Para investigar o efeito do NO na germinação, as sementes de jatobá foram embebidas em soluções de 50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM e 400 µM de SNP ou GSNO, e em água (controle).

4.2.4. Efeito do número de aplicações das soluções doadoras sobre a germinação

Para investigar o efeito de diferentes aplicações dos doadores de NO na germinação, as sementes de jatobá foram embebidas em soluções 200 µM de SNP ou GSNO, e em água (controle). Os doadores foram aplicados uma, duas, três ou quatro vezes (1x, 2x, 3x e 4x) (Tab. 2).

Tabela 2. Representação das soluções aplicadas em cada tratamento até o 12º dia após a embebição.

Tratamento	Dias após a embebição				
	0	3	6	9	12
Controle	Água	Água	Água	Água	Água
1x	Solução de SNP	Água	Água	Água	Água
2x	Solução de SNP	Solução de SNP	Água	Água	Água
3x	Solução de SNP	Solução de SNP	Solução de SNP	Água	Água
4x	Solução de SNP	Solução de SNP	Solução de SNP	Solução de SNP	Água

5. RESULTADOS

5.1. *Sesbania virgata*

A escarificação mecânica mostrou-se mais eficiente na promoção da germinação de sementes de *S. virgata* em relação à escarificação química, como pode ser observado pela maior porcentagem de germinação (Fig. 3). Por esta razão, esta forma de escarificação foi selecionada para a padronização do efeito do NO.

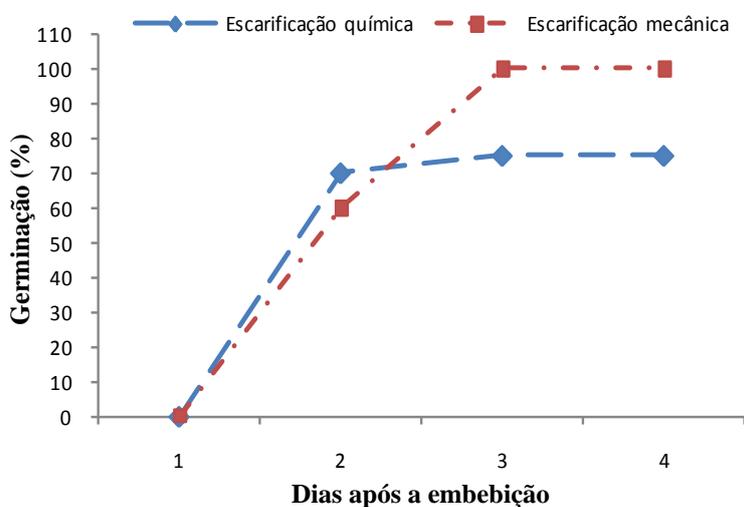


Figura 3. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata* submetidas à escarificação mecânica e química, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água. Os valores representam a média de três repetições.

Ao se analisar o efeito das formas de aplicação da solução de SNP, verificou-se que os tratamentos com doadores de NO não tiveram efeito sobre a taxa de germinação das sementes de *S. virgata*, tanto na embebição diretamente na solução quanto na utilização de vapores de NO (Fig. 4). Benthe e colaboradores (2004b) avaliando a germinação de sementes de

Arabidopsis thaliana, tratadas com vapores de SNP ou embebidas diretamente em SNP, verificaram que ambos os tratamentos tiveram o mesmo efeito sobre a germinação destas sementes (Bethke *et al.* 2004b). Desta forma, como a embebição das sementes diretamente na solução doadora de NO é a forma de aplicação mais utilizada na literatura, estabeleceu-se embeber as sementes de *S. virgata* diretamente na solução doadora.

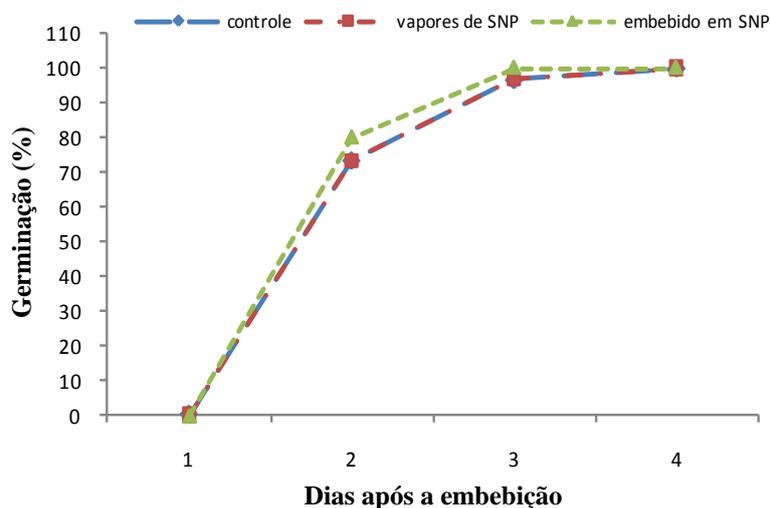


Figura 4. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle), vapores de SNP e embebição em solução 200 μM de SNP. Os valores representam a média de três repetições.

5.1.1. Efeito de diferentes concentrações e doadores de NO sobre sementes de *Sesbania virgata*

Soluções doadoras de nitrito de sódio foram aplicadas em três concentrações (100 μM , 200 μM e 400 μM) e a análise dos diferentes tratamentos mostrou que as sementes atingiram a taxa máxima de germinação entre o segundo e o terceiro dia após a embebição (Fig. 5). No entanto, não houve diferença estatística entre os tratamentos, o que mostra que o nitrito de sódio não teve influência sobre a taxa de germinação em nenhuma das concentrações utilizadas.

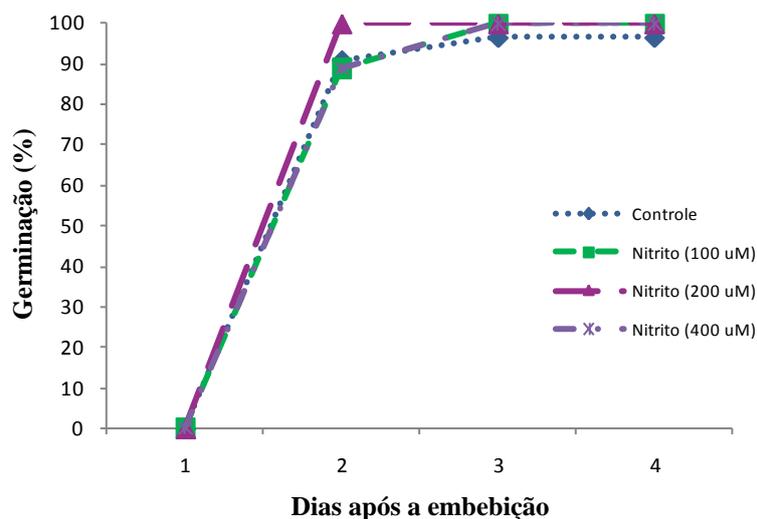


Figura 5. Taxa de germinação de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e soluções de nitrito de sódio (100 µM, 200 µM e 400 µM). Os valores representam a média de três repetições.

Quanto à variação de massa fresca das sementes ao longo do período, observou-se um aumento gradativo de massa durante e após a germinação, tanto no controle quanto no tratamento com nitrito de sódio (Fig. 6A). Quando comparadas com sementes embebidas em água, as tratadas com 100 µM de nitrito apresentaram massa fresca menor no primeiro dia e as tratadas com 200 µM apresentaram massa fresca maior no terceiro dia. Da mesma forma que a massa fresca das sementes, a massa fresca das raízes também aumentou gradativamente ao longo do período avaliado, sem efeito visível das diferentes concentrações do doador nitrito de sódio (Fig. 6B).

Houve incremento de massa fresca e seca do endosperma até o segundo dia após a embebição, sendo observada queda no 3º e 4º dias (Fig. 6C e 6D), que corresponde ao período de degradação da reserva de galactomanano (Buckeridge & Dietrich 1996, Tonini *et al.* 2006, 2007). Alterações consistentes nos valores de massa do endosperma não foram observadas entre o controle e os tratamentos.

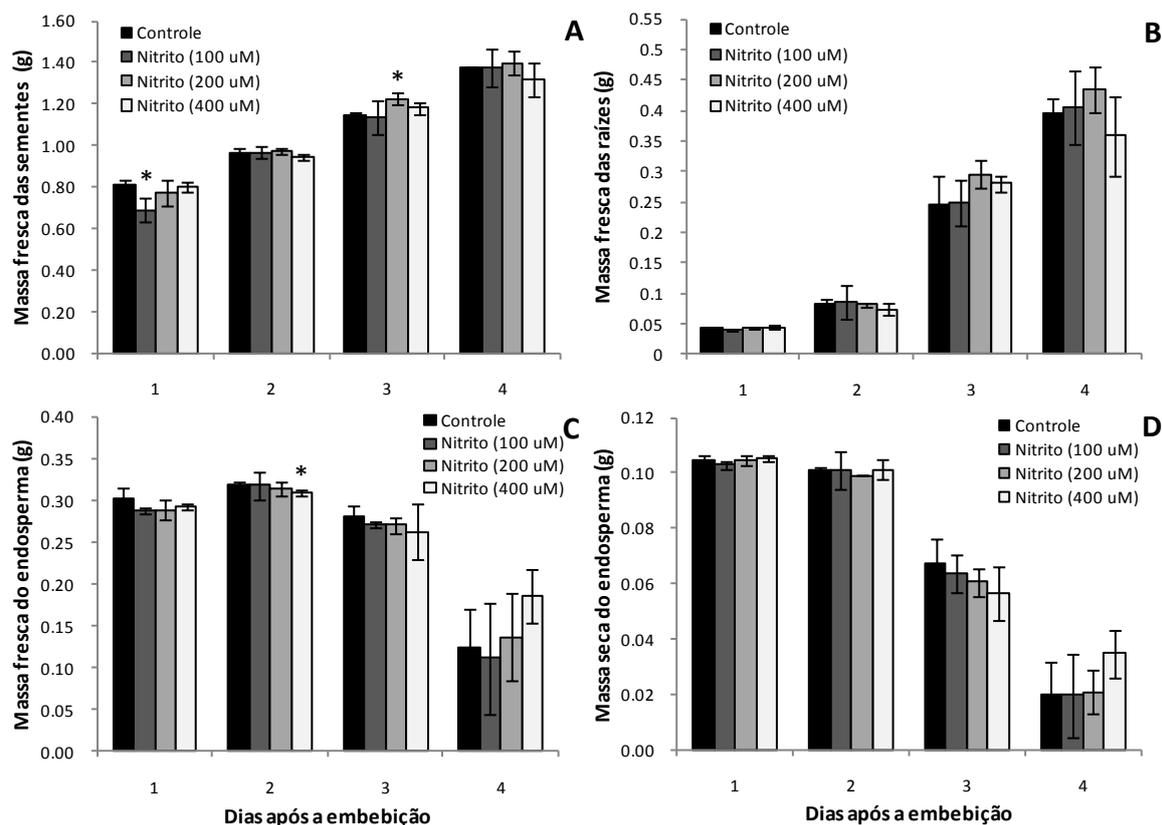


Figura 6. Massa fresca das sementes íntegras (A), massa fresca das raízes (B) e massa fresca (C) e seca (D) dos endospermas isolados de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e soluções de nitrito de sódio (100 µM, 200 µM e 400 µM). As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 3). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Também foram avaliados os efeitos de diferentes concentrações de GSNO. Analisando a porcentagem de germinação ao longo do período, nota-se que a taxa máxima foi atingida entre o terceiro (GSNO) e o quarto (controle) dia após a embebição (Fig. 7). Porém, não houve diferença estatística entre o controle e as soluções com diferentes concentrações de GSNO.

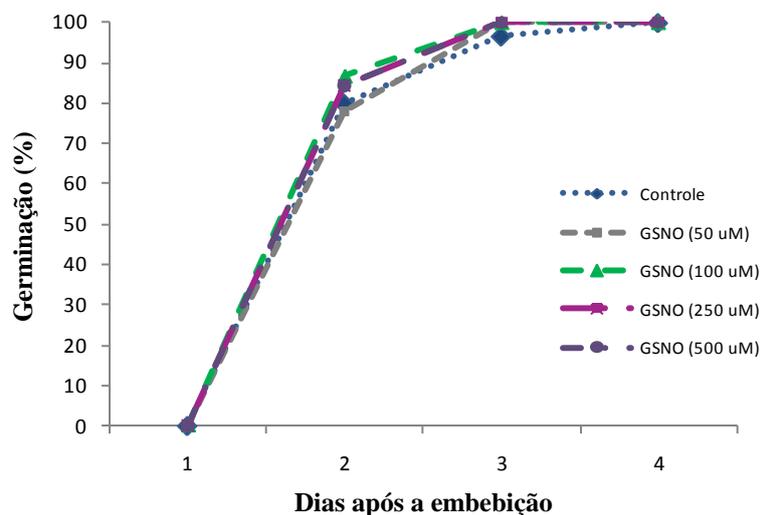


Figura 7. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e soluções de GSNO (50 µM, 100 µM, 250 µM e 500 µM). Os valores representam a média de três repetições.

Observou-se um aumento gradativo nos valores de massa fresca das sementes até o terceiro dia após a embebição (Fig. 8A). Pode-se observar que as sementes tratadas com 100 µM de GSNO apresentaram massa fresca maior no segundo dia, quando comparadas com sementes embebidas em água. A massa fresca das raízes também teve um aumento gradativo ao longo do período (Fig. 8B), sendo que no quarto dia após a embebição observou-se um aumento dessa massa em sementes tratadas com 250 µM de GSNO em relação ao controle.

Em contrapartida, a massa fresca do endosperma aumentou até o segundo dia após a embebição em água e 500 µM de GSNO (Fig. 8C), sendo que nos demais tratamentos com GSNO a massa se manteve constante. A partir do terceiro dia ocorreu uma diminuição da massa fresca do endosperma que foi mais acentuada no quarto dia após a embebição. No entanto, as sementes tratadas com 50 µM de GSNO tiveram um atraso na redução da massa fresca do endosperma em relação ao controle. A massa seca do endosperma (Fig. 8D) manteve-se constante até o segundo dia após a embebição, e a partir do terceiro houve uma redução gradativa tanto no controle quanto nos tratamentos com GSNO, com diferença significativa apenas no tratamento GSNO 100 µM.

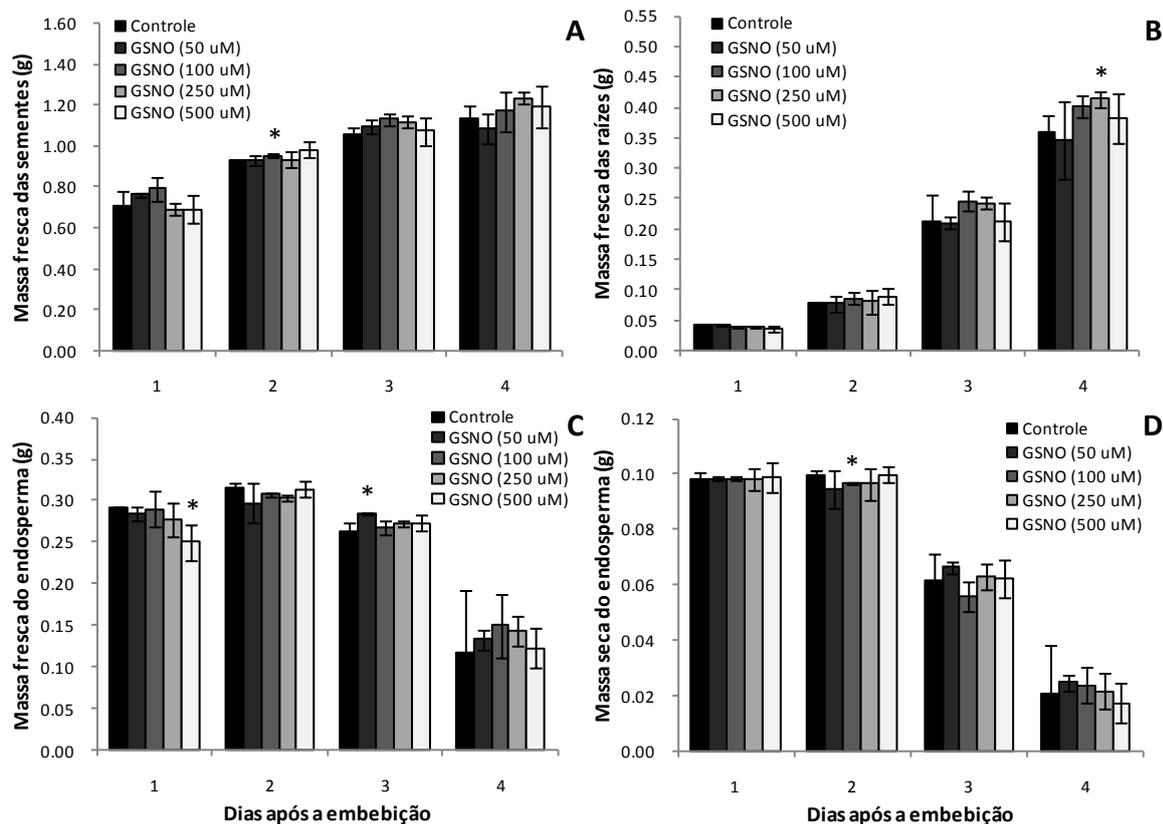


Figura 8. Massa fresca das sementes íntegras (A), massa fresca das raízes (B) e massa fresca (C) e seca (D) dos endospermas isolados de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e soluções de GSNO (50 µM, 100 µM, 250 µM e 500 µM). As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 3). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

A avaliação do efeito de diferentes concentrações do doador nitroprussiato de sódio (SNP) mostrou que as sementes atingiram a porcentagem máxima de germinação no terceiro dia após a embebição em água e nas diferentes concentrações de SNP (Fig. 9). No entanto, no segundo dia após a embebição observa-se que somente 50% das sementes embebidas em 50 µM de SNP germinaram, enquanto os outros tratamentos já tinham alcançado cerca de 80%, sugerindo que esta concentração retarde a germinação. No entanto, ao final do experimento, as sementes tratadas com 50 µM de SNP atingiram taxas de germinação similares às dos outros tratamentos.

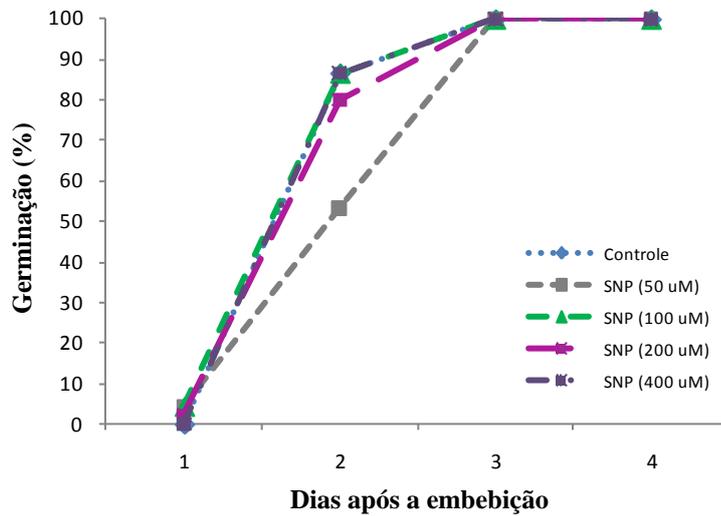


Figura 9. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e soluções de SNP (50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM). Os valores representam a média de três repetições.

Observou-se um aumento gradativo nos valores de massa fresca das sementes até o quarto dia após a embebição em todos os tratamentos, sendo que o tratamento com 50 µM de SNP apresentou diminuição significativa da massa fresca no 1º dia, em relação ao controle (Fig. 10A). De modo similar, a massa fresca das raízes também apresentou um aumento gradativo até o quarto dia após a embebição (Fig. 10B). Diferenças significativas não foram observadas nos dois parâmetros entre sementes controle e tratadas.

Em relação à massa fresca e seca do endosperma (Fig. 10C e D), a partir do terceiro dia pode-se observar uma redução gradativa, mais acentuada no quarto dia. Diferenças significativas foram observadas somente no 3º dia após a embebição no tratamento SNP 100 µM.

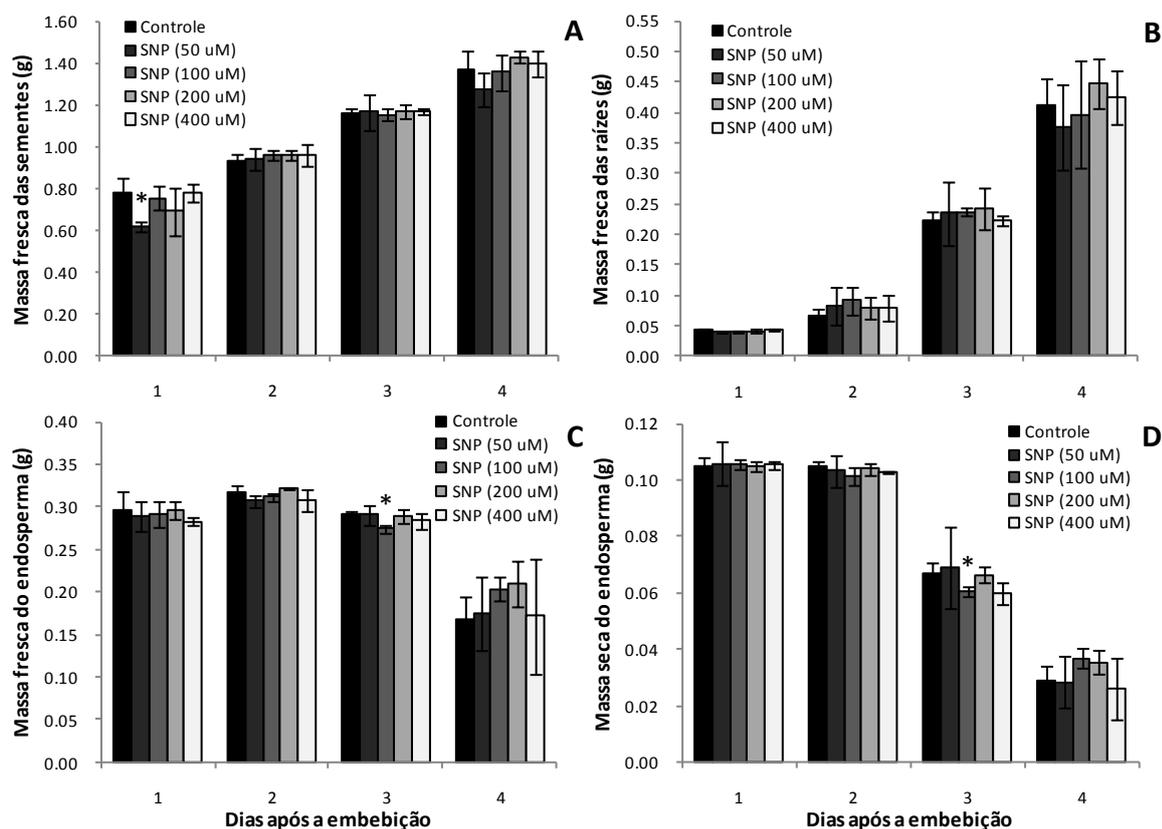


Figura 10. Massa fresca das sementes íntegras (A), massa fresca das raízes (B) e massa fresca (C) e seca (D) dos endospermas isolados de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e soluções de SNP (50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM). As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 3). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Apesar de algumas variações aleatórias nos parâmetros avaliados, os resultados não indicaram nenhum doador ou concentração que efetivamente regulasse a germinação em sementes de *S. virgata*. Tendo em vista que as concentrações de 100 µM e 200 µM de SNP são as mais comumente utilizadas nos estudos de germinação (Zhang *et al.* 2005, Sarath *et al.* 2006, Bethke *et al.* 2006a, 2006b), sendo que a concentração de 200 µM é a que promove maiores efeitos nas demais espécies já estudadas, novos testes foram realizados com esta concentração de SNP.

Pode-se observar que a taxa máxima de germinação ocorreu no terceiro dia após a embebição em água e nas diferentes aplicações sequenciais de SNP, sem diferenças significativas entre o controle e os tratamentos (Fig. 11).

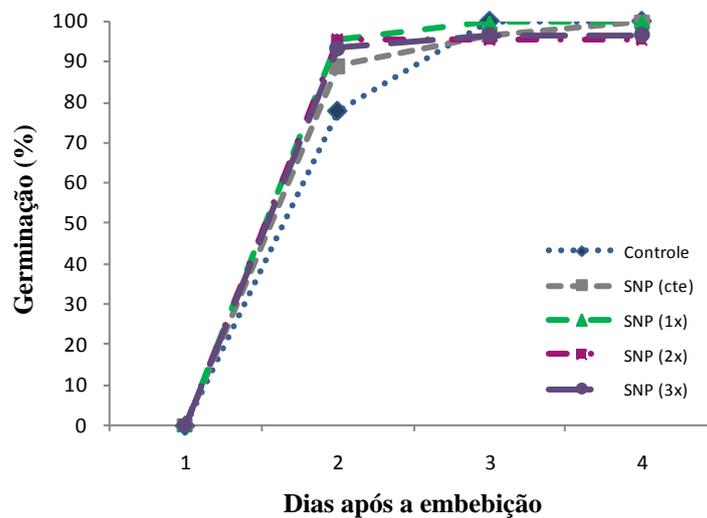


Figura 11. Taxa de germinação em sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e em solução 200 μ M de SNP aplicada 1, 2 ou 3 vezes e substituída por água ou aplicada uma vez e mantida até o final do experimento. Os valores representam a média de três repetições.

Ao analisar a massa fresca das sementes, observou-se um aumento gradativo nos valores até o quarto dia após a embebição em todos os tratamentos (Fig. 12A). Concomitantemente, a massa fresca das raízes também aumentou gradativamente até o quarto dia após a embebição (Fig. 12B). Além disto, verificou-se que as sementes submetidas a duas e três aplicações de SNP apresentaram maiores valores de massa fresca das raízes.

Em relação à massa fresca do endosperma (Fig. 12C), um atraso na redução da massa fresca foi observado no terceiro e quarto dias para o tratamento SNP 1x e no terceiro dia para o SNP 3x. Já a massa seca do endosperma (Fig. 12D) manteve-se constante até o segundo dia, e a partir do terceiro dia ocorreu uma redução gradativa tanto no controle quanto nos tratamentos com SNP. Porém, assim como o observado com a massa fresca do endosperma, a aplicação do SNP uma ou três vezes levou a um atraso na redução da massa seca. Portanto, contrariamente ao esperado, a aplicação de SNP uma ou três vezes parece provocar um pequeno atraso na degradação da reserva. Contudo, no quarto dia a massa seca do endosperma destes tratamentos adquire valores semelhantes ao controle, sugerindo que nestas sementes houve maior degradação da reserva entre o terceiro e o quarto dia, evidenciado pelo aumento na massa fresca das raízes.

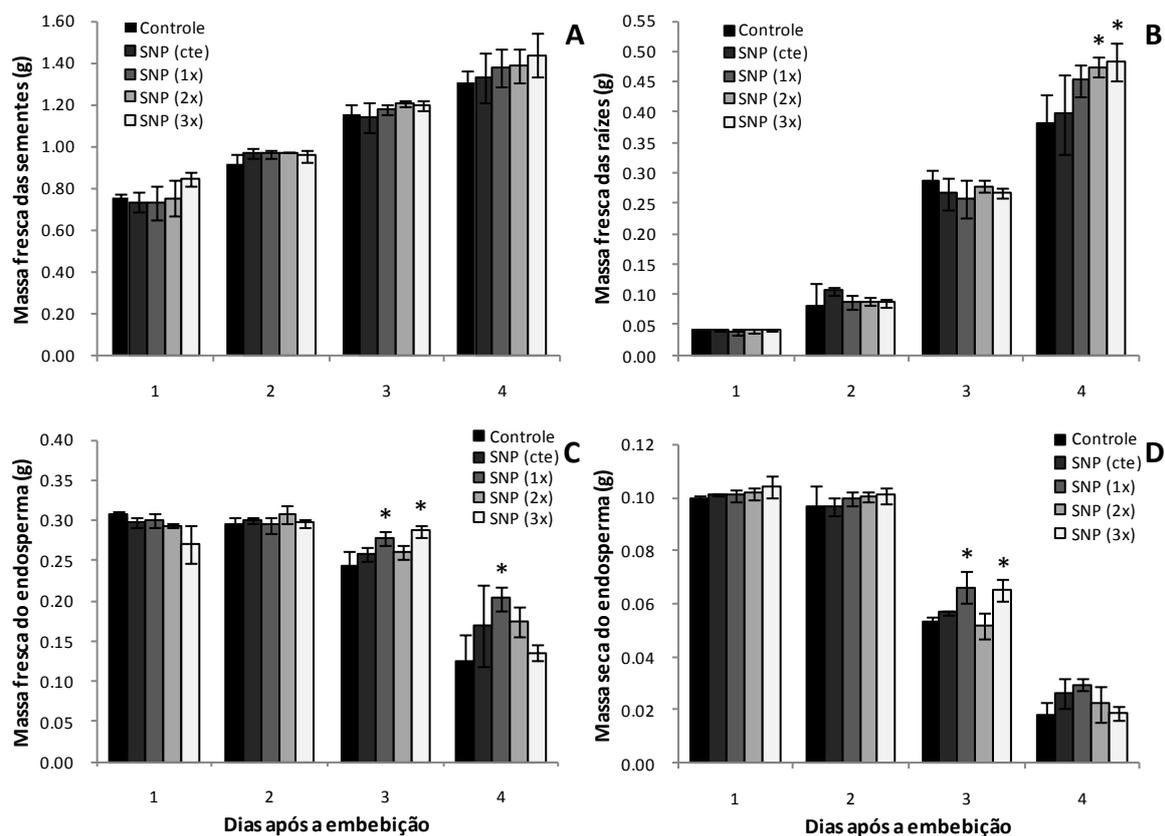


Figura 12. Massa fresca das sementes íntegras (A), massa fresca das raízes (B) e massa fresca (C) e seca (D) dos endospermas isolados de sementes de *S. virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e em solução 200 μM de SNP aplicada 1, 2 ou 3 vezes e substituída por água ou aplicada uma vez e mantida até o final do experimento. As barras correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Levando-se em conta que diferenças estatísticas na massa fresca e seca do endosperma (3º dia após a embebição) e na massa das raízes (4º dia) foram observadas apenas em sementes tratadas com SNP (200 μM) quando esta solução foi aplicada por três vezes consecutivas, estas condições, que parecem ser as que promovem maiores efeitos nessa espécie, foram escolhidas para os experimentos posteriores.

5.2. *Hymenaea courbaril*

5.2.1. Efeito de diferentes doadores e concentrações de NO sobre sementes de *Hymenaea courbaril*

Assim como o realizado com sementes de *S. virgata*, para analisar o efeito do NO sobre a germinação de sementes de *Hymenaea courbaril* foram realizados experimentos dose-resposta e experimentos com diferentes aplicações do doador, onde as sementes foram embebidas em água (controle), GSNO e SNP.

Ao analisar os efeitos de diferentes concentrações de GSNO, observa-se que a taxa máxima de germinação foi atingida no 8º dia após a embebição tanto no controle quanto nos tratamentos com GSNO (Fig. 13A). Já nos tratamentos com diferentes concentrações de SNP, a taxa máxima de germinação foi alcançada no 9º dia após a embebição no controle e nos tratamentos com SNP (Fig. 13B). Assim, da mesma forma que com GSNO, as diferentes concentrações de SNP também não afetaram a taxa de germinação.

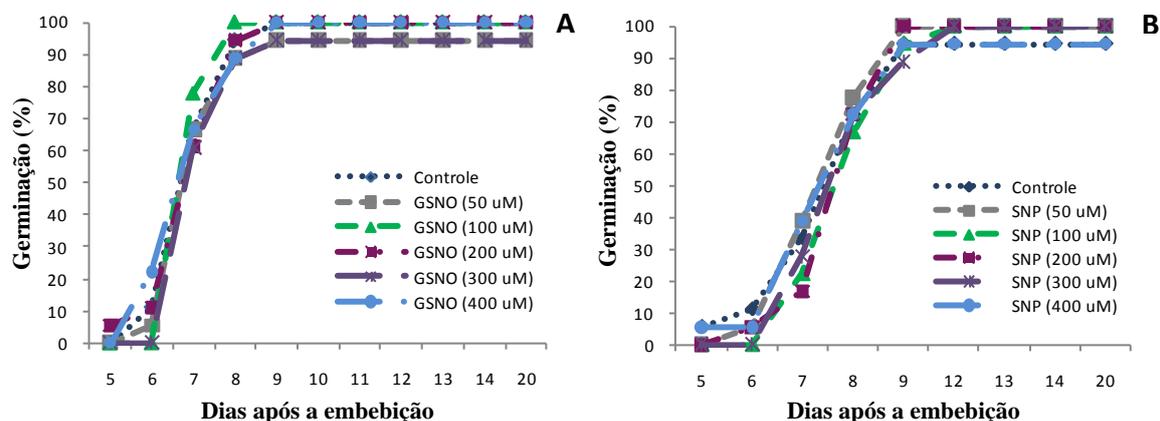


Figura 13. Taxa de germinação em sementes de *H. courbaril*, do 5º ao 20º dia após a embebição em água e soluções de diferentes concentrações de GSNO (A) e SNP (B) (50 µM, 100 µM, 200 µM, 300 µM e 400 µM). Os valores representam a média de três repetições.

Foi escolhida a concentração de 200 µM, por ser a mais utilizada em estudos de germinação e por ter apresentado efeito em *S. virgata*, para avaliar o efeito do número de aplicações das soluções doadoras.

Ao observar os efeitos das diferentes aplicações de GSNO (1x, 2x, 3x ou 4x) sobre a porcentagem de germinação ao longo do período, verificou-se que a taxa máxima de germinação foi atingida entre o 8º e 13º dia após a embebição (Fig. 14A). Apesar de o GSNO não afetar a germinação, a análise do comprimento das raízes indica que quando o doador é aplicado duas vezes há um aumento do comprimento no 15º dia, enquanto três ou quatro aplicações promovem um maior crescimento da raiz no 20º dia após a embebição (Fig. 14B).

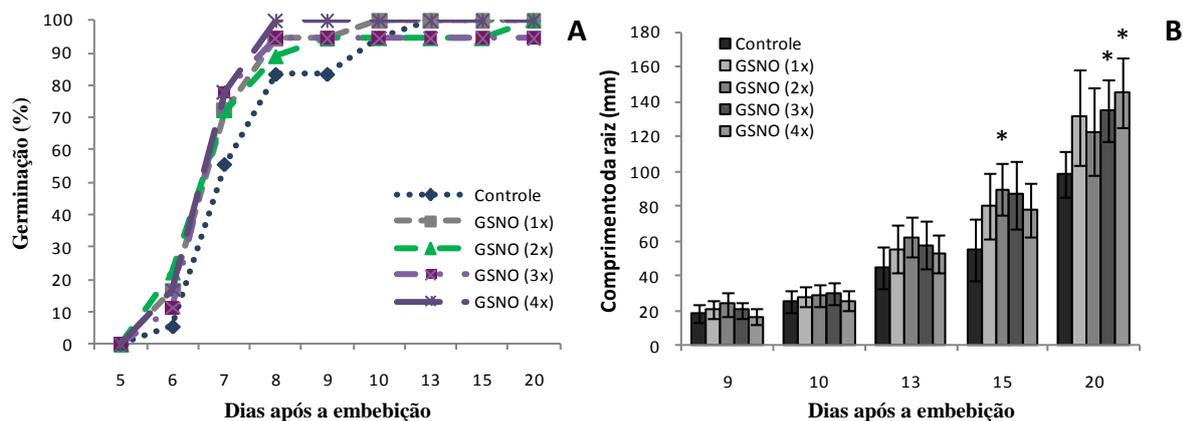


Figura 14. (A) Taxa de germinação em sementes de *H. courbaril*, do 5º ao 20º dia após a embebição em água e soluções 200 μ M de GSNO aplicadas uma, duas, três ou quatro vezes. Os valores representam a média de três repetições. (B) Comprimento de raízes (mm) de *H. courbaril*, do 9º ao 20º dia após a embebição em água e soluções 200 μ M de GSNO aplicadas uma, duas, três ou quatro vezes. Os valores representam o comprimento médio de cada semente (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Ao avaliar o efeito das diferentes aplicações de SNP observou-se que a porcentagem máxima de germinação ocorreu entre o 10º e o 13º dia após a embebição, exceto em sementes tratadas com SNP por quatro vezes, onde a taxa máxima foi atingida apenas no 20º dia (Fig. 15A). Entretanto, há um aumento do comprimento das raízes de sementes tratadas com SNP no 15º e 20º dia após a embebição quando a solução é aplicada por três ou quatro vezes, e um aumento apenas no 20º dia quando é aplicada por duas vezes (Fig. 15B).

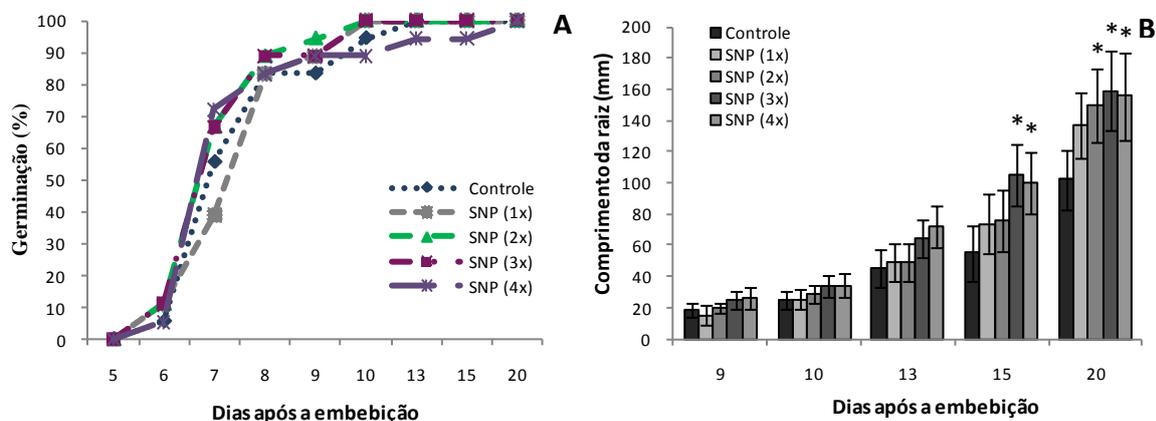


Figura 15. (A) Taxa de germinação em sementes de *H. courbaril*, do 5º ao 20º dia após a embebição em água e soluções 200 μ M de SNP aplicadas uma, duas, três ou quatro vezes. Os valores representam a média de três repetições. (B) Comprimento de raízes (mm) de *H. courbaril*, do 9º ao 20º dia após a embebição em água e soluções 200 μ M de SNP aplicadas uma, duas, três ou quatro vezes. Os valores representam o comprimento médio de cada semente (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Deste modo, nota-se que tanto o GSNO quanto o SNP, não apresentam efeito na taxa de germinação de sementes de *Hymenaea courbaril*. No entanto, as diferentes aplicações dos doadores de NO resultaram em aumento do comprimento da raiz, sendo que os tratamentos

com três ou quatro aplicações foram mais efetivos. Por esta razão, a concentração de 200 μM de solução de SNP, aplicada sequencialmente por 3 vezes, foi a condição escolhida para os experimentos subseqüentes com jatobá por ser uma das mais efetivas e por também ter sido utilizada com *S. virgata*.

6. DISCUSSÃO

Diversos autores já demonstraram que o NO estimula a germinação de sementes de alface, tremoço, lentilha, *Arabidopsis*, cevada e *Panicum virgatum* (Sarath *et al.* 2006, Bethke *et al.* 2004b, 2006a, 2006b, Erol *et al.* 2008), porém os diferentes doadores de óxido nítrico não tiveram efeito sobre a porcentagem de germinação de sementes de *Sesbania virgata* e *Hymenaea courbaril*. Em sementes de alface, cevada e *Paulownia tomentosa*, o NO quebra a dormência pelo estímulo da luz (Giba *et al.* 1998, Beligni & Lamatina 2000, Bethke *et al.* 2004b), e em sementes de *Arabidopsis* o tratamento com SNP se mostrou tão eficaz quanto a estratificação para a superação da dormência primária (Bethke *et al.* 2004b). No entanto, tendo em vista que as sementes estudadas apresentam dormência por impermeabilidade do tegumento, e que o NO não foi capaz de quebrar esse tipo de dormência (dados não mostrados), a escarificação das sementes pode ter mitigado os efeitos do NO no processo germinativo.

Os efeitos de diferentes concentrações de SNP (entre 0,1 e 1000 μM) já foram avaliados em algumas espécies, e na maioria dos casos o efeito destas concentrações sobre a promoção da germinação é dependente da dose, sendo que em altas concentrações (normalmente acima de 600 μM) há redução da germinação acompanhada por um menor comprimento das raízes (Kopyra & Gwózdź 2003, Bethke *et al.* 2004b, Erol *et al.* 2008). Porém, no presente trabalho não foram observados efeitos inibitórios sobre a germinação e o comprimento das raízes, indicando que as diferentes concentrações (entre 50 e 500 μM) e quantidades de aplicações utilizadas não foram tóxicas para as sementes das duas espécies.

Em *Sesbania virgata*, o fato do NO não afetar a germinação pode ser devido às propriedades do galactomanano presente nos endospermas, pois já foi demonstrado que este polissacarídeo além de funcionar como reserva pós-germinativa também atua como modulador da resistência mecânica do endosperma das sementes para facilitar a protrusão da radícula (Groot & Karssen 1987) e controla a embebição nas fases iniciais da germinação (Reid & Bewley 1979).

À primeira vista, a degradação intensa dos galactomananos não parece ter sido afetada pelo NO, uma vez que a diminuição da massa do endosperma, que indica a degradação dessa reserva, foi semelhante em quase todos os tratamentos, excetuando as variações observadas no 3º dia, com SNP 100 µM e com SNP 200 µM em aplicações sequenciais. Contudo, são necessárias análises bioquímicas para confirmar se o óxido nítrico interfere ou não na degradação das reservas da semente desta espécie.

O óxido nítrico também está envolvido na regulação da morfologia da raiz (Pagnussat *et al.* 2002, Correa-Aragunde *et al.* 2004, Lombardo *et al.* 2006). Correa-Aragunde e colaboradores (2008) verificaram que o óxido nítrico afeta o crescimento de raízes de tomate de forma dose-dependente, sendo que as baixas concentrações de SNP estimulam o crescimento das raízes, enquanto as altas concentrações têm um efeito inibitório sobre o crescimento. Em sementes de jatobá, os tratamentos com NO induziram um aumento do comprimento das raízes no 15º e no 20º dia após a embebição.

A análise do comprimento das raízes de *H. courbaril* também demonstrou que aplicações consecutivas das soluções doadoras de NO não causaram efeitos inibitórios no alongamento da raiz, como já relatado para algumas espécies onde altas concentrações de SNP inibiram o alongamento da raiz primária e do hipocótilo (Kopyra & Gwózdź 2003, Bethke *et al.* 2004b, Correa-Aragunde *et al.* 2004). Entretanto, a concentração inibitória parece ser variável de espécie para espécie, e os mecanismos pelos quais o óxido nítrico provoca esses efeitos dependentes da concentração ainda não estão esclarecidos.

7. CONCLUSÕES

- Os resultados obtidos indicam que, levando-se em conta os parâmetros analisados, o NO não promove estímulo da germinação e aumento da porcentagem total de sementes que germinam, mas sugerem que há influência desta molécula sinalizadora na massa no endosperma de *S. virgata* e no crescimento de raízes em *H. courbaril*.
- As diferentes concentrações e aplicações dos doadores de NO não tiveram efeito sobre a taxa de germinação de sementes de *S. virgata* e *H. courbaril*, nem provocaram efeitos inibitórios nos parâmetros analisados, sugerindo ausência de toxicidade do SNP e GSNO nas condições avaliadas;
- O efeito dos doadores de NO em sementes de leguminosas acumuladoras de polissacarídeos de reserva de parede celular parece menos intenso do que o observado em sementes que acumulam outros tipos de reserva, como amido e proteínas. Este fato

pode estar relacionado à impermeabilidade do tegumento apresentada por estas sementes, ao tamanho das sementes e/ou ao tipo de reserva e suas características.

CAPÍTULO 2

Influência do óxido nítrico nos processos de embebição e mobilização de reservas durante a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

1. RESUMO

O galactomanano é um polissacarídeo de reserva de parede celular presente no endosperma de várias sementes de leguminosas, que atua no controle da embebição no início da germinação e posteriormente serve como reserva de carbono para o crescimento inicial da plântula. Já foi demonstrado que hormônios e açúcares estão envolvidos na mobilização desta reserva pós-germinativa. Dentre as espécies nativas utilizadas como modelo para compreender a mobilização do galactomanano, encontra-se a *Sesbania virgata*. O óxido nítrico (NO) é capaz de estimular a atividade de enzimas hidrolíticas que atuam na degradação do amido. Contudo, o papel do NO como modulador de enzimas envolvidas na hidrólise de polissacarídeos de reserva de parede celular ainda não foi investigado, assim como a possível relação entre o NO e o ABA neste processo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do NO nas diferentes etapas do processo germinativo (embebição, degradação de reservas, protrusão da radícula) em *S. virgata*. Sementes de *S. virgata* foram embebidas em água destilada e em soluções doadoras e sequestradoras de NO. O NO não teve influência sobre o processo de embebição e também não alterou as taxas respiratórias, porém interferiu no metabolismo de reservas das sementes. Os níveis mais baixos de rafinose e sacarose no segundo, terceiro e quarto dia após a embebição nas sementes tratadas indicam que o NO antecipou a degradação destas reservas germinativas no endosperma, resultando no acúmulo de alguns açúcares utilizados para o crescimento embrionário. No quarto dia, houve um aumento da quantidade relativa de galactose e manose, assim como um aumento da atividade específica da enzima α -galactosidase, que inicia o processo de degradação do galactomanano, indicando que o NO também estimulou a degradação da reserva pós-germinativa. No entanto, este efeito parece não ser diretamente mediado por ABA, uma vez que não houve diminuição no conteúdo de ABA no tratamento com SNP. Porém, o aumento do conteúdo de ABA no tratamento com SNP, observado no tegumento, sugere o envolvimento indireto deste hormônio, uma vez que o ABA sintetizado neste tecido interfere na síntese e modulação da atividade das enzimas de degradação do galactomanano. O tratamento com NO também promoveu uma diminuição nos teores de proteínas e incremento no teor de alguns aminoácidos sugerindo um estímulo direto da degradação de proteínas de reserva pelo NO. De modo geral, o NO afetou o metabolismo das sementes de *S. virgata*, tendo em vista as variações nos teores de carboidratos, proteínas, aminoácidos e açúcares alcoóis, observadas tanto no endosperma quanto na raiz.

2. INTRODUÇÃO

Uma das principais estratégias de adaptação das sementes de Angiospermas é o acúmulo de certos compostos de reserva que serão utilizados para o crescimento e desenvolvimento inicial da plântula (Buckeridge *et al.* 2000b). A composição das reservas presentes em sementes é variável, porém as substâncias encontradas em grande quantidade são os carboidratos, os lipídeos e as proteínas (Buckeridge *et al.* 2004a). Os carboidratos são os compostos de reserva encontrados em maior proporção nas sementes, sendo fonte de energia e de carbono para suprir o desenvolvimento inicial da plântula (Buckeridge *et al.* 2004b, Marcos Filho 2005).

Os oligossacarídeos da série rafínosica são reservas de carboidratos encontradas em praticamente todas as sementes. Estes oligossacarídeos se acumulam durante o desenvolvimento da semente, sendo rapidamente degradados no início da germinação (Peterbauer & Richter 2001). Em Leguminosas estes são a primeira reserva de carboidratos a ser degradada durante a germinação, precedendo a degradação de outros compostos, como o amido e os polissacarídeos de reserva de parede celular (Reid 1971, Buckeridge *et al.* 1992, Buckeridge *et al.* 1995b).

As reservas de polissacarídeos podem estar presentes na parede celular dos cotilédones e dos endospermas das sementes, sendo designadas polissacarídeos de reserva de parede celular (PRPC) (Reid 1985, Buckeridge & Reid 1996, Buckeridge *et al.* 2000b). Para utilização destes compostos, diversas famílias desenvolveram mecanismos bioquímicos extremamente complexos, que permitem o desmonte da parede celular e o uso de seus produtos de hidrólise (Buckeridge 2010). Os PRPC podem ser classificados em três grupos distintos: os mananos (mananos puros, glucomananos e galactomananos), os xiloglucanos e os galactanos. Estes polissacarídeos, além da função de reserva, apresentam funções secundárias como proteção do embrião contra danos mecânicos (mananos), controle da embebição e distribuição de água nos tecidos das sementes (xiloglucanos e galactomananos) e controle da expansão celular nos cotilédones (galactanos) (Buckeridge *et al.* 2000a, 2000b).

Dentre os PRPC, os galactomananos ocorrem tipicamente no endosperma de sementes da família Leguminosae, tendo sido encontrados em aproximadamente 50% das espécies de leguminosas estudadas até o momento (Buckeridge 2010), mas também estão presentes em sementes de espécies de outras famílias como Compositae e Convolvulaceae (Dea & Morrison 1975, Guzmán & Hernandez 1982). Embora um grande número de espécies tenha sido relatado como acumuladoras de galactomanano em suas sementes (Dea & Morrison

1975, Ganter *et al.* 1993, Buckeridge *et al.* 1995b, Anulov *et al.* 1998), apenas em algumas a mobilização deste polissacarídeo foi estudada em detalhe. *Trigonella foenum-graecum* (feno grego) foi uma das primeiras espécies modelo para o estudo da mobilização de galactomanano (Reid 1971), para a qual foram caracterizadas as enzimas hidrolíticas que atuam na degradação do galactomanano (Leung *et al.* 1981). Para esta espécie, também foi sugerido pela primeira vez o papel do galactomanano no controle da embebição (Reid & Bewley 1979), e o controle hormonal da degradação desta reserva (Malek & Bewley 1991).

Sesbania virgata está entre as espécies nativas utilizadas como modelo para compreender a mobilização do galactomanano como polissacarídeo de reserva. *S. virgata* é uma planta de crescimento rápido que ocorre principalmente em regiões úmidas e alagadas em matas ciliares da região Neotropical e que está associada aos estágios iniciais de sucessão ecológica (Kissmann & Groth 1999, Potomati & Buckeridge 2002). Tonini *et al.* (2006, 2007) demonstraram a importância do tegumento na degradação do galactomanano em *S. virgata*, sendo este tecido metabolicamente ativo, com alto teor de ABA e atividade das enzimas hidrolíticas. Lisboa e colaboradores (2006) isolaram a endo- β -mananase de *S. virgata* e observaram alta atividade desta enzima na extremidade da radícula, sugerindo o papel deste polissacarídeo na protusão da radícula. Experimentos com inibidores de transcrição e tradução indicaram que em *S. virgata* não ocorre síntese *de novo* das enzimas hidrolíticas (Tonini *et al.* 2010a). Os autores sugerem que as enzimas são armazenadas em corpos protéicos, sendo liberadas para a parede celular de reserva no momento de sua utilização (Tonini *et al.* 2010a). Em *S. virgata*, além da função de polissacarídeo de reserva utilizado para o crescimento da plântula, também foi sugerido o papel do galactomanano no controle da embebição no início da germinação (Buckeridge *et al.* 2000b, Potomati & Buckeridge 2002).

Os galactomananos são polissacarídeos constituídos de uma cadeia principal formada por unidades de D-manose unidas entre si por ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 4), a qual estão ligadas unidades de D-galactose através de ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6), formando ramificações simples (Moe *et al.* 1947, Manzi & Cerezo 1984).

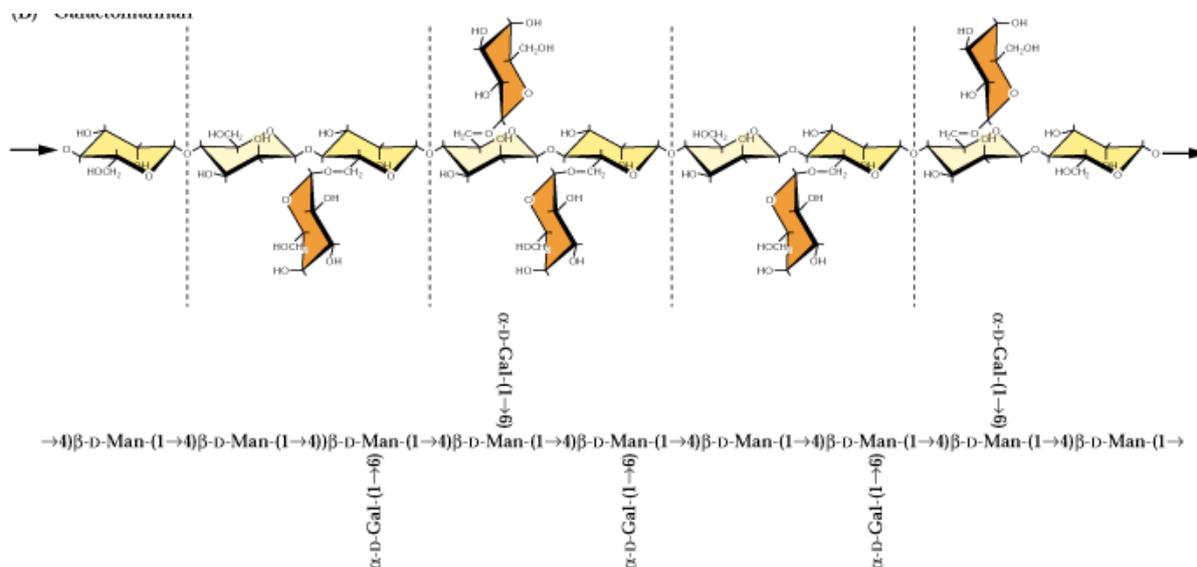


Figura 1. Estrutura do polissacarídeo galactomanano, constituído de uma cadeia principal de manoses ligadas β -(1 \rightarrow 4), com ramificações de galactoses ligadas à cadeia principal por ligações do tipo α -(1 \rightarrow 6). Fonte: Buchanan *et al.* 2000.

A mobilização do galactomanano se inicia após a germinação (Buckeridge *et al.* 2000a) e ocorre pela ação de três enzimas hidrolíticas: α -galactosidase (EC 3.2.1.22), endo- β -mananase ou β -1,4-manano-endo-hidrolase (EC 3.2.1.78) e exo- β -manosidase ou β -manosidase (EC 3.2.1.25) (Reid & Meier 1972, McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 1995a, Buckeridge & Reid 1996, Ademark *et al.* 1998, Buckeridge *et al.* 2000a). A primeira enzima a atuar é a α -galactosidase, que quebra as ligações α -(1 \rightarrow 6) existentes entre as unidades de galactose e manose, liberando galactoses livres. Como as ramificações de galactose na cadeia principal de manano interferem na ação hidrolítica da endo- β -mananase (Reid & Edwards 1995), esta enzima só atua sobre as ligações do tipo β -(1 \rightarrow 4) existentes entre as unidades de manose da cadeia principal após a desgalactosilação do polímero pela α -galactosidase. Em seguida, a exo- β -manosidase, controlada pela ação hidrolítica da α -galactosidase e da endo- β -mananase, quebra as ligações β -(1 \rightarrow 4) entre as unidades de manose dos oligossacarídeos produzidos pela endo- β -mananase, liberando manoses livres (McCleary 1983, Buckeridge *et al.* 2000a).

É essencial para o ciclo de vida das plantas a utilização efetiva das reservas das sementes durante a germinação e estabelecimento da plântula, por isto alguns hormônios e compostos estão envolvidos na regulação da degradação dessas reservas. O ácido abscísico (ABA) é um potente inibidor da degradação do galactomanano, e está envolvido no mecanismo de regulação dessa mobilização em sementes de *Ceratonia siliqua* (Seiler 1977), *Lactuca sativa* (alface) (Halmer & Bewley 1979, Toorop *et al.* 1999), *Lycopersicon esculentum* (tomate) (Nomaguchi *et al.* 1995, Toorop *et al.* 1999), *Trigonella foenum-*

graecum (Reid & Meier 1973, Malek & Bewley 1991, Kontos & Spyropoulos 1995) e *Sesbania virgata* (Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006).

A presença do ABA inibe a degradação do galactomanano, interferindo na atividade das enzimas hidrolíticas e modulando interações bioquímicas e fisiológicas entre o endosperma e o embrião durante e após a germinação de sementes (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2000a). Em *Sesbania virgata*, o ABA exógeno inibe a mobilização do galactomanano por inibir a atividade de α -galactosidase no endosperma (Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006). Em sementes de café e tomate, a atividade da endo- β -mananase é inibida em presença de ABA, antes e depois da germinação (Leviatov *et al.* 1995, Nonogaki & Morohashi 1996, Toorop *et al.* 1999). Em sementes de tomate, a giberelina atua na regulação da germinação induzindo o enfraquecimento do endosperma, no entanto ainda não foi observada a ação indutora do ácido giberélico na degradação de galactomananos em sementes de leguminosas (Groot & Karssen 1987, Buckeridge *et al.* 2000a).

O NO é um radical livre gasoso que se difunde rapidamente através das membranas e que tem sido reportado como uma potente molécula de sinalização em plantas. Quando aplicado exogenamente, o NO estimula a germinação de sementes de alface no escuro (Beligni & Lamattina 2000), a germinação de sementes de *Paulownia tomentosa* (Giba *et al.* 1998) e a germinação e crescimento radicular de tremoço (*Lupinus luteus*) (Kopyra & Gwozdz 2003) e induz a quebra de dormência em sementes de *Arabidopsis* e cevada (Bethke *et al.* 2004b, 2006a).

Bethke e colaboradores (2004b, 2006b) demonstraram que o NO é provavelmente um componente da via de sinalização que promove a quebra de dormência, sugerindo que o NO pode diminuir a sensibilidade das sementes ao ABA, reduzindo a dormência imposta pelo hormônio. Sarath e colaboradores (2006) demonstraram que a aplicação de SNP, doador de NO, reverte parcialmente os efeitos inibitórios da aplicação de ABA sobre a germinação, a alongação da radícula e a emergência do coleóptilo em *Panicum virgatum*. Os autores sugerem que o NO pode ser um desencadeador endógeno direto do processo de quebra de dormência em algumas espécies de gramíneas (Sarath *et al.* 2006).

O papel direto do NO em enzimas hidrolíticas que mobilizam reservas foi demonstrado em trigo, que acumula amido como composto de reserva, sendo que na presença de solução doadora de NO foi observado um aumento de atividade da β -amilase (Zhang *et al.* 2005). A resposta da β -amilase ao NO também foi observada em sementes de outras espécies, como soja, cevada, milho, *Arabidopsis* e melancia (Zhang *et al.* 2005).

Contudo, o papel do NO sobre a atividade de enzimas hidrolíticas envolvidas no processo de degradação de polissacarídeos de reserva de parede celular ainda não foi investigado, assim como a possível relação entre o NO e o ABA neste processo.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do óxido nítrico (NO) na germinação e no desenvolvimento inicial (embebição, degradação de reserva, protrusão da radícula) de *Sesbania virgata*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do NO sobre o processo de embebição;
- Analisar possíveis efeitos tóxicos do doador de NO sobre o metabolismo respiratório das sementes de *S. virgata*;
- Determinar a participação do NO como regulador da degradação das reservas da semente;
- Mapear alterações metabólicas induzidas pelo tratamento com NO nos diferentes tecidos da semente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Sementes de *Sesbania virgata* foram coletadas de 15 matrizes situadas em Lavras, MG, em março de 2009 e foram armazenadas em frascos de vidro a temperatura ambiente.

4.2. Condições de germinação e coleta do material

Para a realização dos experimentos, as sementes de *S. virgata* foram escarificadas por abrasão em lixa e colocadas para germinar em câmaras do tipo BOD a 26°C com fotoperíodo de 12 horas. Para as análises bioquímicas as sementes foram coletadas e dissecadas separando-se o endosperma, o tegumento e a raiz, do segundo ao quarto dia após a embebição, que compreende o início e o pico de degradação das reservas de galactomanano. Estes tecidos foram macerados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C até serem submetidos às análises bioquímicas.

No Experimento 1 as sementes de *S. virgata* foram embebidas em placas de Petri, contendo 2 folhas de papel de filtro umedecido com solução 200 µM de SNP aplicada por três dias consecutivos ou em água (controle). Para cada tratamento foram utilizadas três placas de

Petri (15 cm) contendo 15 sementes cada, embebidas em 7 mL de solução do respectivo tratamento.

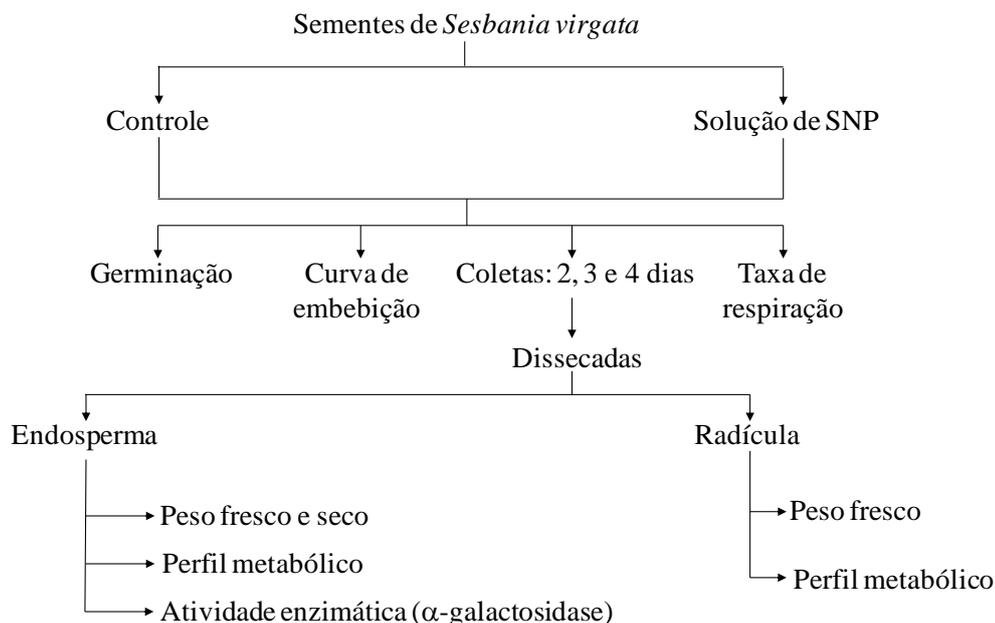


Figura 2. Fluxograma dos métodos utilizados no Experimento 1.

Visando avaliar se os efeitos do doador SNP são diretamente relacionados à liberação de NO, foi realizado um segundo experimento utilizando o cPTIO, sequestrador de NO (Experimento 2). Para tal, as sementes de *S. virgata* foram embebidas em placas de Petri, contendo 2 folhas de papel de filtro umedecido com solução 200 μ M de nitroprussiato de sódio (SNP) e solução 200 μ M de cPTIO+SNP aplicados por três dias consecutivos e em água (controle). Para cada tratamento foram utilizadas quatro placas de Petri (9 cm) contendo 10 sementes cada, embebidas em 3,5 mL de solução do respectivo tratamento.

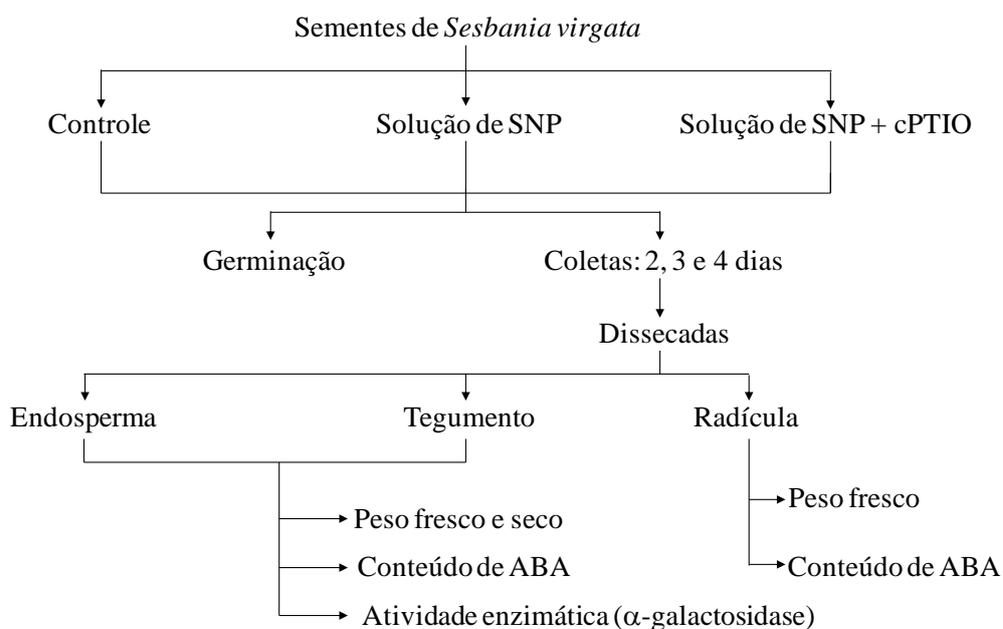


Figura 3. Fluxograma dos métodos utilizados no Experimento 2.

4.3. Análise da embebição de sementes de *S. virgata*

As análises de embebição foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica. Para determinar o tempo de embebição, de ativação do metabolismo da semente e do início do processo de germinação, sementes maduras de *Sesbania virgata* embebidas em água (controle) e solução de SNP 200 μM por períodos de até 48 horas, foram avaliadas quanto ao teor de água da semente a cada 4 horas. O teor de água (expresso em porcentagem, com base na massa úmida) e o conteúdo de matéria seca das sementes (mg.semente^{-1}) foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa a $103 \text{ }^\circ\text{C} \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, por 17 horas (Brasil 1992), utilizando quatro repetições de 5 sementes cada.

4.4. Testes de respiração das sementes

As análises de respiração foram realizadas no Núcleo de Pesquisa em Sementes do Instituto de Botânica. Após 24, 48 e 72 horas de embebição em placas de Petri, as sementes tratadas com água e SNP 200 μM foram acondicionadas em frascos de vidro de 600 mL, hermeticamente fechados, com tampas perfuradas, formando orifícios que foram recobertos por um septo de borracha e foram incubadas em estufa a 25°C . Para cada tratamento foram utilizadas quatro placas de Petri (9 cm) contendo 10 sementes cada, embebidas em 3,5 mL de água ou solução de SNP. Antes da introdução das sementes nas embalagens, foram determinadas as massas fresca e seca totais (g) e o teor de água. O fechamento das embalagens foi determinado como sendo o início do experimento e a cada 24 horas foram

tomadas as medidas do consumo de oxigênio e de produção de dióxido de carbono. O consumo de oxigênio (O₂) e a produção de dióxido de carbono (CO₂) foram determinados em analisador de O₂/CO₂ modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, EUA). Os valores obtidos nas avaliações foram somados e divididos pela massa seca total da amostra de sementes, obtendo-se o valor expresso em micromol por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ de massa seca $\cdot \text{d}^{-1}$). Também foi calculado o quociente respiratório (QR), dividindo-se o valor obtido para produção de CO₂ pelo obtido para o consumo de O₂ ($\text{QR}=\text{CO}_2.\text{O}_2^{-1}$), sendo que ambos os valores são expressos em $\mu\text{mol}.\text{g}^{-1}$ de massa seca $\cdot \text{d}^{-1}$, conforme descrito por Kader & Saltveit (2002).

O consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelas sementes contidas no frasco foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal (21% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). Considerando-se a pressão atmosférica local como 0,90 atm (Lamarca 2009), os valores obtidos em porcentagem de O₂ ou de CO₂ foram convertidos para pressão parcial do gás, segundo a fórmula $p_1/P=v_1\%/V\%$ (Feltre 1982), onde:

p_1 = pressão parcial do gás (em atm);

P = pressão atmosférica local (=0,90 atm);

$v_1\%$ = volume do gás, em porcentagem;

$V\%$ = volume total (=100%).

A seguir, baseando-se no volume dos frascos e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para μmol de O₂ e de CO₂, pela equação de Clapeyron, $p_1V=nRT$, onde:

V = volume total de ar do frasco (em L)

n = número de moles do gás

R = constante universal dos gases perfeitos (0,082 atm.L.mol⁻¹.K⁻¹)

T = temperatura (em Kelvin)

4.5. Extração e determinação das proteínas totais e atividade de α -galactosidase

Os endospermas e tegumentos isolados e macerados em nitrogênio líquido foram homogeneizados em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,8 e deixados em repouso por 30 minutos em câmara fria (5°C). Para as extrações foram utilizados 100 mg de endosperma do experimento 1 e 50 mg de endosperma e tegumento do experimento 2. Após o repouso, os extratos foram centrifugados a 13.000 g por 5 minutos e o sobrenadante submetido à dosagem de proteínas e de atividade da α -galactosidase.

Alíquotas de 20 μL do sobrenadante tiveram seu conteúdo de proteínas estimado pelo método de Bradford (1976). As leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda (λ) de 595 nm.

Para a análise da atividade de α -galactosidase, os sobrenadantes foram ensaiados utilizando-se o substrato sintético específico p-nitrofenil- α -D-galactopiranosídeo conforme descrito por Reid & Meier (1973). Na dosagem, utilizou-se entre 10 e 70 μL de amostra, dependendo do tecido e dia de coleta, acrescidos de 10 μL de solução tampão McIlvaine pH 4,4 (0,1 M de ácido cítrico, 0,2 M Na_2HPO_4) e 10 μL do substrato específico, incubando-se por 20 minutos em banho-maria a 45 °C. A atividade enzimática foi interrompida com 1 mL de solução de Na_2CO_3 0,1 N. A cor amarela produzida foi medida em espectrofotômetro Shimadzu (UV-1201) no comprimento de onda (λ) de 405 nm. O coeficiente de extinção molar de p-nitrofenil foi adotado como 18400 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Reid & Meier 1973) para calcular a quantidade de p-nitrofenil liberado em unidades de $\mu\text{mol galactose} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

4.6. Extração e quantificação de ABA por CG-EM-MSI

As extrações de ABA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica da USP, com a colaboração do Dr. Luciano Freschi. As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com a colaboração do Dr. Eduardo Purgatto.

Para a extração de ABA, 100 mg de massa fresca de raízes (3 e 4 dias), endospermas e tegumentos macerados em nitrogênio líquido foram extraídos em 500 μL de solução de isopropanol: ácido acético (95:5) e adicionado 100 ng de padrão marcado de ABA ($[^2\text{H}_6]$ -ABA). As amostras foram mantidas sob agitação a 4°C por 2 horas, centrifugadas a 13000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi seco em fluxo de nitrogênio gasoso até restar cerca de 20-50 μL . Foram acrescentados 100 μL de água deionizada e o pH foi ajustado entre 3,5 e 2,5. Após adição de 500 μM de acetato de etila, as amostras foram centrifugadas a 13000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi seco completamente em fluxo de N_2 gasoso, ressuspenso em 20 μL metanol, metilado com 10 μL de trimetilsilil-diazometano durante 30 minutos e em seguida seco novamente em N_2 gasoso. As amostras metiladas foram solubilizadas com 30 μL de acetato de etila e, então, analisadas em cromatógrafo a gás (CG) Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um espectrômetro de massa modelo 5973. Utilizou-se uma coluna de separação HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, I.T. 0,5 μm), tendo hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL min^{-1} . As injeções foram realizadas por meio de injetor automático Hewlett-

Packard modelo LS-1100 e o volume injetado de cada amostra foi de 2 μL , sem a utilização do divisor de amostras (*splitless*), com fluxo de ventilação de 20 mL min^{-1} após 2 minutos da injeção. A coluna foi mantida a 150°C por 3 minutos, seguida de rampa de temperatura de 150°C até 200°C em taxa de 4°C min^{-1} e, por fim, de 200°C até 300°C em taxa de 10°C min^{-1} . A quantificação do ABA foi realizada por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa, com monitoramento seletivo de íons (CG-EM-MSI), conforme descrito em Ludwig-Muller *et al.* (2008). Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) 134, 162 e 190 correspondentes ao ABA endógeno e 138, 166 e 194 correspondentes ao [$^2\text{H}_6$]-ABA. A concentração endógena de ABA foi obtida pela comparação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 190 e 194.

4.7. Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), seguindo método descrito previamente por Roessner *et al.* (2001), com modificações. Os endospermas e raízes de sementes de *Sesbania virgata* foram homogeneizados em nitrogênio líquido com a ajuda de almofariz e pistilo. Aproximadamente 50 mg de material de endosperma e raízes foram utilizados para extração e derivatização. O material foi extraído em 500 μL de metanol:clorofórmio:água na proporção de 12:5:1, agitado e aquecido a 60 °C por 30 minutos, sendo agitados a cada 10 minutos e centrifugado a 13000 g por 2 minutos. A fase polar (superior) foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e foram adicionados 350 μL de água deionizada. A mistura foi agitada e centrifugada a 13000 g por 5 minutos. Quinhentos microlitros da fase polar (fase superior) foram coletados e secos a vácuo, sendo então armazenados a -20°C até derivatização. Para derivatização, 200 μL de piridina e 50 μL de BSTFA foram adicionados ao material seco, submetidos à agitação e aquecidos a 75 °C durante 1 hora. As amostras foram então transferidas para frascos de vidro, os quais foram lacrados e injetados automaticamente em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (Agilent Technologies, EUA). Os dados foram gerados e analisados através do programa Chemstation (Agilent Technologies, EUA). Os picos detectados foram comparados com os padrões corridos e com a NIST Mass Spectral Library. Os compostos obtidos foram confirmados através do cálculo do índice de Kovats.

4.8. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o teste F a 5% de probabilidade. As médias foram comparadas entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização Fisiológica

A avaliação da taxa de germinação mostrou que as sementes atingiram a porcentagem máxima entre o segundo e terceiro dia após a embebição no tratamento com água e SNP, respectivamente (Fig. 4). De forma similar ao observado no capítulo 1, o doador de NO não interferiu na capacidade germinativa das sementes, pois não foram observadas diferenças significativas entre o controle e o tratamento com SNP.

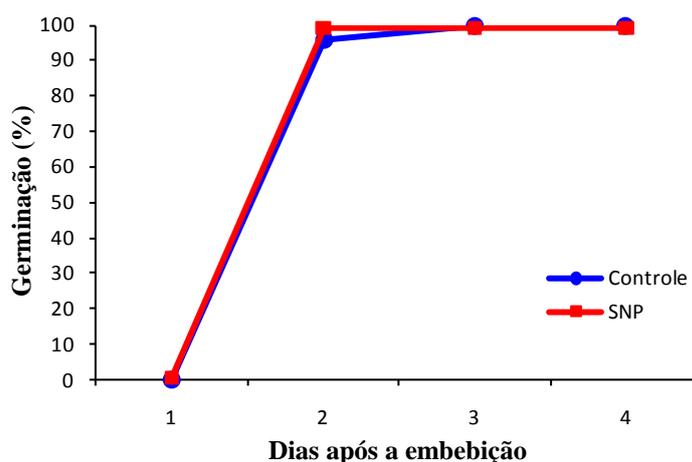


Figura 4. Taxa de germinação de sementes de *Sesbania virgata*, do primeiro ao quarto dia após a embebição em água (controle) e solução 200 µM de SNP (aplicada por 3 x). Os valores representam a média de três repetições.

A absorção de água pelas sementes é o primeiro passo da germinação, sem o qual este processo não pode ocorrer. A reativação do metabolismo, conhecida por fase I, é caracterizada pelo rápido aumento da respiração, proporcional ao aumento da hidratação dos tecidos das sementes. Os resultados obtidos para a embebição de sementes de *Sesbania virgata* (Fig. 5) demonstram que o final da fase I (Bewley & Black 1994) ocorreu por volta de 20 horas após o início da embebição tanto nas sementes controle quanto nas tratadas com o doador de NO. Na indução do crescimento ou fase II, a atividade respiratória se estabiliza assim como a absorção de água, que ocorreu entre 20 e 24 horas após a embebição, seguida pelo início da fase III na qual a absorção da água tende a aumentar e ocorre a ruptura da testa produzida pela emergência da radícula e o crescimento da plântula (Guimarães 1999). As sementes de *S. virgata* apresentavam inicialmente teor de água por volta de 10 % e após 48 horas de embebição, quando as sementes atingiram 100 % de germinação, foram observados valores entre 60% e 70% de teor de água.

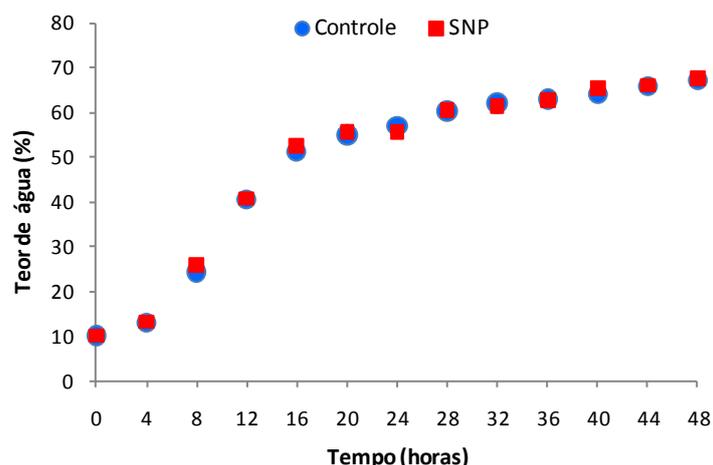


Figura 5. Curva de embebição de sementes de *Sesbania virgata* durante as primeiras 48 horas de embebição em água (controle) e solução 200 μM de SNP (aplicada por 3 x).

Desta forma, a realização da curva de hidratação em sementes de *S. virgata* embebidas em água e solução de SNP mostrou que o NO não afeta a embebição destas sementes durante o processo germinativo.

As taxas respiratórias das sementes de *S. virgata* do 2º ao 4º dia após a embebição foram semelhantes entre os dois tratamentos (Fig. 6A). Inicialmente, pode-se observar que no segundo dia, quando as sementes começam a germinar, as taxas respiratórias são mais baixas, e que a partir do terceiro dia estas taxas aumentam e se mantêm praticamente estáveis, porém há mais consumo de O_2 do que produção de CO_2 . Contudo, do terceiro para o quarto dia as sementes estabilizaram o consumo de O_2 e a produção de CO_2 . O quociente respiratório, razão entre produção de CO_2 e consumo de O_2 , se manteve abaixo de 1 durante o período avaliado, sendo que no quarto dia esse valor ficou próximo a 1 (Fig. 6B).

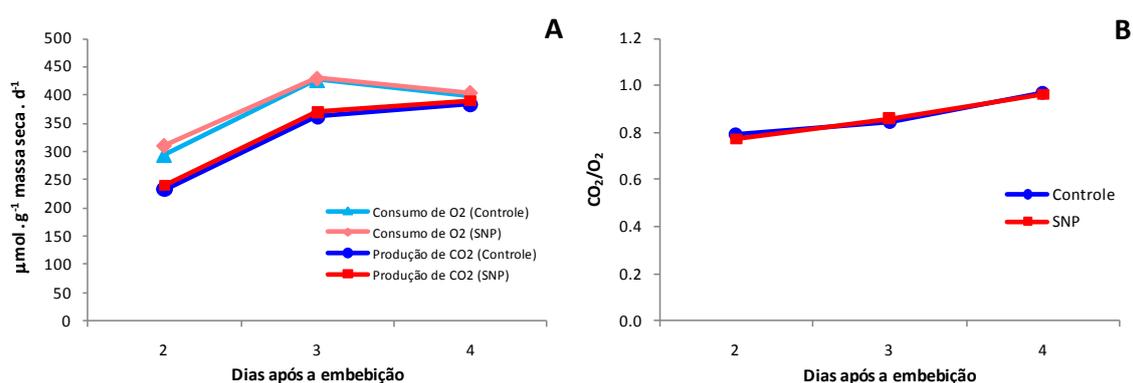


Figura 6. (A) Consumo de O_2 e produção de CO_2 e (B) Quociente respiratório (produção de CO_2 /consumo de O_2) em sementes de *Sesbania virgata* embebidas em água (controle) e solução 200 μM de SNP (aplicada por 3 x). Os valores médios do quociente respiratório foram calculados a partir de medições em quadruplicata do consumo de O_2 e produção de CO_2 . As sementes foram incubadas por 24 horas a 25°C em frascos de vidro com fechamento hermético. Valores expressos em média diária por grama de massa seca das sementes.

O quociente respiratório (QR) é um parâmetro utilizado para indicar qual via respiratória esta sendo utilizada na oxidação de um substrato. Os valores de QR obtidos para *S. virgata* foram menores ou iguais a 1, indicando que durante o processo germinativo e o desenvolvimento inicial destas plântulas as vias aeróbicas (valores próximos de 1) estão sendo utilizadas e não as vias anaeróbicas (valores acima de 1) (Labouriau 1983, Kader & Saltveit 2002, Saquet & Streif 2002). Os valores de QR também podem determinar o tipo de substrato utilizado na respiração das sementes. A determinação do tipo de substrato a partir do QR ocorre em função da molécula oxidada ter ou não em sua estrutura a presença de oxigênio, que exige menor ou maior quantidade desse elemento (Labouriau 1983). Na oxidação completa de um carboidrato o QR é igual a 1, na de um ácido orgânico o QR é maior do que 1 e quando os substratos iniciais são os ácidos graxos o valor do QR é menor que 1. Portanto, o QR inferior a 1 no segundo e terceiro dias sugerem a utilização de ácidos graxos como substrato para a respiração, enquanto no quarto dia (QR próximo de 1), possivelmente ocorra a utilização de carboidratos como substrato da respiração. Contudo, as taxas respiratórias semelhantes entre os tratamentos indicam que o doador de NO não inibiu a respiração, não atuando, portanto, como um inibidor metabólico de ação ampla e inespecífica.

5.2. Degradação das reservas

Observou-se um aumento gradativo na massa fresca das sementes durante e após a germinação em ambos os tratamentos (Fig. 7A), assim como na massa fresca das raízes (Fig. 7B). A massa fresca do endosperma apresentou queda no 3º e 4º dias, que correspondem ao período de degradação da reserva de galactomanano (Buckeridge & Dietrich 1996, Tonini *et al.* 2006, 2007), tanto no controle quanto nos tratamentos com SNP (Fig. 7C). Embora uma pequena diminuição da massa do endosperma tenha sido observada no 4º dia, alterações significativas não foram observadas entre o controle e os tratamentos. Os valores de massa fresca do tegumento permaneceram praticamente constantes por todo o período, sem diferenças significativas entre sementes controle e tratadas com NO (Fig. 7D).

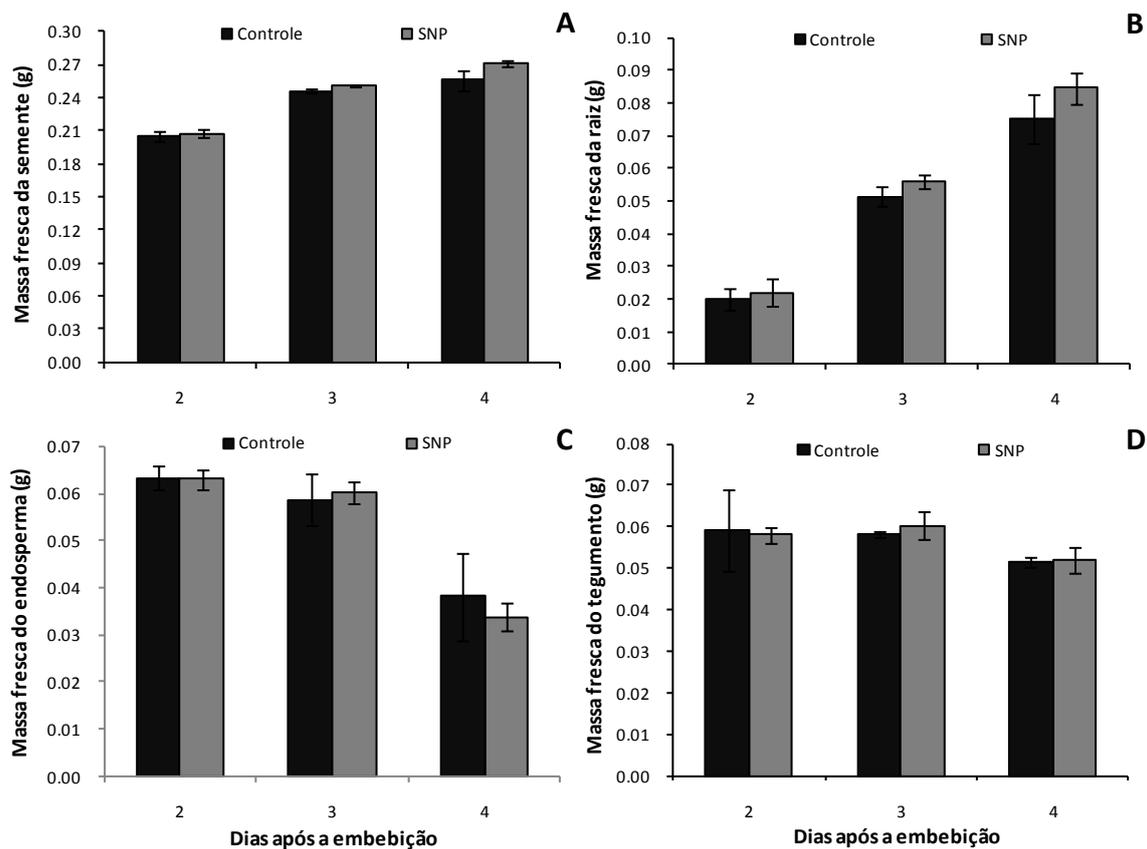


Figura 7. Massa fresca da semente íntegra (A), da raiz (B), do endosperma (C) e do tegumento (D) de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quarto dia após a embebição em água (controle) e em solução 200 μM de SNP aplicada 3 vezes. As barras correspondem ao desvio padrão da média ($n = 5$). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Analisando o teor das proteínas totais no endosperma, pode-se observar que houve uma diminuição no terceiro dia após a embebição em água e SNP (Fig. 8). Nas sementes tratadas com SNP foi observada uma diminuição significativa do teor de proteínas em relação ao controle no quarto dia após a embebição.

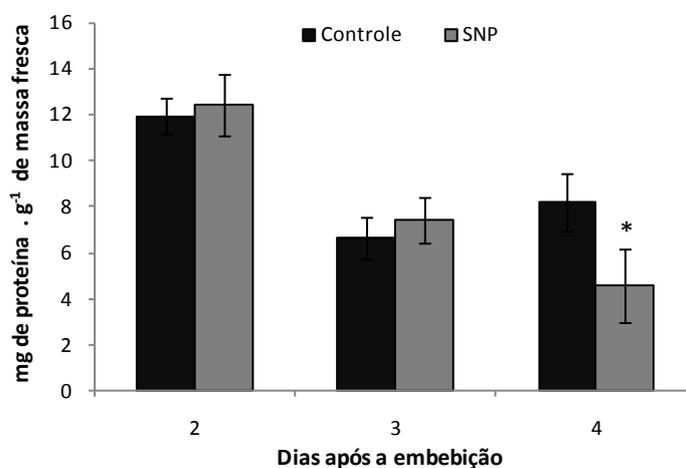


Figura 8. Teor de proteína total nos endospermas de sementes de *S. virgata*. As análises foram realizadas em sementes do segundo ao quarto dia após a embebição em água (controle)

e SNP (200 μM). As barras correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Para verificar o efeito do NO na atividade de enzimas hidrolíticas, foi medida a atividade de α -galactosidase como enzima marcadora, tendo em vista que a mesma inicia o processo de degradação do galactomanano e o fato de sua atividade preceder a das enzimas endo- β -mananase e exo- β -manosidase. No endosperma, a atividade total da α -galactosidase aumentou no terceiro dia após a embebição e permaneceu constante até o quarto dia nas sementes embebidas em água e SNP (Fig. 9A). A atividade específica foi mais elevada no 3º e 4º dias, sendo que um aumento significativo da atividade específica de α -galactosidase foi observado no 4º dia no tratamento com SNP (Fig. 9B).

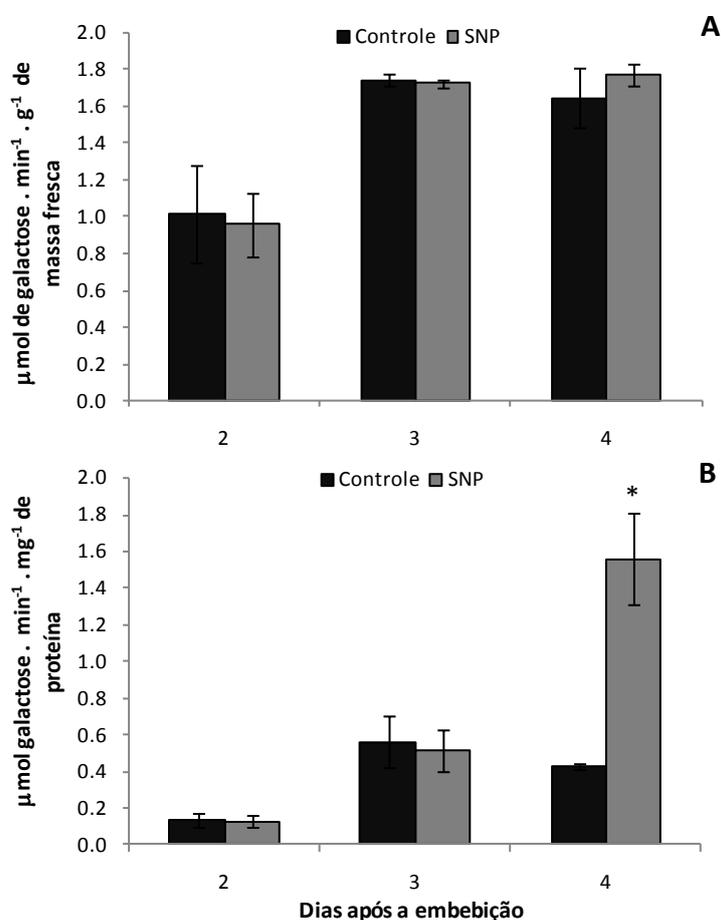


Figura 9. Atividade total (A) e atividade específica (B) da enzima α -galactosidase nos endospermas de sementes de *S. virgata*, durante a embebição em água (controle) e SNP (200 μM). As barras correspondem ao desvio padrão da média ($n = 3$).

A maior atividade específica da α -galactosidase no 4º dia, associada a uma tendência de diminuição da massa fresca do endosperma e de aumento da massa fresca da radícula (Fig. 7B e 7C), sugere que o doador de NO promoveu uma degradação mais acentuada da reserva de galactomanano.

A massa fresca do tegumento permaneceu constante por todo o período, tanto no controle quanto nos tratamentos com SNP e cPTIO (Fig. 10A). Ao analisar a atividade total da α -galactosidase nos tegumentos, observou-se um aumento gradativo da atividade até o 4º dia, sendo que os maiores valores foram encontrados no quarto dia após a embebição, em todos os tratamentos (Fig. 10B).

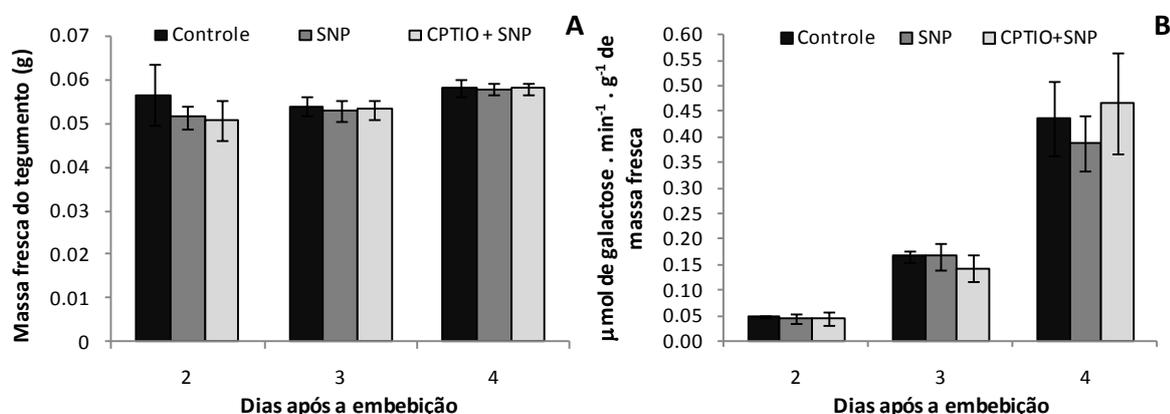


Figura 10. Massa fresca (A) e atividade total da enzima α -galactosidase (B) no tegumento de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quarto dia após a embebição em água (controle), em solução 200 μM de SNP e em solução 200 μM de cPTIO + SNP. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 5).

No entanto, não foram detectadas diferenças significativas na atividade total da enzima nos diferentes tratamentos. Os valores de atividade de α -galactosidase no tegumento são, em média, 4 vezes mais baixos do que os detectados no endosperma. As dosagens de atividade específica não puderam ser realizadas nos tegumentos por falta de material vegetal para dosagens de proteínas.

5.3. Perfil metabólico

A análise do perfil metabólico do endosperma por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) permitiu a identificação de alguns açúcares, polióis, ácidos orgânicos, ácidos graxos e aminoácidos (Fig. 11). Ao se comparar as sementes embebidas em água às tratadas com SNP, verifica-se uma tendência de diminuição de todos os compostos nas sementes tratadas, tanto no segundo (dados não mostrados) quanto no terceiro dia após a embebição (Fig. 11A). Já no quarto dia alguns compostos aumentaram, enquanto outros diminuiram (Fig. 11B).

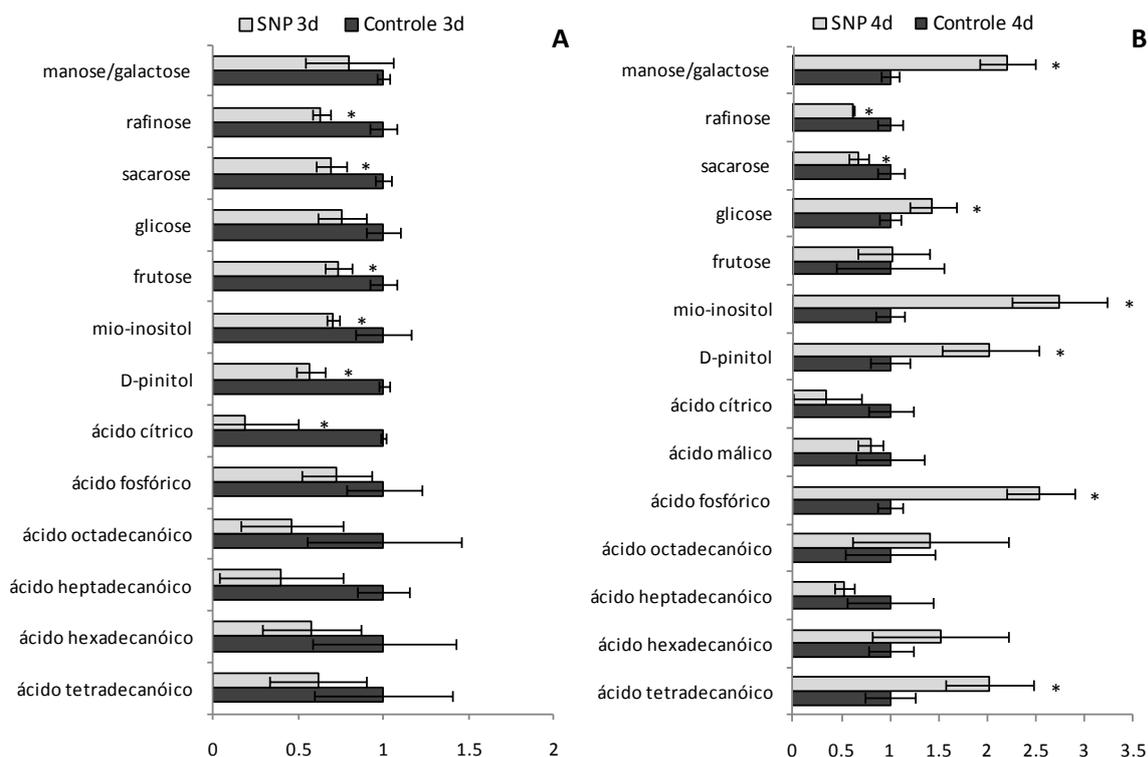


Figura 11. Proporção relativa de metabólitos presentes no endosperma de sementes de *Sesbania virgata* embebidas em água (controle) e SNP (200 μ M), durante o terceiro (A) e quarto (B) dia após a embebição. Estes compostos foram detectados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). Todos os valores foram normalizados a partir dos valores encontrados para o controle do mesmo dia. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 4) (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

A diminuição dos níveis de rafinose em sementes tratadas com o doador de NO do segundo ao quarto dia após a embebição indica que o NO tenha promovido maior degradação desta reserva, sugerindo que tenha sido utilizada no crescimento do embrião. Os maiores níveis de galactose e manose no quarto dia indicam que a degradação do galactomanano tenha sido mais acentuada no tratamento com SNP, já que houve um aumento dos monossacarídeos que são liberados durante a degradação deste polissacarídeo de reserva, corroborando os dados de atividade enzimática.

No 4º dia, foi observado um aumento significativo dos ciclitóis mio-inositol e D-pinitol, além do aumento de alguns ácidos graxos, nas sementes tratadas com SNP.

Os perfis metabólicos das raízes de sementes tratadas com o doador de NO são muito semelhantes aos das sementes controle no segundo e terceiro dias após a embebição, sem diferenças significativas para a maioria dos compostos detectados (dados não mostrados). Contudo, no quarto dia, há um aumento de mio-inositol e galactose/manose assim como uma diminuição na quantidade da maioria dos aminoácidos em sementes tratadas com SNP (tirosina, fenilalanina, prolina, leucina e alanina), com exceção de glutamina, asparagina e

homoserina, cujos teores apresentaram um pequeno aumento (Fig. 12). Os maiores níveis de mio-inositol e galactose/manose parecem estar relacionados com o aumento desses compostos também observados no endosperma.

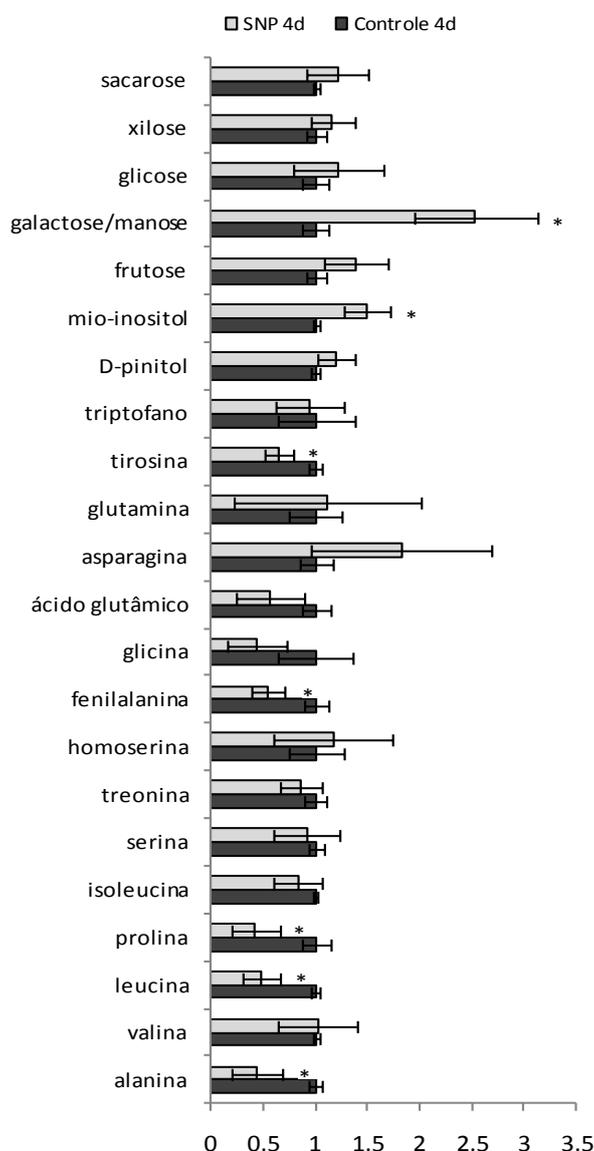


Figura 12. Proporção relativa de metabólitos presentes nas raízes de sementes de *Sesbania virgata* embebidas em água (controle) e SNP (200 μ M) no quarto dia após a embebição. Estes compostos foram detectados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (CG/EM). Todos os valores foram normalizados a partir dos valores encontrados para o controle. As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 4) (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

5.4. Conteúdo de ABA

Ao analisar o conteúdo de ABA endógeno no endosperma das sementes, observa-se que este hormônio apresentou maior concentração no 2º dia após a embebição em todos os tratamentos, porém o tratamento cPTIO+SNP apresentou valores menores de ABA em relação aos demais tratamentos (Fig. 13A). No terceiro dia após a embebição há uma

diminuição no conteúdo de ABA, que se mantém constante até o quarto dia, porém não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

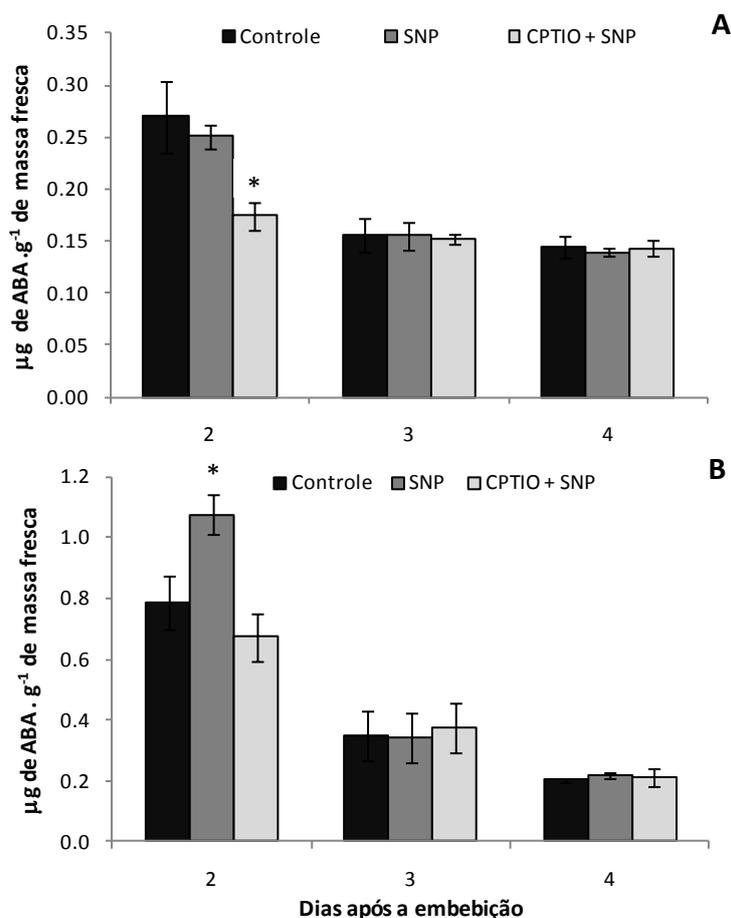


Figura 13. Conteúdo de ABA endógeno presente nos endospermas (A) e tegumentos (B) isolados de sementes de *S. virgata*, do segundo ao quarto dia após a embebição em água (controle), SNP (200 µM) e cPTIO + SNP (200 µM). As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 4).

No tegumento, o conteúdo de ABA endógeno é maior no segundo dia, porém há uma diminuição deste hormônio até o quarto dia após a embebição em todos os tratamentos (Fig. 13B). Contudo, diferenças significativas são observadas apenas no segundo dia, onde as sementes tratadas com SNP apresentam valores maiores de ABA (acima de 1 ug) em relação ao controle com água e ao sequestrador de NO (cPTIO+SNP).

Quando comparamos o conteúdo de ABA entre os tecidos no segundo dia, observamos que o tegumento possui teor três e quatro vezes mais elevado deste hormônio em relação ao endosperma, nas sementes controle e tratadas com SNP, respectivamente. Além disso, foi observada uma diminuição do teor de ABA ao longo do processo de germinação.

O conteúdo de ABA endógeno presente nas raízes de *S. virgata* apresentou pequena queda do terceiro para o quarto dia após o início da embebição em todos os tratamentos (Fig. 14). Porém, não foram observadas diferenças no teor de ABA entre os tratamentos.

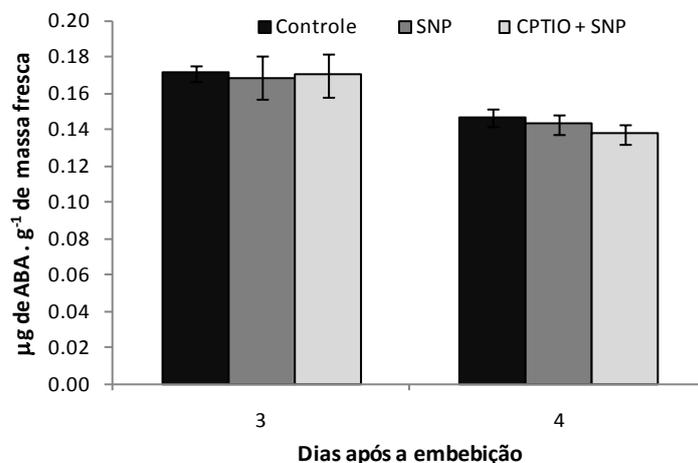


Figura 14. Conteúdo de ABA endógeno presente nas raízes de sementes de *S. virgata*, no terceiro e quarto dia após a embebição em água (controle), SNP (200 µM) e cPTIO + SNP (200 µM). As barras correspondem ao desvio padrão da média (n = 4).

6. DISCUSSÃO

Diversos autores sugerem a atuação de aquaporinas (proteínas canais de água) na germinação de sementes, mediando o controle temporal e espacial do transporte de água durante a embebição e o crescimento do embrião (Maurel *et al.* 2008). A relação entre o NO e estas proteínas no processo de germinação já foi sugerida em sementes de arroz (Liu *et al.* 2007), no entanto em sementes de *S. virgata* o NO não interferiu no processo de embebição, descartando inicialmente a regulação da atividade destas proteínas pelo NO.

Alguns fatores podem estar relacionados com o fato do NO não estimular a germinação em sementes de *S. virgata*. Primeiramente, as demais sementes testadas na literatura são sementes pequenas, cuja dormência pode ser quebrada por tratamentos térmicos (*Arabidopsis* e *Panicum sp.*) ou pela exposição à luz (cevada, alface). Nestes casos, o NO foi capaz de quebrar a dormência destas sementes, em substituição aos fatores comumente utilizados para superação da dormência. Com relação às sementes de outra leguminosa, *Lens culunaris* (lentilha), que assim como *S. virgata* possui dormência por impermeabilidade do tegumento, os autores não descrevem se as sementes foram escarificadas antes do início do experimento. Diferentemente da maioria dos experimentos, as sementes de lentilha foram imersas em solução doadora de NO por 12 horas, sendo a seguir germinadas em água. Com relação a *S. virgata*, a escarificação fez-se necessária, tendo em vista que testes preliminares com sementes não escarificadas embebidas em doadores de NO (dados não mostrados)

demonstraram a incapacidade do NO em superar a dormência destas sementes. Neste caso, a escarificação pode ter minimizado os efeitos do NO durante a embebição e germinação.

Além disso, a ausência de resposta pode ser devida às propriedades do galactomanano presente no endosperma, pois já foi demonstrado que este polissacarídeo, além de funcionar como reserva pós-germinativa, também atua como modulador da resistência mecânica do endosperma das sementes para facilitar a protrusão da radícula (Groot & Karssen 1987) e controla a embebição nas fases iniciais da germinação (Reid & Bewley 1979). As demais sementes estudadas acumulam amido (lentilha, *A. thaliana*, *P. virgatum*) e proteínas de reserva (cevada, lentilha), embora grandes quantidades de manano (74%) tenham sido encontradas no endosperma de sementes de alfaca (Dutta *et al.* 1994).

No início da embebição, a primeira atividade metabólica a ser intensificada é a respiração, que de valores ínfimos sobe a níveis bastante elevados, para que ocorra a retomada do crescimento (Labouriau 1983, Popinigis 1985). Sabe-se que o NO é capaz de inibir a respiração através da via do citocromo (Yamasaki *et al.* 2001). O fato do doador de NO, SNP, não ter alterado as taxas respiratórias indica que este doador não inibiu a respiração das sementes e, portanto, não provocou efeitos tóxicos em *S. virgata*.

Embora o SNP não tenha apresentado efeitos significativos na germinação, o mesmo interferiu no metabolismo de reservas das sementes de *S. virgata*. Os níveis mais baixos de rafinose do 2º ao 4º dia e de sacarose no 2º e 3º dia após a embebição em SNP sugerem que o NO acelerou a degradação desses açúcares presentes no endosperma. Os oligossacarídeos da série rafinósica ocorrem tanto no endosperma quanto no embrião de sementes de leguminosas e são degradados durante a germinação, resultando em um acúmulo transitório de galactose e sacarose livres no endosperma e eixo embrionário que são utilizados durante a germinação (Reid 1971, Buckeridge *et al.* 1995a, Buckeridge & Dietrich 1996). Provavelmente pelo fato destes açúcares (galactose e sacarose) serem acumulados transitoriamente, sendo a seguir utilizados pelo embrião, os níveis destes no endosperma no tratamento com SNP foram inferiores ou iguais aos do controle. No entanto, nas radículas no 4º dia após a embebição, um ligeiro aumento de sacarose e um aumento significativo de galactose/manose puderam ser observados, provavelmente relacionados com a utilização destes açúcares pelos tecidos em crescimento.

À primeira vista, a degradação intensa dos galactomananos em sementes de *S. virgata*, que ocorre entre o terceiro e quarto dia após a embebição não parece ter sido afetada pelo NO, uma vez que apenas uma ligeira diminuição da massa seca do endosperma, que indica a degradação dessa reserva, foi observada nas sementes tratadas com SNP. Porém, foi possível observar no quarto dia um aumento da atividade específica da enzima α -galactosidase, que

inicia o processo de degradação do galactomanano, assim como um aumento de galactose e manose no endosperma, indicando que o NO estimulou a degradação da reserva pós-germinativa. Resultados similares foram encontrados por Zhang e colaboradores (2005) que demonstraram que o SNP também foi capaz de induzir um rápido aumento na atividade β -amilase em sementes que acumulam amido (trigo, cevada, soja, arroz, milho, melancia e *Arabidopsis*).

Após a germinação, os galactomananos são desmontados até seus monossacarídeos constituintes (manose e galactose), que são absorvidos pelos cotilédones através de difusão passiva (galactose) e transporte ativo (manose) (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2000a). A análise do destino dos produtos de degradação do galactomanano de *Cyamopsis tetragonolobus*, sugere que ocorra a epimerização da manose e galactose em glucose, para uso na síntese de sacarose que aparentemente é o açúcar responsável pelo transporte dos produtos de degradação da reserva (carbono e energia) até o embrião em crescimento (McCleary 1983). Apesar desta via ainda não ter sido descrita em *S. virgata*, alguns autores já observaram aumento nos níveis de glucose nestas sementes durante o período de degradação do galactomanano. O aumento no teor de glucose observado nas sementes tratadas com NO sugere que também ocorra a epimerização da manose e galactose para a posterior síntese de sacarose nesta espécie. Além disso, o aumento de manose e galactose nas raízes no quarto dia pode estar relacionado ao transporte dos produtos de degradação da reserva do endosperma para o tecido em crescimento ou pode ser devido à reabsorção dos açúcares exsudados na água de germinação pelas raízes, uma vez que já foi relatada a presença de manose e galactose nos exsudatos de *S. virgata* no 4º dia após a embebição (Simões 2008). Estes açúcares são provavelmente utilizados como suprimento de carbono e energia para o crescimento da plântula (Reid 1971, McCleary 1983).

O ABA inibe a degradação do galactomanano, interferindo na atividade das enzimas hidrolíticas e modulando interações bioquímicas e fisiológicas entre o endosperma e o embrião durante e após a germinação de sementes (Bewley & Black 1994, Buckeridge *et al.* 2000a, Potomati & Buckeridge 2002). Altas concentrações de ABA endógeno também foram detectadas em sementes de *S. virgata*, sendo que o tegumento é o tecido com a maior quantidade deste hormônio (Tonini *et al.* 2006). As análises do conteúdo de ABA no presente trabalho também indicaram que este tecido possui maior quantidade de ABA e que durante o desenvolvimento inicial há uma diminuição deste hormônio no tegumento. Tonini e colaboradores (2006, 2007) sugerem que o tegumento desempenha um papel fundamental na mobilização de reservas, devido à grande quantidade de ABA encontrada neste tecido em sementes quiescentes e através de sua participação nos processos de síntese, modificação e/ou

armazenamento das enzimas hidrolíticas. Desta forma, o aumento no teor de ABA no tegumento de sementes tratadas com o doador de NO, observado no 2º dia após a embebição, pode estar relacionado às alterações observadas no 4º dia na degradação do galactomanano.

Em *Sesbania virgata*, a aplicação de ABA exógeno retarda a germinação e a mobilização do galactomanano através da inibição da atividade α -galactosidase no endosperma (Potomati & Buckeridge 2002, Tonini *et al.* 2006). Apesar do NO aparentemente estimular a degradação do galactomanano, por aumentar a atividade da α -galactosidase e a quantidade de seus produtos, este efeito parece não ser diretamente mediado por ABA, uma vez que não houve diminuição no conteúdo de ABA no endosperma. Porém, o aumento do conteúdo de ABA no tegumento de sementes tratadas com SNP sugere a ação indireta deste hormônio, via regulação da atividade/síntese de enzimas hidrolíticas. A relação entre sinalização do NO e a resposta ao ABA tem sido demonstrada por alguns pesquisadores (Bright *et al.* 2006, Sarath *et al.* 2007, Zhang *et al.* 2007, Neill *et al.* 2008). Em sementes de *Arabidopsis* o NO leva a diminuição dos níveis de ABA e quebra de dormência (Liu *et al.* 2009). Tonini e colaboradores (2010b) sugerem que o ABA e o etileno controlem antagonicamente a mobilização de reservas em sementes de *Sesbania virgata* sobre a influência de açúcares. O controle do NO no processo de degradação do galactomano também poderia estar relacionado em etileno. Em embriões de maçã já foi sugerida a relação entre NO e etileno sobre a quebra de dormência durante a germinação e o desenvolvimento de plântulas. Nesta hipótese, o NO estimularia a síntese de etileno, que possivelmente estaria envolvido na sinalização entre o NO e o ABA, reduzindo a sensibilidade a este hormônio (Gniazdowska *et al.* 2007).

As altas proporções de mio-inositol e D-pinitol detectadas no endosperma das sementes tratadas com SNP sugerem que o NO tenha estimulado a síntese de ciclitóis galactosilados que, assim como os RFOs, também possuem papel importante no ajuste osmótico intracelular entre o vacúolo e o citoplasma, além de atuar como redutor de ROS (Bohnert *et al.* 1995). O acúmulo de alguns polióis (tais como D-pinitol e D-ononitol) também é relatado freqüentemente em resposta à seca e à salinidade (Vernon & Bohnert 1992), e estes polióis ainda podem ser úteis no estoque do carbono sob condições ambientais adversas (Vernon *et al.* 1993). Além disto, o acúmulo de pinitol tem sido registrado em plantas que ocorrem em regiões costeiras como, *Honkenya peploides* e *Sesbania aculeata*, quando expostas a salinização (Ashraf & Harris 2004).

A mobilização de proteínas de reserva em leguminosas se inicia com o desenvolvimento do embrião, fornecendo o nitrogênio necessário para o crescimento das plântulas (Buckeridge *et al.* 2004b). Uma diminuição nos teores de proteínas totais ao longo

da germinação foi observada no endosperma de sementes de *S. virgata* germinadas em água, com teores mais baixos no 4º dia (Tonini 2008). Um comportamento similar pôde ser observado neste trabalho para as plantas controle, no entanto uma diminuição ainda maior foi observada nas sementes tratadas com NO. Esta diferença significativa sugere uma maior degradação de proteínas de reserva nas plantas tratadas. Paralelamente, uma tendência de aumento dos aminoácidos glutamina e asparagina foi observada em raízes no 4º dia. Em sementes de dicotiledôneas, as proteínas de reserva geralmente são degradadas em amidas (glutamina e asparagina), que são transportadas para o eixo em crescimento, sendo que a asparagina é o principal aminoácido de transporte em Leguminosas (Buckeridge *et al.* 2004a). Em contrapartida, Erol e colaboradores (2008) analisando o efeito de diferentes concentrações de SNP em sementes de lentilha, encontraram valores de proteínas totais maiores nos grupos experimentais em relação ao controle. Além disso, os valores de proteínas foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração do doador de NO. Estes autores sugerem que o SNP em doses crescentes pode inibir a ativação de proteases ou que o excesso de NO pode causar estresse para a planta, levando a um incremento de síntese de enzimas do sistema antioxidante. Tonini e colaboradores (2006, 2007) observaram que a remoção do tegumento de *S. virgata*, que possui altas concentrações de ABA, levou a diminuição dos níveis de proteínas de armazenamento após a germinação e sugeriu que, assim como em sementes de *Arabidopsis thaliana*, o ABA possa prevenir a degradação de proteínas de reserva (Garcarrubio *et al.* 1997). Neste trabalho, diferentemente do observado por Tonini *et al.* (2006, 2007), a diminuição do teor de proteínas foi precedida de um aumento no teor de ABA no tegumento, no 2º dia após a embebição

Seqüestradores de NO têm sido amplamente utilizados para indicar se as respostas biológicas dos doadores de NO são mediadas pelo seu papel como doador (Cao & Reith 2002). Entre os mais utilizados estão o PTIO (2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido) e seus derivados, especialmente o cPTIO (2-[4-carboxifenil]-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido) que interagem com NO e produzem nitritos como um subproduto (Akaike *et al.* 1993). Em *S. Virgata*, o cPTIO teve efeito semelhante ao do controle nas análises de massa fresca e na atividade total da α -galactosidase. No entanto, estes foram parâmetros com pequena variação na presença de SNP. No segundo dia após a embebição, o tratamento com cPTIO combinado com SNP levou a um menor conteúdo de ABA endógeno no endosperma, mas tal efeito não foi observado com o tratamento SNP, sugerindo que esta variação possa estar relacionada diretamente ao cPTIO. A realização de um controle contendo unicamente cPTIO é necessária para confirmar o resultado obtido tendo em vista que, apesar de serem relativamente específicos para o NO, os PTIOS tem a

capacidade de reagir com outros compostos, como o ácido ascórbico reduzido (Feelisch 1998).

Apesar das alterações provocadas pelo NO no metabolismo de reservas da semente de *S. virgata* não terem sido acompanhadas de grandes variações no teor de ABA, experimentos adicionais com fornecimento de ABA exógeno e de ABA associado ao SNP são necessários para entender o papel deste hormônio nas respostas mediadas por NO.

7. CONCLUSÕES

- O controle da embebição e da germinação de sementes de *S. virgata* não foi influenciado pelo SNP, uma molécula doadora de NO;
- O tratamento com doadores de NO não inibiu a taxa respiratória das sementes e, portanto, não promoveu efeitos tóxicos;
- O SNP induziu um aumento significativo na atividade específica de α -galactosidase durante o processo pós-germinativo, sugerindo que esta enzima possa ter sua atividade regulada por NO;
- O NO induziu a degradação de reservas germinativas e pós-germinativas (rafinose, galactomanano e proteínas) em sementes de *S. virgata*, sendo que o ABA pode estar indiretamente relacionado às alterações observadas;
- O NO afetou o metabolismo primário das sementes, tendo em vista as variações nos teores de carboidratos, proteínas, aminoácidos e açúcares alcoóis, observadas tanto no endosperma quanto na radícula.

CAPÍTULO 3

Influência do óxido nítrico sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plântulas de *Hymenaea courbaril* L.

1. RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que se difunde rapidamente através das membranas e que tem sido reportado como uma potente molécula de sinalização em plantas. A aplicação de compostos doadores de NO afeta processos de crescimento e desenvolvimento das plântulas, como a morfologia e crescimento de raízes. Já foi relatado que este efeito é dependente das concentrações do doador utilizado e das características da espécie em estudo (tamanho da semente, tipo de dormência, entre outros). Até o presente momento, não existem informações acerca do papel deste modulador na germinação e no desenvolvimento de raízes de plantas nativas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel do NO na germinação e no desenvolvimento inicial em *Hymenaea courbaril*. Tendo em vista os efeitos observados, os dados foram complementados pela avaliação do efeito do NO em lotes distintos de sementes de *H. courbaril*, com diferentes tempos de armazenamento. Sementes de *H. courbaril* foram embebidas em água destilada (controle) e soluções doadoras de NO (nitroprussiato de sódio (SNP) e S-nitrosoglutationa (GSNO)), tendo sido avaliados parâmetros de germinação e desenvolvimento radicular e alguns parâmetros bioquímicos, como análise do perfil metabólico e teor de celulose em raízes. Os doadores de NO induziram um aumento no tamanho das radículas aos 15 e 20 dias após a germinação, mas as maiores taxas de crescimento não puderam ser correlacionadas a um aumento da síntese de celulose. No entanto, a diminuição no teor de mio-inositol e pequenas mudanças no metabolismo primário sugerem alterações na síntese de polissacarídeos estruturais. A comparação de lotes de sementes de *H. courbaril* com diferentes tempos de armazenamento, indicou que o efeito do NO sobre a germinação possa depender do vigor das sementes, tendo em vista que os doadores SNP e GSNO aceleraram a germinação das sementes com menor vigor. Contudo, para que esse modulador possa ser utilizado como uma ferramenta em tecnologia de sementes, experimentos adicionais de caracterização do vigor dos lotes utilizados devem ser realizados.

2. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se demonstrado a importância do óxido nítrico (NO) como modulador de diversos processos fisiológicos em planta. Além de seu papel como indutor de quebra de dormência e germinação, o NO afeta o crescimento e desenvolvimento em plantas. Funcionalmente, o NO pode apresentar efeitos antagônicos, como indutor do alongamento em segmentos de raízes de milho (Gouvêa *et al.* 1997) e inibidor do alongamento do hipocótilo em plantas (Beligni & Lamatina 2000).

O possível papel do NO como mediador do desenvolvimento radicular, em resposta ao nitrato, foi sugerido pela atividade coordenada da nitrato redutase e da nitrito redutase (Forde 2002). A produção de NO por enzimas ligadas a membrana plasmática em raízes, cuja atividade é fortemente dependente da disponibilidade de nitrato no solo, também pode afetar o desenvolvimento de patógenos e de micorrizas (Stöhr & Stremlau 2006).

O aumento transitório na concentração de NO está envolvido no desenvolvimento de raízes adventícias mediado por ácido indol acético (AIA) (Pagnussat *et al.* 2002). Os autores sugerem que o NO possa mediar a resposta a auxina no processo de organogênese. A participação do NO no gravitropismo em raízes de soja foi descrita por Hu *et al.* (2005), tendo sido encontrado um acúmulo assimétrico de NO na raiz primária em resposta ao estímulo gravitropico. No desenvolvimento dos pelos radiculares, é necessária a ação coordenada dos hormônios e dos genes envolvidos (Favery *et al.* 2001). No entanto, Lombardo *et al.* (2006) sugerem ainda a participação do NO neste processo. Estes autores analisaram raízes de *Arabidopsis thaliana* tratadas com auxina sintética e sequestrador de NO. Foi observado que o tratamento com auxina sintética estimulou o crescimento dos pelos radiculares e a síntese de NO endógeno. No entanto, quando auxina sintética e sequestrador de NO foram fornecidos simultaneamente, os pelos não se desenvolveram, sugerindo que o NO, associado ao estímulo hormonal, tem um papel central na formação do pelo radicular.

Vários estudos têm focado na participação do NO durante os processos que requerem a síntese de componentes da parede celular, como a divisão celular (Pagnussat *et al.* 2002, Otvos *et al.* 2005, Correa-Aragunde *et al.* 2006), a expansão de células (Gouvêa *et al.* 1997, Hu *et al.* 2005) e a diferenciação (Gabaldón *et al.* 2005, Lombardo *et al.* 2006).

A parede celular vegetal é uma estrutura dinâmica que tem por funções manter a forma da célula, conferir resistência mecânica aos tecidos, controlar a expansão celular, entre outras. Essa diversidade de funções se reflete na diversidade de composição da parede. Segundo o modelo atual (Carpita & Gibeaut 1993), a parede primária é composta por 3 domínios

independentes – pectinas, celulose-hemicelulose e proteínas – com composição e funções distintas.

A celulose, componente majoritário da parede celular vegetal, é constituída por uma cadeia não ramificada de glucoses ligadas $\beta(1,4)$, sendo um dos poucos polímeros de parede sintetizados na membrana plasmática. O complexo de síntese de celulose em plantas superiores é formado por subunidades catalíticas, denominadas celulose sintases (CesA), que utilizam uridina difosfo-glucose (UDP-Glc) como substrato e são responsáveis pela síntese isolada das cadeias de $\beta(1,4)$ -glucano (Delmer 1999).

O NO apresentou efeito dose-dependente sobre o conteúdo de celulose em raízes de tomate. Baixas concentrações de SNP (pmoles de NO) aumentaram o conteúdo de celulose enquanto concentrações mais elevadas (nmoles de NO) tiveram o efeito oposto (Correa-Aragunde *et al.* 2006). Este resultado foi correlacionado com maior incorporação de glucose marcada (^{14}C -Glc) em celulose nas raízes tratadas. Análises anatômicas e moleculares sugeriram que o NO afetou a síntese de parede primária e a expressão dos genes *CesA1* e *CesA3*, envolvidos na síntese de celulose. Apesar de seu papel central em plantas, a compreensão dos mecanismos envolvidos na biossíntese de celulose e sua regulação ainda está bastante incompleta. A regulação da síntese de celulose pelo NO abre novas perspectivas sobre o estudo desta molécula, que constitui o biopolímero mais abundante no mundo (Englehardt 1995) e que é considerado o maior dreno de carbono atmosférico em plantas (Delmer & Haigler 2002).

Já foi demonstrado que fatores ambientais, como o aumento da concentração atmosférica de CO_2 , provocam incremento da síntese de celulose em folhas e caules de *Hymenaea courbaril* (jatobá) (Viveiros *et al.* 2007). Sequências parciais de sete cDNAs de celulose sintase (*CesA*) e um gene de celulose sintase-like (*CsL*), que codificam enzimas envolvidas na síntese de celulose, foram isoladas previamente de jatobá, sendo 5 deles relacionados a síntese de parede primária e dois à síntese de parede secundária (Gaspar & Buckeridge, comunicação pessoal). Estes dados, associados ao profundo conhecimento da mobilização de xiloglucanos de reserva em sementes de jatobá (Buckeridge & Dietrich 1990, Tiné *et al.* 2000, Santos & Buckeridge 2004), fazem desta espécie um excelente modelo de planta nativa para o estudo dos efeitos do NO na germinação e no desenvolvimento radicular.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do óxido nítrico (NO) na germinação e no desenvolvimento radicular de *Hymenaea courbaril*.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito de diferentes doadores de NO sobre a germinação e o desenvolvimento de raízes de jatobá;
- Correlacionar as variações de desenvolvimento com alterações no teor de celulose e no perfil metabólico;
- Avaliar o efeito de doadores de NO sobre a germinação de lotes de sementes com diferentes tempos de armazenamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material biológico

Sementes de *Hymenaea courbaril* (jatobá) foram adquiridas do Instituto Florestal, SP. As sementes do Lote 1 são procedentes da Floresta Estadual de Assis e foram coletadas em 10/12/2008. O lote apresentava 100% de pureza e 75% de germinação na data da aquisição. As sementes do Lote 2 são procedentes da Estação Ecológica de Pederneiras e foram coletadas em 10/8/2004. O lote apresentava 100% de pureza e 92,5% de germinação na data da aquisição.

4.2. Efeito do NO sobre a germinação e desenvolvimento de raízes de *H. courbaril*

As sementes de *H. courbaril* do lote 1, após tratamento prévio conforme descrito no Capítulo 1 (pág. 20), foram escarificadas por abrasão (com lixa) e colocadas para embeber em caixas do tipo gerbox contendo duas folhas de papel de germinação umedecido com água (controle) e soluções 200 μ M de SNP e GSNO, aplicadas por três vezes (3x), com intervalos de 3 dias entre cada aplicação. Foram utilizadas quatro repetições com 6 sementes cada. As sementes foram germinadas em câmaras do tipo BOD a 26°C com luz constante e as avaliações foram feitas registrando-se o número de sementes que emitiram raiz primária (maior que 2 mm) e de plântulas com desenvolvimento normal da parte aérea e radicular, além da medição do comprimento das raízes. As raízes foram coletadas 10, 15 e 20 dias após a embebição, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80°C até serem submetidas às análises bioquímicas.

4.3. Quantificação do teor de celulose

Amostras de raízes de jatobá (20 dias), pulverizadas em nitrogênio líquido, foram liofilizadas até a secagem completa e 200 mg de cada amostra foram submetidos à extração de açúcares solúveis. A extração dos açúcares foi realizada com etanol 80% em banho-maria a

80°C por 20 minutos, seguida de centrifugação a 1000 g por 15 min, em temperatura ambiente. Os precipitados foram re-extraídos mais duas vezes em etanol 80%, a 80°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram dissolvidos em 2 mL de água, congelados e liofilizados. O precipitado foi submetido à extração de amido com solução de dimetilsulfóxido 90% (DMSO) por 24 horas em agitador magnético e centrifugado a 1000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com água destilada por três vezes, congelado e liofilizado. A seguir, o precipitado foi submetido ao fracionamento de parede celular com extração de hemiceluloses e pectinas em solução de hidróxido de sódio 0,2 M contendo borohidreto de sódio (3mg/mL) em agitador magnético por 1 hora. Após o descarte do sobrenadante nova extração foi realizada com hidróxido de sódio 0,2 M contendo borohidreto de sódio (3mg/mL) em agitador magnético por 12 horas, em temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 1000g por 20 minutos e o precipitado foi submetido a nova extração de hemiceluloses fortemente ligadas à celulose com solução de hidróxido de sódio 4M contendo borohidreto de sódio (3mg/mL). Após o descarte do sobrenadante, o material remanescente foi ressuspensionado em 10 mL de H₂O deionizada, neutralizado com ácido acético glacial e o pH foi ajustado entre 6 e 8. Em seguida, as amostras foram novamente centrifugadas a 1000 g durante 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram congeladas e liofilizadas. O material remanescente foi pesado e colocado em tubo cônico Pyrex de 15 mL. Para a determinação do conteúdo de celulose, as amostras foram hidrolizadas com 5 mL do reagente de Updegraff (5% ácido nítrico, 15% ácido acético) (Updegraff 1969), sendo mantidas em placa agitadora a 100°C por 90 minutos. Após a centrifugação a 1000g por 20 minutos e descarte do sobrenadante, foram adicionados 10 mL de água deionizada. As amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante descartado. A seguir, as amostras foram congeladas, liofilizadas e pesadas para determinação da % de celulose por gravimetria.

4.4. Análise do perfil metabólico

O perfil metabólico foi analisado por CG-EM, seguindo método descrito previamente por Roessner *et al.* (2001), com modificações. As raízes de *H. courbaril* com 10, 15 e 20 dias foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de almofariz e pistilo, e aproximadamente 100 mg de raízes foram utilizados para extração e derivatização conforme descrito no Capítulo 1 (pág. 47).

4.5. Efeito do NO sobre a germinação de sementes de lotes diferentes

Visando verificar se as sementes de lotes diferentes respondiam de maneira distinta e, portanto, se os efeitos do NO dependiam da viabilidade das sementes, foram utilizadas sementes de jatobá de dois lotes, um coletado em 2004 (lote 2) e outro coletado em 2008 (lote 1). As sementes dos dois lotes foram escarificadas por abrasão em lixa e embebidas em água (controle) e soluções 200 μM de SNP e GSNO. Foram utilizadas três repetições com 6 sementes cada e estas sementes foram germinadas em câmaras do tipo BOD a 26°C com luz constante. As avaliações foram feitas registrando-se os números de sementes que emitiram raiz primária (maior que 2 mm). Também foi analisado o índice de velocidade de germinação (IVG) através da adaptação da fórmula do Índice de Velocidade de Emergência (Maguire 1962) e o tempo médio de germinação (TM).

4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, empregando-se o teste F a 5% de probabilidade. As médias foram comparadas entre si, pelo teste de Tukey a 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Efeito do NO sobre a germinação e desenvolvimento radicular

Ao observar os efeitos da aplicação de solução contendo 200 μM dos doadores de NO, SNP e GSNO, sobre a porcentagem de germinação ao longo do período de sementes do lote 1 verificou-se que a taxa máxima de germinação (91%) foi atingida no 16º dia após a embebição (Fig. 1). Porém, não houve diferença estatística na taxa de germinação entre o controle e os doadores de NO.

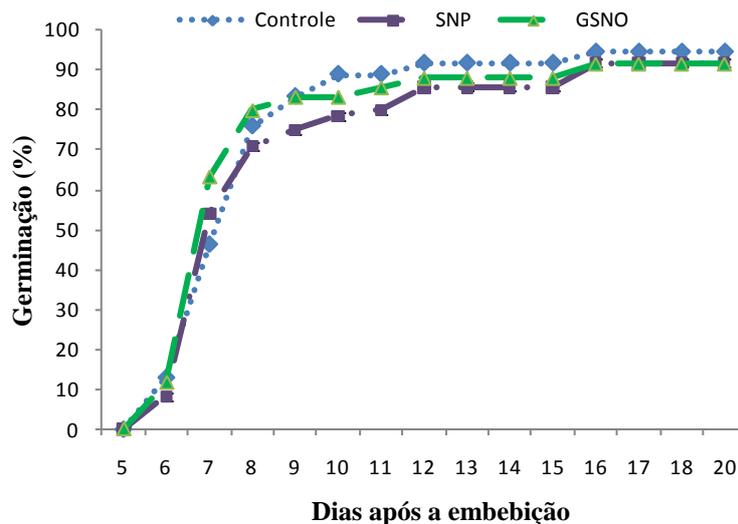


Figura 1. Taxa de germinação em sementes de *H. courbaril*, do 5º ao 20º dia após a embebição em água e solução 200 μ M de SNP e GSNO aplicadas três vezes. Os valores representam a média de três repetições.

Apesar dos doadores não afetarem a germinação, a análise do comprimento das raízes do lote 1 indica que houve um aumento significativo do comprimento no 15º dia em sementes tratadas com SNP e no 20º dia nas tratadas com os dois doadores (Fig. 2).

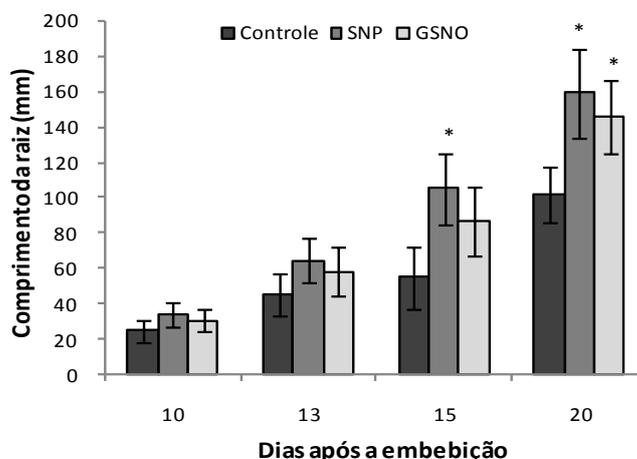


Figura 2. Comprimento de raízes de *H. courbaril* (mm), do 10º ao 20º dia após a embebição em água e soluções 200 μ M de SNP e GSNO aplicadas três vezes. Os valores representam o valor médio de cada raiz (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

O maior comprimento das raízes aos 20 dias (lote 1) após a embebição não pôde ser relacionado a um aumento no conteúdo de celulose (%), cujos valores foram similares nas raízes controle e tratadas com os doadores de NO (Fig. 3).

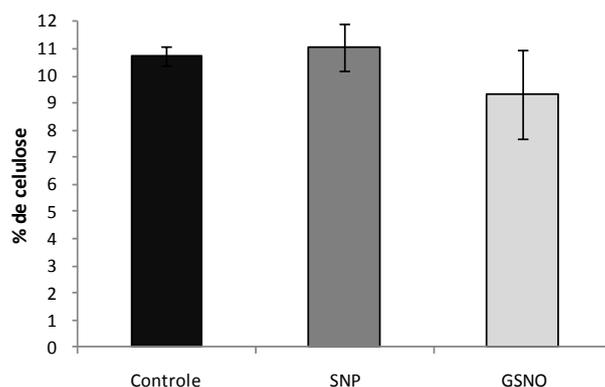
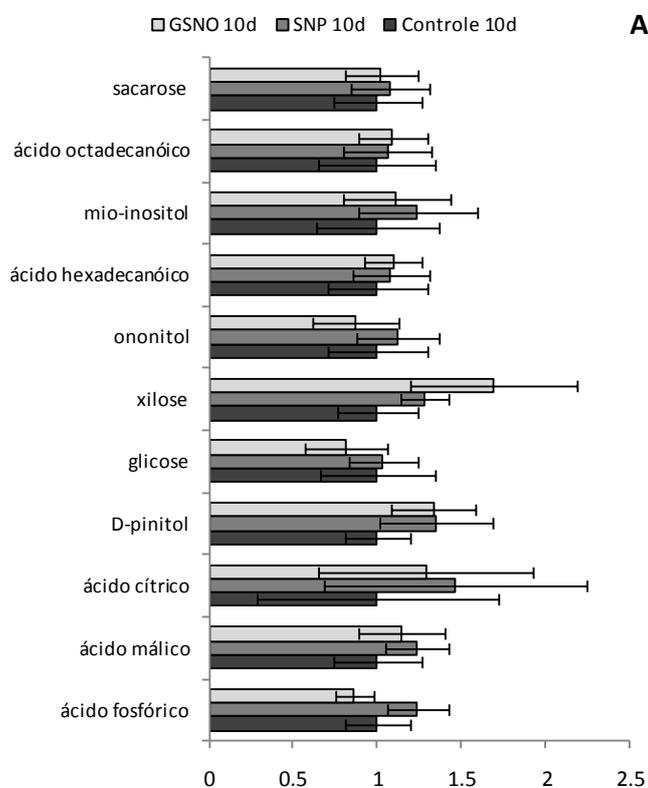


Figura 3. Porcentagem de celulose em raízes de *H. courbaril* com 20 dias após a embebição, tratadas com soluções 200 μ M de SNP e GSNO aplicadas três vezes (lote 1). O controle foi embebido em água. Os valores indicam a média de três repetições e as barras indicam o desvio padrão.

A análise do perfil metabólico por CG-EM permitiu a identificação de açúcares, polióis, ácidos orgânicos e ácidos graxos presentes em raízes com 10 (Fig. 4A), 15 (Fig. 4B) e 20 dias (Fig. 4C). No entanto, o perfil metabólico das sementes tratadas com os doadores de NO foi semelhante ao do controle, exceto pela menor quantidade de mio-inositol nos tratamentos com os doadores de NO observados no 20º dia após a embebição.



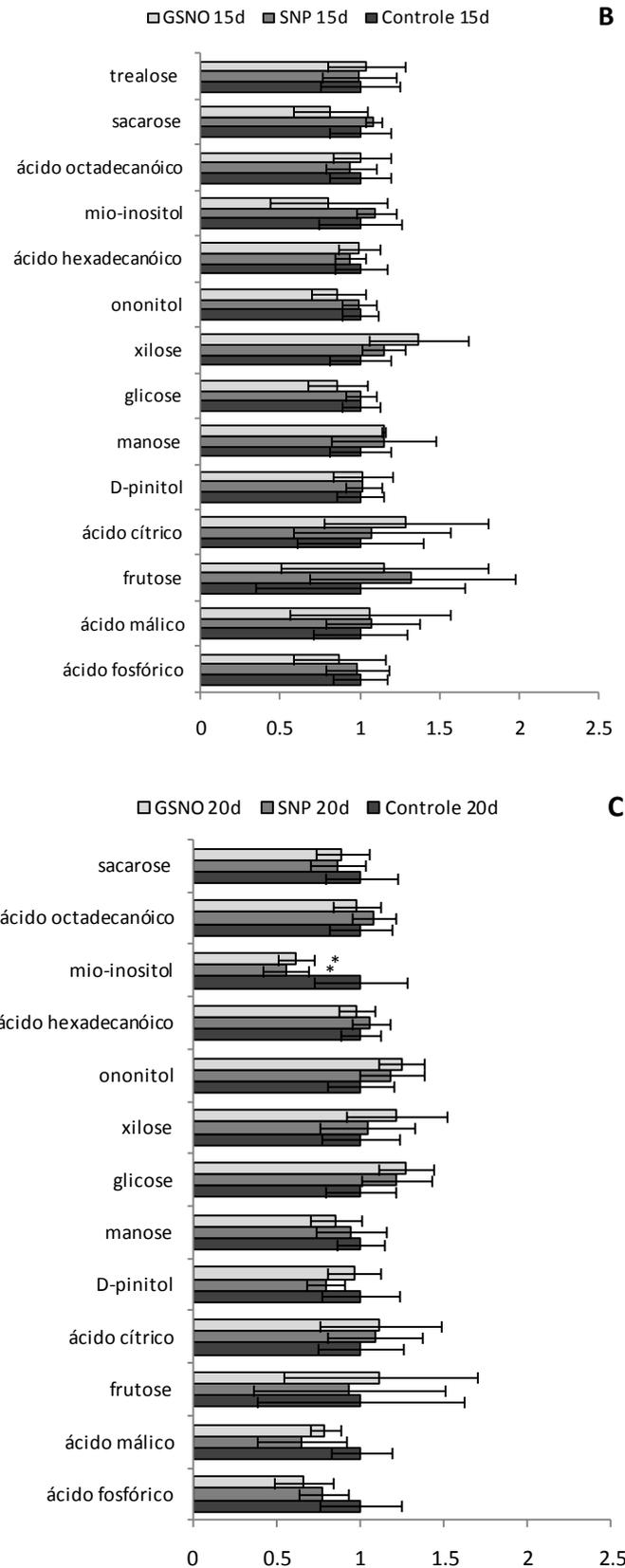


Figura 4. Proporção relativa de metabólitos presentes nas raízes de *H. courbaril* embebidas em água (controle) e solução 200 μ M de SNP e GSNO após 10 dias (A), 15 dias (B) e 20 dias (C) após a embebição de sementes do lote 1. Estes compostos foram detectados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Todos os valores foram normalizados a partir dos valores encontrados para o controle do mesmo dia. As barras

correspondem ao desvio padrão da média (n = 9). (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

5.2. Efeito do NO na germinação de sementes de lotes com diferentes tempos de armazenamento

Avaliando os efeitos dos doadores de NO na germinação do lote 1 (2008) (Fig. 5A), pode-se observar que a porcentagem máxima de germinação foi atingida entre o 11° e o 13° dia após a embebição. Porém, assim como nos experimentos anteriores, não houve diferença entre o controle e os tratamentos com SNP e GSNO. Entretanto, ao se analisar o lote com maior tempo de armazenamento (lote 2 - 2004) (Fig. 5B), pode-se observar que a porcentagem máxima de germinação foi atingida entre o 14° e 15° dia após a embebição e que o GSNO promoveu um aumento na porcentagem de germinação em relação ao controle, do 10° ao 12° dia após a embebição. Já o SNP promoveu um aumento na porcentagem de germinação apenas no 12° dia após a embebição.

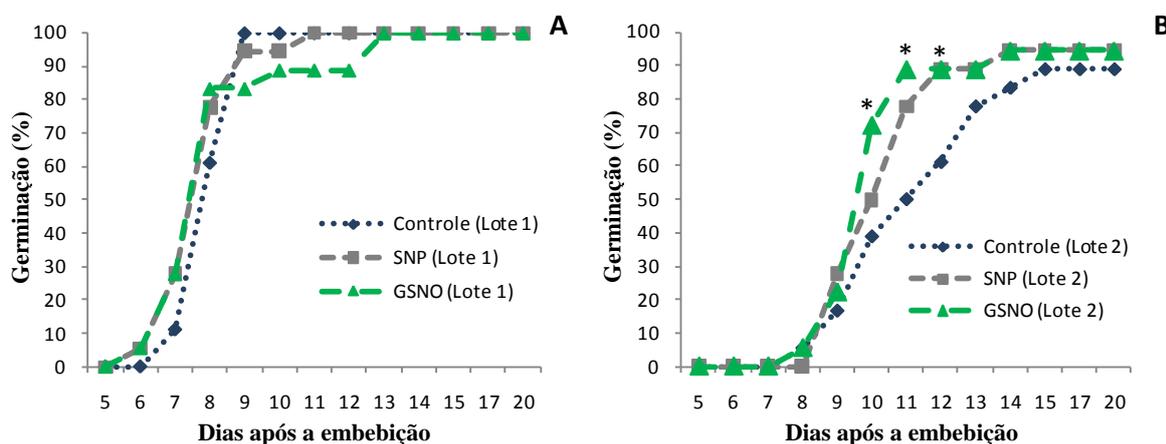


Figura 5. Taxa de germinação em sementes de *H. courbaril* lote dez/2008 (Lote 1)(A) e lote 2004 (Lote 2)(B). As sementes foram embebidas em água (controle), SNP (200 μ M) e GSNO (200 μ M). Os valores representam a média de três repetições. (* = os tratamentos diferem do controle pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

Ao comparar a germinação das sementes controle dos dois lotes, observa-se que as sementes do lote 1 (2008) iniciam a germinação por volta do 6° dia, atingindo 100% de germinação no 9° dia. Já as sementes do lote 2 (2004) atingem somente 80% de germinação após 15 dias, além de iniciarem a germinação somente por volta do 8° dia. O tratamento com SNP e GSNO acelera a germinação do lote com maior tempo de armazenamento, no entanto, ao final de 20 dias de experimento, as taxas de germinação foram similares entre as sementes controle e tratadas com doadores de NO.

A análise do efeito dos doadores de NO sobre o tempo médio de germinação do lote 1 (2008) (Fig. 6A), indicou que estes doadores não afetaram este parâmetro, uma vez que não

houve diferença entre o controle e o tratamento com os doadores de NO. Já a análise do lote 2, mostrou que o tempo médio para a germinação do tratamento com SNP foi menor do que o controle. O mesmo não foi observado no tratamento com GSNO. Ao comparar o tempo médio de germinação dos dois lotes, observa-se que as sementes do lote 1 possuem menor tempo médio de germinação (cerca de 8 dias), enquanto que o tempo médio do lote 2 foi de 10 a 11 dias.

Quanto ao índice de velocidade de germinação (IVG), verificou-se que não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos com doadores de NO nas sementes do lote 1 (Fig. 6B). Resultados semelhantes também foram observados para o lote 2. A comparação do IVG dos dois lotes, mostra que o lote 1 obteve valores superiores aos do lote 2.

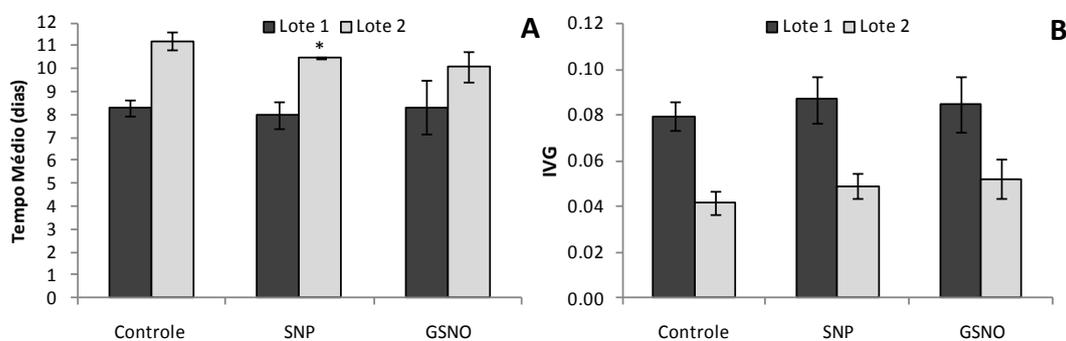


Figura 6. Tempo médio de germinação (em dias) (A) e índice de velocidade de germinação (IVG) (B) de sementes de *H. courbaril* do lote 1 (dez/2008) e lote 2 (2004). As sementes foram embebidas em água (controle), SNP (200 μ M) e GSNO (200 μ M). Os valores representam a média de três repetições. (* = o tratamento difere do controle do mesmo lote pelo teste de Tukey $P \leq 0.05$).

6. DISCUSSÃO

Os doadores de NO não tiveram efeito sobre a taxa de germinação de sementes de *Hymenaea courbaril* com pequeno tempo de armazenamento. Isto pode ser devido às características da espécie estudada, visto que as sementes de jatobá são grandes e possuem um período germinativo mais prolongado do que as espécies normalmente utilizadas neste tipo de trabalho, e ainda por apresentarem dormência por impermeabilidade do tegumento necessitam de um processo de escarificação, que pode ter mitigado os efeitos do NO no processo germinativo. Além disto, o fato do NO não afetar a germinação pode ser devido às propriedades do xiloglucano presente nos cotilédones, que assim como o galactomanano, atua no controle da embebição nas fases iniciais da germinação (Buckeridge *et al.* 2000b). Os xiloglucanos desempenham um papel no controle da embebição restringindo severamente a entrada de água e atuando na distribuição de água ao redor da superfície dos cotilédones por

promover rupturas em várias regiões para a entrada de água antes da protrusão da raiz (Santos 2002).

Apesar de não terem sido observadas diferenças na germinação, foi possível observar um aumento no comprimento da raiz no 15º e 20º dia após a embebição em sementes tratadas com SNP e GSNO, sugerindo que estes doadores de NO tenham um efeito promotor sobre o processo de alongamento radicular. Já foi demonstrado que o óxido nítrico está envolvido na regulação da morfologia da raiz (Pagnussat *et al.* 2002, Correa-Aragunde *et al.* 2004, Lombardo *et al.* 2006). Altas concentrações de SNP inibem o alongamento da raiz primária e do hipocótilo, sendo que baixas concentrações do doador de NO tem um efeito indutor de crescimento (Gouvêa *et al.* 1997, Kopyra & Gwózdź 2003, Bethke *et al.* 2004b, Correa-Aragunde *et al.* 2004, Hu *et al.* 2005).

Correa-Aragunde e colaboradores (2008) verificaram que o óxido nítrico afeta o conteúdo de celulose de forma dose-dependente em raízes de tomate cuja morfologia foi alterada, sendo que baixas concentrações de doador de NO aumentam o conteúdo de celulose, enquanto as altas concentrações têm um efeito inibitório. Os autores também observaram um aumento na incorporação de glicose marcada radioativamente (¹⁴C glicose) em celulose e a análise microscópica da estrutura da raiz sugeriu alterações na síntese da parede celular primária. Em células de tabaco, o teor de celulose diminuiu no tratamento com 500 µM de SNP (Pacoda *et al.*, 2004), sendo que em tomate os efeitos inibitórios são verificados com 200 µM de SNP (Correa-Aragunde *et al.* 2008). Efeitos inibitórios sobre o crescimento de raízes de jatobá não foram observados para a concentração de 200 µM de SNP e GSNO, diferentemente do observado em raízes de tomate.

Em sementes de jatobá, apesar dos tratamentos com os doadores de NO terem promovido um aumento do comprimento das raízes no 20º dia após a embebição, este aumento não foi acompanhado de um aumento no conteúdo de celulose, sugerindo que o efeito observado não esteja relacionado ao aumento da síntese de celulose. Análises futuras de expressão gênica permitirão estudar possíveis efeitos do NO como regulador da transcrição dos genes de síntese de celulose em jatobá.

A promoção do crescimento das raízes de milho pelo NO ocorre através da indução do alongamento das células de forma semelhante ao ácido indol acético (auxina) (Gouvêa *et al.* 1997). Em raízes de soja o NO, além de afetar o crescimento radicular, também é capaz de alterar o conteúdo de lignina e a atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (PAL) e peroxidase (POD) (Bohm *et al.* 2010). Estes trabalhos sugerem que as alterações observadas em jatobá podem estar relacionadas com modificações hormonais ou de outros compostos da parede celular.

Os tratamentos com doadores de NO promoveram uma diminuição na quantidade de mio-inositol em relação ao controle. Alguns autores observaram que durante a germinação ocorre a degradação da fitina por uma fosfatase ácida (fitase) e a liberação de fosfato, cátions e inositol que são utilizados para o crescimento das plântulas (Labouré *et al.* 1993, Barrientos *et al.* 1994, Hubel & Beck 1996). A oxidação do mio-inositol leva a produção de UDP-Glc, substrato da síntese de polissacarídeos de parede celular (Loewus & Loewus 1983). Além disso, também houve uma tendência de aumento na quantidade de xilose no tratamento com GSNO e de glicose nos tratamentos com os dois doadores, que são os monossacarídeos constituintes do xiloglucano. Desta forma, as alterações observadas sugerem que o NO promova alterações na síntese de outros polissacarídeos estruturais de parede celular.

A comparação de dois lotes de *H. courbaril* com diferentes tempos de armazenamento diferente, indicou que as sementes do lote mais antigo (lote 2) apresentavam menor vigor que as do lote 1, conforme observado pela menor porcentagem máxima de germinação, associada ao maior tempo médio de germinação e ao menor IVG. A análise do efeito do NO sobre a germinação destes lotes sugere que o seu efeito possa depender do vigor das sementes, sendo que o NO estimularia a germinação de sementes com menor vigor. O vigor de sementes é definido pela AOSA (Association of Official Seed Analysis 1983) como uma das propriedades das sementes que determina seu potencial para uma emergência rápida e uniforme com o desenvolvimento de plântulas normais em uma ampla faixa de condições ambientais. Para confirmar um possível papel do NO no aumento do vigor das sementes de jatobá, testes específicos como os de envelhecimento acelerado, teste de frio e de condutividade e teste de tetrazólio terão de ser utilizados para caracterização futura dos dois lotes. Neste trabalho foi feita uma caracterização mais simples para determinação do vigor com testes de velocidade do desenvolvimento, cujos resultados foram baseados na análise padrão de germinação. Outro aspecto importante que deve ser considerado é a qualidade genética das sementes. Os dois lotes utilizados neste trabalho provêm de matrizes de populações distintas, uma de Assis e outra de Pederneiras, tendo, portanto diferentes *pools* genéticos.

Técnicas que induzem melhoria na qualidade fisiológica das sementes são importantes para aumentar o potencial de desempenho das mesmas e, por conseguinte, a uniformidade das plantas. O uso de reguladores de crescimento pode favorecer o desempenho das plântulas, acelerando a velocidade de emergência de sementes de várias espécies. As GAs induzem a síntese de enzimas como a endo- β -mananase, envolvida no enfraquecimento do tegumento, ou as amilases, que atuam na hidrólise de reserva (Bewley & Black 1994). As GAs podem regular a expressão de genes envolvidos na manutenção da dormência ou promover a síntese

de hidrolases envolvidas na mobilização de reservas, com conseqüente estímulo do crescimento embrionário (Bewley 1997, Koornneef *et al.* 2002).

A utilização do óxido nítrico como uma ferramenta em tecnologia de sementes visando estimular a germinação de sementes com baixo vigor ainda não foi relatada na literatura. No entanto, para que seu emprego possa ser viabilizado comercialmente, a aplicação de NO gasoso em câmaras especiais deve ser testada como alternativa aos doadores de óxido nítrico, devido ao seu preço elevado e dificuldade de manipulação.

7. CONCLUSÕES

- Os doadores de NO promoveram um aumento no tamanho das radículas de *Hymenaea courbaril* aos 15 e 20 dias após a germinação, no entanto o maior crescimento radicular não está relacionado a um estímulo da síntese de celulose pelo NO.
- A diminuição no teor de mio-inositol e pequenas mudanças no teor de xilose e glucose sugerem alterações na síntese de outros polissacarídeos estruturais, como o xiloglucano;
- O efeito promotor do NO na germinação de sementes de jatobá foi visível em lotes de sementes com menor vigor, sugerindo a utilização do NO como uma ferramenta em tecnologia de sementes visando acelerar o processo de germinação e favorecer o desenvolvimento das plântulas.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A maioria dos estudos sobre compostos de reserva de sementes está relacionada a um grupo bastante restrito de espécies vegetais de importância agrônômica. Entre o grupo das gramíneas, destacam-se *Zea mays* (milho), *Triticum aestivum* (trigo), *Oryza sativa* (arroz) e *Hordeum vulgare* (cevada). Dentre as leguminosas, as espécies mais estudadas são *Phaseolus vulgaris* (feijão), *Pisum sativa* (ervilha) e *Glycine max* (soja). Este fato se deve, sobretudo, aos múltiplos usos destas espécies e seus derivados pelas populações humanas. Sementes de outras espécies, como *Lycopersicon esculentum* (tomate) e *Lactuca sativa* (alface) também têm sido extensivamente estudadas (Bewley 1997, Buckeridge *et al.* 2004a).

A importância do estudo de reservas das sementes reside, não somente em seu valor nutricional, mas também nas demais aplicações destas substâncias na indústria alimentícia. Como exemplo, pode-se citar a goma guar, polissacarídeo de reserva extraído do endosperma de *Cyamopsis tetragonolobus*, utilizado como espessante, geleificante, emulsificante e estabilizante (Ettinger 2002). Como fibra alimentar, promove uma diminuição da absorção do colesterol e dos carboidratos, auxiliando no controle da hipercolesterolemia e diabetes (Todd *et al.* 1990).

Em países de grande diversidade biológica como o Brasil, torna-se relevante conhecer aspectos da composição química e da fisiologia de sementes de espécies nativas das florestas tropicais, do Cerrado e de outros biomas. Tais informações são importantes para auxiliar, por exemplo, a conservação destas espécies e fornecer subsídios para a produção de mudas para recuperação de áreas degradadas (Buckeridge *et al.* 2004a). No entanto, ainda são escassos os estudos com plantas nativas. Apesar desta lacuna, algumas espécies nativas tem se tornado modelo para os estudos de germinação e desenvolvimento.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram escolhidas *Sesbania virgata* e *Hymenaea courbaril*, duas espécies de Fabaceae que possuem sementes com dormência tegumentar e acumulam altas proporções de polissacarídeos de reserva de parede celular, que são mobilizados após a germinação, fornecendo carbono e energia para o crescimento inicial da plântula (Buckeridge *et al.* 2000a). As sementes de *S. virgata* possuem altas proporções de galactomanano no endosperma, que é mobilizado por ação de hidrolases logo após a germinação (Buckeridge & Dietrich 1996, Tonini *et al.* 2006, 2007), enquanto as sementes de *H. courbaril* possuem como reserva majoritária o xiloglucano, presente nos cotilédones e mobilizado somente 40 a 70 dias após a embebição (Tiné *et al.* 2000). Além da composição

química e do período de mobilização das reservas, as sementes das duas espécies escolhidas diferem com relação ao tamanho, homogeneidade e duração do processo germinativo.

Apesar das diferenças entre as sementes, efeitos marcantes do NO no processo germinativo não puderam ser observados nas duas espécies. Com relação à *S. virgata*, a necessidade prévia de escarificação, o papel secundário do galactomanano no controle da embebição e a germinação extremamente rápida, são fatores que podem ter contribuído para minimizar possíveis efeitos do NO. Uma alternativa possível seria a utilização de sementes imaturas germinantes de *S. virgata*, que ainda não apresentassem dormência por impermeabilidade do tegumento. Desta forma, seria possível eliminar o efeito da escarificação, além de investigar outros efeitos do NO ainda não relatados, como seu papel no amadurecimento das sementes e até mesmo sobre a deposição de reservas ao final deste processo. No entanto, este tipo de trabalho requer uma caracterização prévia do amadurecimento dos frutos e sementes, ainda não realizada para esta espécie.

Apesar de não ter afetado significativamente a germinação de sementes de *S. virgata*, o NO induziu a degradação de reservas germinativas e pós-germinativas (rafinose, proteínas e galactomanano), e afetou o metabolismo das sementes como um todo, tendo em vista as variações nos teores de aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, observadas tanto no endosperma quanto na raiz. Desta forma, além dos efeitos conhecidos do fornecimento exógeno de ABA e etileno sobre a degradação de reservas (Tonini *et al.* 2006, 2010b), deve-se considerar o NO como um potencial regulador deste processo em *S. virgata*, e sua possível interação com estes reguladores hormonais. Embora o teor de ABA endógeno não tenha sido diretamente relacionado à modulação da degradação do galactomanano pelo NO, experimentos adicionais em que sementes tratadas com ABA sejam posteriormente tratadas com NO e o uso destes dois reguladores concomitantemente, permitirão confirmar os dados obtidos e verificar uma possível reversão do efeito inibitório do ABA pelo NO. Além disso, análises de localização do NO *in situ* com marcadores fluorescente são necessárias para determinar com precisão uma atuação tecido específica desta molécula ou uma modulação geral do metabolismo, independente da presença e/ou aumento do NO no tecido afetado, neste caso sobretudo endosperma e raízes.

Com relação à *H. courbaril*, a comparação de dois lotes de sementes com diferentes tempos de armazenamento sugeriu que o efeito do NO sobre a germinação possa depender do vigor das sementes, sendo que o NO estimularia a germinação de sementes com menor vigor. Alguns tratamentos como o condicionamento osmótico, condicionamento mátrico, pré-hidratação, umidificação, entre outros, têm apresentado resultados bastante promissores na redução do tempo necessário entre a semeadura e a emergência das plântulas, além de

melhorar a tolerância das sementes às condições adversas durante a germinação (Taylor & Harman 1990, Khan 1992). O NO é capaz de atuar na proteção das plantas contra diferentes estresses (hídrico, oxidativo, radiação UV-B, metais pesados, salinidade, estresse osmótico, estresse por calor) aumentando a tolerância das sementes a esses estresses durante a germinação (Kopyra & Gwozdz 2004). No entanto, a utilização do óxido nítrico como uma ferramenta em tecnologia de sementes, visando estimular a germinação de sementes com baixo vigor, ainda não foi relatada na literatura. Contudo, para que o NO possa ser utilizado para este fim, é necessário ampliar a análise para um número maior de lotes, preferencialmente procedentes das mesmas matrizes, cuja única variação seja o tempo de armazenamento e, conseqüentemente, o vigor das sementes. Além disso, o uso de NO gasoso, em câmaras de fumigação, permitiria o emprego deste modulador em maior escala, tendo em vista o custo elevado e os cuidados necessários para o preparo e uso de soluções doadoras de NO. Câmaras de fumigação também poderiam ser usadas para avaliar o efeito do NO sobre mobilização das reservas de xiloglucano, que são degradadas tardiamente no processo de germinação, e sobre a senescência dos cotilédones. A disponibilidade de seqüências de cDNAs que codificam enzimas de degradação de xiloglucano (XTH1, β -Gal) e síntese de celulose (CesA) isoladas previamente de jatobá (Brandão *et al.* 2009, Gaspar & Buckeridge, resultados não publicados), possibilitará avaliar o efeito do NO sobre a transcrição de genes envolvidos nos processos de mobilização do xiloglucano, expansão celular e síntese de celulose.

Este estudo é o primeiro a avaliar o papel do NO como modulador da germinação e desenvolvimento inicial de espécies arbóreas nativas, cujas sementes acumulam polissacarídeos de reserva parede celular.

VI. RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que se difunde rapidamente através das membranas e tem sido reportado como uma potente molécula de sinalização em plantas e animais. Sua aplicação exógena estimula a germinação e a quebra de dormência em sementes, mas os mecanismos pelos quais o óxido nítrico estimula estes processos ainda são desconhecidos. O NO aumenta a atividade de enzimas hidrolíticas que atuam na quebra do amido durante a germinação de algumas espécies e estimula o crescimento e a síntese de celulose em raízes. No entanto, até o presente momento, não existem informações acerca do papel deste modulador no processo de degradação de reservas e crescimento em sementes acumuladoras de polissacarídeos de reserva de parede celular. Nos biomas Cerrado e Mata Atlântica, as espécies apresentam estratégias de adaptação diversas e muitas delas envolvem os carboidratos de reserva. Diversas leguminosas arbóreas, entre elas *Sesbania virgata* (Faboideae) e *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae), apresentam altas proporções de carboidratos de parede celular como reserva em suas sementes, que são mobilizados após a germinação, fornecendo carbono e energia para o crescimento inicial da plântula. Desta forma, este trabalho objetivou compreender o papel do NO nos processos de germinação e desenvolvimento inicial em duas espécies de leguminosas, *S. virgata* e *H. courbaril*, cujas sementes acumulam galactomanano e xiloglucano como polissacarídeos de reserva de parede celular. Para avaliar o efeito do NO, as sementes de *S. virgata* e *H. courbaril* foram embebidas em água destilada e em soluções doadoras e sequestradoras de NO tendo, sido analisados parâmetros fisiológicos de germinação e parâmetros bioquímicos relacionados à degradação das reservas e crescimento. Os doadores de NO não tiveram influência sobre a taxa de germinação, porém o NO interferiu no metabolismo de reserva das sementes de *S. virgata*. Os níveis mais baixos de rafinose indicam que o NO acelerou a degradação desse oligossacarídeo presente no endosperma, resultando no aumento de galactose e sacarose direcionadas para o crescimento radicular. O aumento da atividade específica da enzima alfa-galactosidase, que inicia o processo de degradação do galactomanano, com conseqüente aumento do teor de galactose e manose, sugere que o NO estimulou a degradação desta reserva pós-germinativa. A diminuição no teor de proteínas, associada ao aumento de glutamina e asparagina, sugere o efeito estimulador do NO na degradação de proteínas de reserva. A ação do NO sobre as reservas da semente parece estar indiretamente relacionado ao teor de ABA. A análise do perfil metabólico do endosperma e das raízes mostrou que o metabolismo das sementes de *S. virgata* como um todo foi afetado pelo NO, tendo em vista as

variações nos teores de proteínas, aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos. O NO não promoveu estímulo da germinação de sementes de *H. courbaril*, mas induziu um aumento no tamanho das radículas. As maiores taxas de crescimento não puderam ser correlacionadas a modificações do perfil metabólico das raízes e a um aumento da síntese de celulose. Por outro lado, o NO estimulou a germinação de jatobá em lote de sementes com menor vigor, sugerindo sua utilização como ferramenta importante em tecnologia de sementes, visando acelerar o processo de germinação e favorecer o desenvolvimento das plântulas.

VII. ABSTRACT

Nitric oxide (NO), a membrane-permeable free radical, has been reported as a potent signaling molecule in animals and plants. When applied exogenously, this molecule stimulates seed germination and dormancy break, but the mechanisms involved in the stimulation of these processes by nitric oxide are still unknown. NO increases the activity of hydrolytic enzymes involved in starch breakdown during germination and stimulates growth and cellulose synthesis in roots. However, until now, information about the role of this molecule on reserve mobilization and growth in seeds accumulating cell wall polysaccharides are not available. In the Brazilian biomes, Cerrado and Mata Atlântica, species display different adaptation strategies that include accumulation of reserve carbohydrate in their seeds. Leguminous trees, like *Sesbania virgata* (Fabaceae) and *Hymenaea courbaril* (Caesalpinoideae), accumulate higher proportions of cell wall storage polysaccharides that are mobilized after germination and their products are used as carbon source and energy for plant growth. This work aimed to understand the role of nitric oxide on germination and initial growth of two leguminous species, *S. virgata* e *H. courbaril*, whose seeds accumulate the cell wall storage polysaccharides galactomanan and xyloglucan, respectively. To evaluate NO effects, seeds from *S. virgata* e *H. courbaril* were imbibed in water, NO donors and scavengers, and physiological characterization of germination and biochemical analysis of storage degradation and growth were done. NO donors did not show visible effects on germination, but NO effects were observed on *S. virgata* seed storage metabolism. Lower raffinose content indicates that NO treatment accelerates the mobilization of this endosperm oligosaccharide, resulting in accumulation of galactose and sucrose used for root growth. The increase in alfa-galactosidase activity, first enzyme to breakdown galactomanan, with a concomitant increase of galactose and mannose content, suggests a stimulation of post-germinative seed reserve degradation by NO. The decrease in protein content was correlated with an increase in the amino acids glutamine and asparagine, suggesting that NO stimulated the degradation of seed storage proteins. The positive effects of NO on seed reserve mobilization seem to be indirectly related to ABA content. Metabolic profile analysis from endosperm and roots indicates that the overall seed metabolism was affected by NO as shown by variation in contents of protein, amino acids, sugars and organic acids. NO did not promote *H. courbaril* seed germination, but induced root growth. The higher growth rates could not be correlated to changes in root metabolic profile neither to an increase on cellulose synthesis. On the other hand, NO stimulated *H. courbaril* germination in a seed lot with decreased vigor,

suggesting this molecule could be employed as an important tool in seed technology, improving germination and plant development.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ademark, P., Varga, A., Medve, J., Harjunpää, V. & Torbjörn, D.** 1998. Softwood hemicellulose-degrading enzymes from *Aspergillus niger*: purification and properties of a β -mannanase. *Journal of Biotechnology* 63: 199-210.
- Akaike, T., Yoshida, M., Miyamoto, Y., Sato, K., Kohno, M., Sasamoto, K., Miyazaki, K., Ueda, S. & Maeda, H.** 1993. Antagonistic action of imidazolineoxyl N-oxides against endothelium-derived relaxing factor NO through a radical reaction. *Biochemistry* 32: 827-832.
- Al-Sa'doni, H.H., Megson, I.L., Bisland, S.K., Butler, A.R. & Flitney, F.W.** 1997. Neocuproine, a selective Cu(I) chelator, and the relaxation of rat vascular smooth muscle by S-nitrosothiols. *British Journal of Pharmacology* 121: 1047-1050.
- Anulov, O.V., Smirnova, N.I., Mestechkina, N.M. & Shcherbukhin, V.D.** 1998. Content and composition of nonstarch water-soluble polysaccharides in seeds of some Fabaceae. *Russian Journal of Plant Physiology* 45: 802-804.
- Ashraf, M. & Harris, P.J.C.** 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-16.
- Association of Official Seed Analysis.** 1983. Seed vigour handbook. *In*: The handbook of seed testing. East Lansing, pp. 88.
- Ayre, B.G., Keller, F. & Turgeon, R.** 2003. Symplastic continuity between companion cells and the translocation stream: long-distance transport is controlled by retention and retrieval mechanisms in the phloem. *Plant Physiology* 131: 1518-1528.
- Barrientos, L., Scott, J.J. & Murthy, P.P.N.** 1994. Specificity of hydrolysis of phytic acid by alkaline phytase from lily pollen. *Plant Physiology* 106: 1489-1495.
- Batak, I., Devic, M., Giba, Z., Grubisic, D., Poff, K.L. & Konjevic, R.** 2002. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Science Research* 12: 253-259.
- Bates, J.N., Baker, M.T., Guerra, R. Jr. & Harrison, D.G.** 1991. Nitric oxide generation from nitroprusside by vascular tissue. *Biochemical Pharmacology* 42: S157-S165.
- Beligni, M.V. & Lamatina, L.** 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.
- Beligni, M.V., Fath, A., Bethke, P.C., Lamattina, L. & Jones, R.L.** 2002. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology* 129: 1642-1650.

- Bethke, P.C., Badger, M.R. & Jones, R.L.** 2004a. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 16: 332–341.
- Bethke, P.C., Gluber, F., Jacobsen, J.V. & Jones, R.L.** 2004b. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219: 847-855.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G.L. & Jones, R.L.** 2006a. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal Experimental Botany* 57: 517–526.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G.L., Reinohl, V. & Jones, R.L.** 2006b. Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite, and nitrate break Arabidopsis seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 223: 805–812.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1994. *Seeds: physiology of development and germination*. 2 ed. Plenum Press, New York. pp. 445.
- Bewley, J.D.** 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9: 1055–1066.
- Böhm, F.M.L.Z., Ferrarese, M.L.L., Zanardo, D.I.L, Magalhaes, J.R. & Ferrarese-Filho, O.** 2010. Nitric oxide affecting root growth, lignification and related enzymes in soybean seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 32: 1039-1046.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E. & Jensen, R.G.** 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099–1111.
- Bradford, M.M.** 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of rotein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brandão, A.D., Del Bem, L.E.V., Vincentz, M. & Buckeridge, M.S.** 2009. Expression pattern of four storage xyloglucan mobilization-related genes during seedling development of the rain forest tree *Hymenaea courbaril* L. *Journal of Experimental Botany* 60: 1191-1206.
- Brasil.** 1992. Regras para análises de sementes. Brasília, Ministério da Agricultura.
- Bright, J., Desikan, R., Hancock, J.T., Weir, I.S. & Neill, S.J.** 2006. ABA induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant Journal* 45: 113–122.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L.** 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD, USA. American Society of Plant Physiologists pp.1366.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C.** 1990. Galactomannan from Brazilian legume seeds. *Revista Brasileira de Botânica* 13: 109-112.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C.** 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosacharides and galactomannan in germinating seeds of *Sesbania marginata* Benth. (Leguminosae-Faboideae). *Plant Science* 117: 33-43.

- Buckeridge, M.S. & Reid, J.S.G.** 1996. Major cell wall polysaccharides in legume seeds: structure, catabolism and biological functions. *Ciência e Cultura* 48: 153-162.
- Buckeridge, M.S.** 2010. Seed cell wall storage polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. *Plant Physiology* 154: 1017–1023.
- Buckeridge, M.S., Aidar, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2004a. Acúmulo de reservas. *In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado.* Artmed, Porto Alegre. pp. 31-50.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R. & Dietrich, S.M.C.** 1995a. Storage carbohydrate mobilisation in seeds of *Dimorphandra mollis* Benth. (Leguminosae) following germination. *Revista brasileira de Botânica* 18: 171-175.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R., Rocha, D.C. & Dietrich, S.M.C.** 1995b. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. *Phytochemistry* 38: 871-875.
- Buckeridge, M.S., Rocha, D.C., Reid, J.S.G. & Dietrich, S.M.C.** 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifea langsdorfii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum* 84: 145-151.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M.** 2004b. Mobilização de reservas. *In: A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado.* Artmed, Porto Alegre. pp. 163-185.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Lima, D.U. & Santos, H.P.** 2000a. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 141-156.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Santos, H.P. & Lima, D.U.** 2000b. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes. Estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 137-162.
- Butt, Y.K., Lum, J.H. & Lo, S.C.,** 2003. Proteomic identification of plant proteins probed by mammalian nitric oxide synthase antibodies. *Planta* 216: 762–771.
- Cao, B. & Reith, M.E.A.** 2002. Nitric oxide scavenger carboxy-PTIO potentiates the inhibition of dopamine uptake by nitric oxide donors. *European Journal of Pharmacology* 448: 27–30.
- Caro, A. & Puntarulo, S.** 1999. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. *Free Radical Research* 31: 205–212.
- Carpita, N.C. & Gibeaut, D.M.** 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* 3: 1-30.

- Carrera, E., Holman, T., Medhurst, A., Dietrich, D., Footitt, S., Theodoulou, F.L. & Holdsworth, M.J.** 2008. Seed after-ripening is a discrete developmental pathway associated with specific gene networks in Arabidopsis. *The Plant Journal* 53: 214–224.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M. & Lamattina, L.** 2004. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. *Planta* 218: 900-905.
- Correa-Aragunde, N., Graziano, M., Chevalier, C. & Lamattina, L.** 2006. Nitric oxide modulates the expression of cell cycle regulatory genes during lateral root formation in tomato. *Journal of Experimental Botany* 57: 581–588.
- Correa-Aragunde, N., Lombardo, C. & Lamattina, L.** 2008. Nitric oxide: an active nitrogen molecule that modulates cellulose synthesis in tomato roots. *New Phytologist* 179: 386-396.
- Crawford, N.M.** 2006. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 471-478.
- Culotta, E. & Koshland, D.E.** 1992. NO news is good news. *Science* 258: 1862-1865.
- Davis, K.L., Martin, E., Turko, I.V. & Murad, F.** 2001. Novel effects of nitric oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41: 203-236.
- Dea, I.C.M. & Morrison, A.** 1975. Chemistry and interactions of seed galactomannans. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 31: 241-312.
- Dean, J.V. & Harper, J.E.** 1988. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiology* 88: 389–395.
- Debeaujon, I., Leon-Kloosterziel, K.M. & Koornneef, M.** 2000. Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiology* 122: 403–413.
- Delledonne, M.** 2005. NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 390-396.
- Delledonne, M., Xia, Y., Dixon, R.A. & Lamb, C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585–588.
- Delmer, D.P. & Haigler, C.H.** 2002. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. *Metabolic Engineering* 4: 22-28.
- Delmer, D.P.** 1999. Cellulose biosynthesis: exciting times for a difficult field of study. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 245-276.
- 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*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 99: 16314–16318.
- Dicks, A.P., Swift, H.R., Williams, D.L.H., Butler, A.R., Al-Sadoni, H.H. & Cox, B.G.** 1996. Identification of Cu²⁺ as the effective reagent in nitric oxide formation from S-nitrosothiols (RSNO). Journal of the Chemical Society 2: 481-487.
- Dutta, S., Bradford, K.J. & Nevins, D.J.** 1994. Cell-wall autohydrolysis in isolated endosperms of lettuce (*Lactuca sativa*). Plant Physiology 104: 623-628.
- Ederli, L., Morettini, R., Borgogni, A., Wasternack, C., Miersch, O., Reale, L., Ferranti, F., Tosti, N. & Pasqualini, S.** 2006. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. Plant Physiology 142: 595–608.
- Ederli, L., Reale, L., Madeo, L., Ferranti, F., Gehring, C., Fornaciari, M., Romano, B. & Pasqualini, S.** 2009. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. Plant Physiology and Biochemistry 47: 42–48.
- Englehardt, J.** 1995. Sources, industrial derivatives and commercial applications of cellulose. Carbohydrate Research 12: 5-14.
- Erol, Ç.S., İsmailoğlu, I., Cevahir, Ö.G., Ünal, M. & Yentür, S.** 2008. The effects of nitric oxide on some early germination parameters and mitotic activity in Lentil (*Lens Culunaris* Medik.). Journal of Applied Biological Sciences 2: 01-07.
- Estévez, A.G., Radj, R., Barbeito, I., Shin, J.T., Thompson, J. & Beckman, J.S.** 1995. Peroxynitrite induces apoptosis in PC12 cells and alters responses to neurotrophic factors. Journal of Neurochemistry 65: 1543-1550.
- Ettinger, S.** 2002. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: L.K. Mahan & S. Escott-Stump (eds.). Krause Alimentos, Nutrição & Dietoterapia. 10 ed. São Paulo: Roca, pp. 30-64.
- Favery, B., Ryan, E., Foreman, J., Linstead, P. Boudonck, K., Steer, M., Shaw, P. & Dolan, L.** 2001. KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in Arabidopsis. Genes & Development 15: 79-89.
- Feelisch, M.** 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology 358: 113–122.
- Feltre, R.** 1982. Química geral. 2.ed. Moderna. São Paulo, pp. 1-364.
- Ferrer, M.A. & Ros-Barceló, A.** 1999. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. Plant Cell Environment 22: 891-897.
- Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Dixon, K.W. & Trengove, R.D.** 2004. A compound from smoke that promotes seed germination. Science 305: 977–977.

- Floryszak-Wieczorek, J., Milczarek, G., Arasimowicz, M. & Ciszewski, A.** 2006. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224: 1363–1372.
- Ford, P.C., Wink, D.A., Stanbury, D.M.** 1993. Autoxidation kinetics of aqueous nitric oxide. *Federation of European Biochemical Societies* 326: 1–3.
- Forde, B.G.** 2002. Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual Reviews in Plant Biology* 53: 203–224.
- Fry, S.C.** 1998. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochemical Journal* 332: 507–515.
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V.** 1980. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288: 373–376.
- Furchgott, R.F.** 1995. Special topics: nitric oxide. *Annual Review of Physiology* 57: 659–682.
- Gabaldón, C., Gómez Ros, L.V., Pedreno, M.A., Ros Barceló, A.** 2005. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. *New Phytologist* 165: 121–130.
- Ganjewala, D., Nagaraja, C., Nayak, M.R. & Devi, S. A.** 2010. Effects of sodium nitroprusside on activity of acid and alkaline invertases and alkaline phosphatase in lemongrass (*Cymbopogon flexuosus Steud*) Wats. *International Journal of Plant Biology* 1: 9–12.
- Ganter, J.L.M.S., Zawadzki, S.F., Leiter, S.C.S., Sierakowski, M.R. & Reicher, F.** 1993. Structural studies on galactomannans from Brazilian seeds. *Journal of Carbohydrate Chemistry* 12: 753–767.
- Garcarrubio, A., Legaria, J.P. & Covarrubias, A.A.** 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature Arabidopsis seeds by limiting the availability of energy and nutrients. *Planta* 203: 182–187.
- Garg, U.C. & Hassid, A.** 1989. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *The Journal of Clinical Investigation* 83: 1774–1777.
- Giba, Z., Grubisic, D., Todorovic, S., Sajc, L., Stojakovic, D. & Konjevic, T.** 1998. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regulation* 26: 175–181.
- Gniazdowska, A., Dobrzyjska, U., Babajczyk, T. & Bogatek, R.** 2007. Breaking the apple embryo dormancy by nitric oxide involves the stimulation of ethylene production. *Planta* 225: 1051–1057.

- Goldstein, S. & Czapski, G.** 1996. Mechanism of the nitrosation of thiols and amines by oxygenated NO solutions: the nature of the nitrosating intermediates. *Journal of the American Chemical Society* 118: 3419–3425.
- Gouvêa, C.M.C.P., Souza, J.F., Magalhães, A.C.N. & Martins, I.S.** 1997. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. *Plant Growth Regulation* 21: 183–187.
- Groot, S.P.C. & Karssen, C.M.** 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* 171: 525–531.
- Grubišić, D. & Konjevic, R.** 1990. Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Planta* 181: 239–243.
- Grubišić, D., Giba, Z. & Konjevic, R.** 1992. The effect of organic nitrates in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tormentosa* seeds. *Photochemistry and Photobiology* 56: 629–632.
- Guimarães, R.M.** 1999. Fisiologia de sementes – produção e tecnologia de sementes. UFLA/FAEPE, Lavras, pp. 1-129.
- Guo, F., Okamoto, M. & Crawford, N.M.** 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100–103.
- Guzmán, J.M. & Hernandez, G.L.** 1982. Anatomía de la semilla y germinación de *Turbina corumbosa* (L.) Raf., Convolvulaceae. *Phyton* 42: 1-8.
- Halmer, P. & Bewley, J.D.** 1979. Mannanase production by the lettuce endosperm: control by the embryo. *Planta* 144: 333-340.
- Harrison, D.G. & Bates, J.N.** 1993. The nitrovasodilators: new ideas about old drugs. *Circulation* 87: 1461-1467.
- He, Y., Tang, R.H., Hao, Y., Stevens, R.D., Cook, C.W., Ahn, S.M., Jing, L., Yang, Z., Chen, L., Guo, F., Fiorani, F., Jackson, R.B., Crawford, N.M. & Pei, Z.M.** 2004. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 305: 1968-1971.
- Hendricks, S.B. & Taylorson, R.B.** 1974. Promotion of seed germination by nitrate, nitrite, hydroxylamine, and ammonium salts. *Plant Physiology* 54: 304-309.
- Hernández-Nistal, J., Labrador, E., Martín, I., Jiménez, T. & Dopico, B.** 2006. Transcriptional profiling of cell wall protein genes in chickpea embryonic axes during germination and growth. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 684-692.
- Hilhorst, H. & Karssen, C.M.** 1992. Seed dormancy and germination: the role of abscisic acid and gibberellins and the importance of hormone mutants. *Plant Growth Regulation* 11: 225–238.

- Hogg, N.** 2000. Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols. *Free Radical Biology and Medicine*. 28: 1478–1486.
- Holdsworth, M.J., Bentsink, L. & Soppe, W.J.J.** 2008. Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist* 179: 33–54.
- Horbowicz, M. & Obendorf, R.L.** 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols—review and survey. *Seed Science Research* 4: 385–405.
- Hu, X., Neill, S.J., Tang, Z. & Cai, G.J.** 2005. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiology* 137: 663–670.
- Hubel, F. & Beck, E.** 1996. Maize root phytase. Purification, characterization, and localization of enzyme activity and its putative substrate. *Plant Physiology* 112: 1429–1436.
- Hung, K.T. & Kao, C.H.** 2004. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 161: 43–52.
- Ignarro, L.J., Byrns, R.E., Buga, G.M. & Wood, K.S.** 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research* 61: 866–879.
- Jasid, S., Galatro, A., Villordo, J.J., Puntarulo, S. & Simontacchi, M.** 2009. Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science* 176: 662–668.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A. & Stevens, P.F.** 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates Publishers, Inc., Massachusetts, pp. 1–464.
- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2002. Respiration and gas exchange. *In*: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann (eds.). *Post harvest physiology and pathology of vegetables*. Marcel Dekker, New York, pp.7–29.
- Khan, A.A.** 1992. Preplant physiological seed conditioning. *Horticultural Reviews* 13: 131–181.
- Kissmann, K.G. & Groth, D.** 1999. *Plantas infestantes e nocivas*. Tomo II. BASF, São Paulo. pp. 947–950.
- Klepper, L.** 1990. Comparison between NO_x Evolution Mechanisms of Wild-Type and nr1 Mutant Soybean Leaves. *Plant Physiology* 93: 26–32.
- Kontos, F. & Spyropoulos, C.G.** 1995. Production and secretion of α -galactosidase and endo- β -mannanase activity by carob (*Ceratonia siliqua* L.) in the endosperm protoplast. *Journal of Experimental Botany* 46: 577–583.

- Koornneef, M., Bentsink, L. & Hilhorst, H.** 2002. Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 33-36.
- Kopyra, M. & Gwozdz, E.A.** 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 1011–1017.
- Kopyra, M. & Gwozdz, E.A.** 2004. The role of nitric oxide in plant growth regulation and responses to abiotic stresses. *Acta Physiologiae Plantarum* 26: 459-472.
- Koshland, D.E.** 1992. The molecule of the year. *Science* 258: 1861.
- Labouré, A.M., Gagnon, J. & Lescure, A.M.** 1993. Purification and characterization of phytase (*myo*-inositol-hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zea mays*) seedling during germination. *Biochemical Journal* 295: 413–419.
- Labouriau, L.G.** 1983. A germinação das sementes. OEA, Washington, pp. 1-175.
- Lamarca, E.M.** 2009. Taxas respiratórias e velocidade de deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. em função de variações hídricas e térmicas. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo.
- Lamarque, D. & Whittle, B.J.R.** 1995. Role of oxygen-derived metabolites in the rat gastric mucosal injury induced by nitric oxide donors. *European Journal of Pharmacology* 277: 187-194.
- Langenheim, J.H., Lee, Y.T. & Martin, S.S.** 1973. An evolutionary and ecological perspective of Amazonian hylaea species of Hymenaea (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Acta Amazonica* 3: 5-38.
- Lavin, M.** 1987. A cladistic analysis of the tribe Robinieae (Papilionoideae, Leguminosae). *In*: C.H. Stirton (ed.). *Advances in legume systematics. Parte 3.* Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 31-64.
- Lee, Y.T. & Langenheim, J.H.** 1975. Systematics of the genus *Hymanaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). *University of California Publications in Botany* 69: 1-109.
- Leung, D.W.M., Bewley, J.D. & Reid, J.S.G.** 1981. Mobilisation of the major stored reserves in the embryo of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L., Leguminosae), and correlated enzyme activities. *Planta* 153: 95-100.
- Leviatov, S., Shoseyov, O. & Wolf, S.** 1995. Involvement of endomannanase in the control of tomato seed germination under low temperature conditions. *Annals of Botany* 76: 1-6.
- Lisboa, C.G.S.** 2003. Endo- β -mananase de endosperma de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.: purificação, caracterização e importância na germinação e desenvolvimento da plântula. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

- Lisboa, C.G.S., Tonini, P.P., Tiné, M.A.S. & Buckeridge, M.S.** 2006. Endo- β -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae): purification, characterisation and its dual role in germination and early seedling growth. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 269–280.
- Liszky, A., Kenk, B. & Schopfer, P.** 2003. Evidence for the involvement of cell wall peroxidase in the generation of hydroxyl radicals mediating extension growth. *Planta* 217: 658–667.
- Liu, H.Y., Yu, X., Cui, D.Y., Sun, M.H., Sun, W.N., Tang, Z.C., Kwak, S.S. & Su, W.A.** 2007. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. *Cell Research* 17: 638–649.
- Liu, Y., Shi, L. Ye, N., Liu, R. Jia, W. & Zhang, J.** 2009. Nitric oxide-induced rapid decrease of abscisic acid concentration is required in breaking seed dormancy in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 183: 1030–1042.
- Loewus, F.A. & Loewus, M.W.** 1983. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* 34: 137-161.
- Lombardo, M.C., Graziano, M., Polacco, J.C. & Lamattina, L.** 2006. Nitric Oxide Functions as a Positive Regulator of Root Hair Development. *Plant Signaling & Behavior* 1: 28-33.
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 1 ed. Nova Odessa, São Paulo, pp. 1-384.
- Ludwig-Muller, J., Georgiev, M. & Bley, T.** 2008. Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. *Process Biochemistry* 43: 15-23.
- Maguire, J.D.** 1962. Speed of germinationaid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science* 2: 176-177.
- Malek, L. & Bewley, J.D.** 1991. Endo- β -mannanase activity and reserve mobilization in excised endosperms of fenugreek is affected by volume of incubation and abscisic acid. *Seed Science Research* 1: 45-49.
- Manzi, A.E. & Cerezo, A.S.** 1984. The galactomannan-like oligosaccharides from the endosperm of the seed of *Gleditsia traicanthos*. *Carbohydrate Research* 134: 115-131.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ, Piracicaba, PP. 1-495.
- Maurel, C., Verdoucq, L., Luu, D.T. & Santoni, V.** 2008. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59: 595-624.

- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A.** 1975. The germination of seeds. 2 ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 1-192.
- Mayer, B. & Hemmens, B.** 1997. Biosynthesis and action of nitric oxide synthases in mammalian cells. *Trends in Biochemical Sciences* 22: 477-481.
- McCleary, B.V.** 1983. Enzymic interactions in the hydrolysis of galactomannan in germinating guar: the role of exo- β -mannanase. *Phytochemistry* 22: 649-658.
- Megson, I.L.** 2000. Nitric oxide donor drugs. *Drugs of the Future* 25: 701-715.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhães, J.R. & Salgado, I.** 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *Federation of European Biochemical Societies* 579: 3814-3820.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., Pinto-Maglio, C.A.F., Oliveira, H.C., Seligman, K. & Salgado, I.** 2006. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Science* 171: 34-40.
- Moe, O.A. Miller, S.E. & Iwen, M.H.** 1947. Investigation of the reserve carbohydrate of leguminous seeds. *Journal of the American Chemical Society* 69: 2621-2825.
- Moncada, S.** 1997. Nitric oxide in the vasculature: physiology and pathophysiology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 811: 60-69.
- Moreau, M., Lindermayr, C., Durner, J. & Klessig, D.F.** 2010. NO synthesis and signaling in plants – where do we stand? *Physiologia Plantarum* 138: 372-383.
- Moro, M.A., Darley-USmar, V.M. & Lizasoain, I.** 1995. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. *British Journal of Pharmacology* 116: 1999-2004.
- Nakajima, M., Shimada, A., Takashi, Y., Kim, Y.C., Park, S.H., Ueguchi-Tanaka, M., Suzuki, H., Katoh, E., Iuchi, S. & Kobayashi, M.** 2006. Identification and characterization of *Arabidopsis* gibberellin receptors. *The Plant Journal* 46: 880-889.
- Neill, S.J., Barros, R., Bright, J., Desikan, R., Hancock, J., Harrison, J., Morris, P., Ribeiro, D. & Wilson, I.** 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany* 59: 165-176.
- Neill, S.J., Desikan, R. & Hancock, J.T.** 2003. Nitric oxide signaling in plants. *New Phytologist* 159: 11-35.
- Nomaguchi, M., Nonogaki, H. & Yukio, M.** 1995. Development of galactomannan-hydrolyzing in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior germination. *Physiologia Plantarum* 94: 105-109.

- Nonogaki, H. & Morohashi, Y.** 1996. An endo- β -mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radical emergence. *Plant Physiology* 110: 555-559.
- Otvos, K., Pasternak, T.P., Miskolczi, P., Domoki, M., Dorjgotov, D., Szucs, A., Bottka, S., Dudits, D. & Feher, A.** 2005. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of, cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. *The Plant Journal* 43: 849–860.
- Pacoda, D., Montefusco, A., Piro, G. & Dalessandro, G.** 2004. Reactive oxygen species and nitric oxide affect cell wall metabolism in tobacco BY-2 cells. *Journal of Plant Physiology* 161: 1143–1156.
- Pagnussat, G.C., Lanteri, M.L. & Lamattina, L.** 2003. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiology* 132: 1241-1248.
- Pagnussat, G.C., Simontacchi, M., Puntarulo, S. & Lamattina, L.** 2002. Nitric oxide is required for root organogenesis. *Plant Physiology* 129: 954–956.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G. & Monsada, S.** 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.
- Piña-Rodrigues, F.C.M., Figliolia, M.B. & Peixoto, M.C.** 2004. Testes de Qualidade. *In:* A.G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre, pp. 283-297.
- Popinigis, F.** 1985. *Fisiologia da semente*. 2 ed. Ministério da Agricultura – AGIPLAN, Brasília, pp. 97-103.
- Potomati, A. & Buckeridge, M.S.** 2002. Effect of abscisic acid on the mobilisation of galactomannan and embryo development of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 303-310.
- Prado, A.M., Porterfield, D.M. & Feijó, J.A.** 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714.
- Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. & Moncada, S.** 1987. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: Interactions between prostacyclin and nitric oxide. *British Journal Pharmacology* 92: 639-646.
- Reid, J.S.G. & Bewley, J.D.** 1979. A dual role for the endosperm and its galactomannan reserves in the germinative physiology of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) an endospermic legume seed. *Planta* 147: 145-150.

- Reid, J.S.G. & Edwards, M.** 1995. Galactomannans and other cell wall storage polysaccharides in seeds. *In*: A.M. Stephen (ed.). Food polysaccharides and their applications. Marcel Dekker, New York, pp. 155-186.
- Reid, J.S.G. & Meier, H.** 1972. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilization in germination seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trifolium incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta* 106: 44-60.
- Reid, J.S.G. & Meier, H.** 1973. Enzyme activities and galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidases and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* 112: 301-308.
- Reid, J.S.G.** 1971. Reserve carbohydrate metabolism in germinating seeds of *Trigonella foenum-graecum* L. *Planta* 100: 131-142.
- Reid, J.S.G.** 1985. Cell wall storage carbohydrates in seeds. Biochemistry of the seeds gums and hemicelluloses. *Advances in Botanical Research* 11: 125-155.
- Ribeiro, D.M., Desikan, R., Bright, J., Confraria, A., Harrison, J., Hancock, J.T., Barros, R.S., Neill, S.J. & Wilson, I.D.** 2009. Differential requirement for NO during ABA-induced stomatal closure in turgid and wilted leaves. *Plant, Cell and Environment* 32: 46-57.
- Roberts, E.H.** 1972. Storage environment and the control of viability. *In*: E.H. Roberts (ed.). Viability of Seeds. Chapman and Hall, London, pp 14-58.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A. et al.** 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Experimental Botany* 53: 103-110.
- Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L. & Fernie, A.R.** 2001. Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *Plant Cell* 13: 11-29.
- Salvemini, D, Currie, M.G. & Mollace, V.** 1996. Nitric oxide-mediated cyclooxygenase activation: a key event in the antiplatelet effects of nitrovasodilators. *The Journal of Clinical Investigation* 97: 2562-2568.
- Santos, H. P. & Buckeridge, M. S.** 2004. The role of the storage carbon of cotyledons in the establishment of seedlings of *Hymenaea courbaril* under different light conditions. *Annals of Botany* 94: 819-830.
- Santos, H.P.** 2002. Importância ecofisiológica da reserva de xiloglucano e o controle de sua mobilização em cotilédones de *Hymenaea courbaril* L. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

- Saquet, A.A. & Streif, J.** 2002. Respiração e produção de etileno de maçãs armazenadas em diversas concentrações de oxigênio. *Revista Brasileira de Agrociências* 8: 71-75.
- Sarath, G., Bethke, P.C., Jones, R., Baird, L.M., Hou, G. & Mitchell, R.B.** 2006. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-1 season grasses. *Planta* 223: 1154-1164.
- Sarath, G., Hou, G., Baird, L.M., Mitchell, R.B.** 2007. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C4-grasses. *Planta* 226: 697–708.
- Schmidt, H.H.H.W. & Walter, U.** 1994. NO at work. *Cell* 78: 919-925.
- Schopfer, P., Liskay, A., Bechtold, M., Frahry, G. & Wagner, A.** 2002. Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214: 821–828.
- Schopfer, P., Plachy, C. & Frahry, G.** 2001. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. *Plant Physiology* 125: 1591–1602.
- Schweikert, C., Liskay, A. & Schopfer, P.** 2000. Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. *Phytochemistry* 53: 565–570.
- Schweikert, C., Liskay, A. & Schopfer, P.** 2002. Polysaccharide degradation by Fenton reaction- or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry* 61: 31-35.
- Seiler, A.** 1977. Galaktomannanabbau in keimenden Johannisbrotsamen (*Ceratonia siliqua* L.). *Planta* 134: 209-221.
- Seligman, K., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Pinto-Maglio, C.A. & Salgado, I.** 2008. Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant and Cell Physiology* 49: 1112–1121.
- Simões, K.** 2008. Substâncias fitotóxicas e antifúngicas em sementes de leguminosas que acumulam galactomanano e xiloglucano como carboidratos de reserva de parede celular. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Simontacchi, M., Jasid, S. & Puntarulo, S.** 2004. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* 167: 839-847.
- Sokolovski, S., Hills, A., Gay, R., Garcia-Mata, C., Lamattina, L. & Blatt, M.R.** 2005. Protein phosphorylation is a prerequisite for intracellular Ca^{2+} release and ion channel control by nitric oxide and abscisic acid in guard cells. *The Plant Journal* 43: 520–529.
- Sprenger, N. & Keller, F.** 2000. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in ajuga reptans: the roles of two distinct galactinol synthases. *The Plant Journal* 21: 249–258.

- Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J. & Loscalzo, J.** 1992. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 89: 444–448.
- Stöhr, C. & Stremmlau, S.** 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* 57: 463–470.
- Taylor, A.G. & Harman, G.E.** 1990. Concepts and technologies of selected seed treatments. *Annual Review of Phytopathology* 28: 321-339.
- Tewari, R.K., Kim, S.Y., Hahn, E.J. & Paek, K.Y.** 2008. Involvement of nitric oxide-induced NADPH oxidase in adventitious root growth and antioxidant defense in *Panax ginseng*. *Plant Biotechnology Reports* 2: 113–122.
- Tiné, M.A.S., Cortelazzo, A.L. & Buckeridge, M.S.** 2000. Xyloglucan mobilisation in cotyledons of developing plantlets of *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae-Caesalpinioideae). *Plant Science* 154: 117-126.
- Todd, P.A., Benfield, P. & Goa, K.L.** 1990. Guar Gum. A review of its pharmacological properties, and use as a dietary adjunct in hypercholesterolaemia. *Drugs* 39: 917-928.
- Tonini, P.P.** 2004. Papel do tegumento e do ácido abscísico no processo de degradação do galactomanano em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Tonini, P.P.** 2008. Conexão entre os processos de degradação das reservas de proteínas e carboidratos e o efeito dos hormônios e açúcares em sementes de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.
- Tonini, P.P., Carrara, T.B. & Buckeridge, M.S.** 2010a. Storage proteins and cell wall mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees* 24: 675–684.
- Tonini, P.P., Lisboa, C.G.S., Freschi, L., Mercier, H., Mazzoni-Viveiros, S.C. & Buckeridge, M.S.** 2006. Effect of abscisic acid on galactomannan degradation and endo- β -mannanase activity in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae). *Trees* 20: 669-678.
- Tonini, P.P., Lisboa, C.G.S., Silva, C.O., Mazzoni-Viveiros, S.C. & Buckeridge, M.S.** 2007. Testa is involved in the control of storage mobilisation in seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers., a tropical legume tree from of the Atlantic Forest. *Trees* 21: 13-21.
- Tonini, P.P., Purgatto, E. & Buckeridge, M.S.** 2010b. Effects of abscisic acid, ethylene and sugars on the mobilization of storage proteins and carbohydrates in seeds of the tropical tree *Sesbania virgata* (Leguminosae). *Annals of Botany* 106: 607-616.

- Toorop, P.E., Bewley, J.D., Abrams, S.R. & Hilhorst, H.W.M.** 1999. Structure-activity studies with ABA analogs on germination and endo- β -mannanase activity in tomato and lettuce seeds. *Journal of Plant Physiology* 154: 679-685.
- Uemura, M. & Steponkus, P.L.** 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* 26: 1083-1096.
- Updegraff, D.M.** 1969. Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry* 32: 420-424.
- Van der Vliet, A., Eiserich, J.P., Kaur, H., Cross, C.E. & Halliwell, B.** 1996. Nitrotyrosine as biomarker for reactive nitrogen species. *Methods in Enzymology* 269: 175-184.
- Velikova, V., Pinelli, P., Pasqualini, S., Reale, L., Ferranti, F. & Loreto, F.** 2005. Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytologist* 166: 419-426.
- Vernon, D.M. & Bohnert, H.J.** 1992. A novel methyl transferase induced by osmotic stress in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The European Molecular Biology Organization Journal* 11: 2077-2085.
- Vernon, D.M. Ostrem, J.A. & Bohnert, H.J.** 1993. Stress perception and response in a facultative halophyte – the regulation of salinity-induced genes in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant, Cell and Environment* 16: 437-444.
- Villa, L.M., Salas, E., Darley-Usmar, V.M., Radomski, M.V. & Moncada, S.** 1994. Peroxynitrite induces both vasodilatation and impaired vascular relaxation in the isolated perfused rat heart. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 91: 12383-12387.
- Viveiros, S.C.M., Gaspar, M., Dietrich, S.M.C., Aidar, M.P. & Buckeridge, M.S.** 2007. Respostas das plantas aos fatores antrópicos: estudos com jatobá-de-mata. *In*: L.M. Barbosa & N.A. Santos-Jr (org.). *A botânica no Brasil: pesquisa, ensino e políticas públicas*. IMESP, São Paulo, v. 1, pp. 394-399.
- Wang, Y.S. & Yang, Z.M.** 2005. Nitric oxide reduces aluminium toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* 46: 1915-1923.
- Williams, D.L.H.** 1985. S-Nitrosation and the reactions of S-nitroso compounds. *Chemical Society Reviews* 14: 171-196.
- Wink, D.A. & Mitchell, J.B.** 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 25: 434-456.

- Yamamoto, T. & Bing, R.J.** 2000. Nitric oxide donors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225: 200-206.
- Yamasaki, H. & Sakihama, Y.** 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* 468: 89-92.
- Yamasaki, H.** 2000. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition *in vivo*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 355: 1477-1488.
- Yamasaki, H., Sakihama, Y. & Takahashi, S.** 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science* 4: 128–129.
- Yamasaki, H., Shimoji, H., Ohshiro, Y. & Sakihama, Y.** 2001. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. *Nitric Oxide* 5: 261-270.
- Zayat, A.G.** 1996. Termibiologia da germinação de sementes de *Sesbania virgata* (Fabaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P. & Durner, J.** 2004. Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America* 102: 15811-15816.
- Zhang, A.Y., Jiang, M.Y., Zhang, J.H., Tan, M.P. & Hu, X.L.** 2007. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in maize leaves. *New Phytologist* 175: 35–60.
- Zhang, H., Shen, W.B. & Xu, L.L.** 2003. Effects of nitric oxide on the germination of wheat seeds and its reactive oxygen species metabolisms under osmotic stress. *Acta Botanica Sinica* 45: 901–905.
- Zhang, H., Shen, W.B., Zhang, W. & Xu, L.L.** 2005. A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta* 220: 708-716.
- Zhao, M.G., Tian, Q.Y. & Zhang W.H.** 2007. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 206-217.
- Zumft, W.G.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61: 533-616.