

JULIANA KUROIWA ZERLIN

**Mecanismos de proteção de *Sesbania virgata*
(Cav.) Pers. contra espécies reativas de
nitrogênio e oxigênio**

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

SÃO PAULO

2015

JULIANA KUROIWA ZERLIN

**Mecanismos de proteção de *Sesbania virgata*
(Cav.) Pers. contra espécies reativas de
nitrogênio e oxigênio**

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

ORIENTADORA: DRA. MARÍLIA GASPAR MAÏS

CO-ORIENTADORA: DRA. KELLY SIMÕES

Ficha Catalográfica elaborada pelo NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA

Zerlin, Juliana Kuroiva

Z58m Mecanismos de proteção de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. contra espécies reativas de nitrogênio e oxigênio / Juliana Kuroiva Zerlin -- São Paulo, 2015.
109 p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2015
Bibliografia.

1. Semente. 2. Catequina. 3. Óxido nítrico. I. Título

CDU: 631.53.01

DEDICO

*Aos meus pais, Derival e Julieta,
ao meu irmão, Danilo, e ao meu namorado, Roberto.*

“...o pouco que aprendi não é quase nada em comparação com o que ignoro”.

(René Descartes)

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 e confiar em minhas escolhas.*
- ✓ *Ao meu namorado Roberto J. C. de Souza pelo apoio, companhia, carinho, incentivo, paciência e amor dedicados durante todos os momentos deste trabalho e especialmente pela compreensão das ausências e das “neuras”. Muito obrigado por estar ao meu lado!*
- ✓ *À minha amada afilhada Giovanna que sempre é uma inspiração em minha vida;*
- ✓ *À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica pela possibilidade de realizar este trabalho;*
- ✓ *À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado do Programa Nacional de Apoio e Desenvolvimento da Botânica (PNADB), projeto nº 454/2010;*
- ✓ *Ao Instituto de Botânica de São Paulo e ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica pela infraestrutura oferecida para realização deste trabalho.*
- ✓ *À minha orientadora Dra. Marília Gaspar pelo incentivo, auxílio, orientação e especialmente por proporcionar o meu desenvolvimento acadêmico e profissional em mais um ciclo. Gostaria de agradecer-lá por todos os ensinamentos durante estes anos e por ter possibilitado todos os acertos e também os erros que certamente me ensinaram muito! Muito obrigada por ser essa profissional tão dedicada que sempre me serviu de inspiração!*
- ✓ *À minha co-orientadora Dra. Kelly Simões pela orientação durante a realização deste trabalho e por todo auxílio dedicados quando solicitado;*
- ✓ *À Dra. Ione Salgado pela colaboração na utilização das câmaras de fumigação de NO, na utilização do laboratório e todo auxílio dedicados a este trabalho;*
- ✓ *Ao Dr. Leonardo M. Casano por todo auxílio e ensinamento em relação às enzimas antioxidantes;*
- ✓ *À Coordenadora do projeto Nº 454/2010 (PNADB-CAPES), Dra. Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro, pelo auxílio durante todo o período;*
- ✓ *Aos membros da minha banca de qualificação, Dra. Sílvia Ribeiro de Souza, Dra. Eny Iochevet Segal Floh e Dra. Cláudia Maria Furlan pelas sugestões de melhoria apresentadas;*
- ✓ *À Dra. Fernanda Ramos Gadelha pela utilização do espectrofluorímetro;*
- ✓ *As técnicas de laboratório da UNICAMP: Elzira e Jusciley pelo auxílio durante as fumigações e análises realizadas neste trabalho;*

- ✓ *Ao Núcleo de Pesquisa em Ecologia pela utilização do espectrofotômetro e em especial a pesquisadora Dra. Patrícia Bulbovas e a aluna Cristiane pelo auxílio nas análises das enzimas antioxidantes;*
- ✓ *À Universidade Federal do ABC pela possibilidade de utilizar os laboratórios de Evolução e Diversidade e de Neurociências para a realização das análises de microscopia de fluorescência;*
- ✓ *Aos alunos da UNICAMP: Simone Vitor, Lucas Frungillo e Camila pelo auxílio durante as análises realizadas neste trabalho;*
- ✓ *À Dra. Poliana Cardoso pelo auxílio nas análises de microscopia de fluorescência;*
- ✓ *Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica (IBt): Mary Monteiro, Ana Alice, Maria Aparecida e Pedro pelo auxílio durante este período;*
- ✓ *Aos pesquisadores do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica (IBt)*
- ✓ *Aos colegas e amigos da Fisiologia pelo auxílio durante este período: Priscila Candido Baroni, Mirela, Luana, Anderson, Rodrigo Cabral (Cabral), Rodrigo Sanches, Glaucia, Vanessa Fuentes (Fú), Marina Belloni Veronesi, Aline Coelho, Flávio Trevisan, Ludmila Raggi (Lud), Juliana Iura Mello, João Paulo Naldi (Joãozinho), Daiane Galvão, Cláudio Galvão, Daiane Mignoni (Daí), Evandro Vieira, Fernanda Zaninetti (Fê), Leila, Athos Poli, Cynthia, Michele Silva, Emanuela Joaquim (Manú), Kássia Fardin (Kassinha), Leyliane.*
- ✓ *As minhas queridas amigas “catirobas”: Emanuela O. Joaquim, Kássia M. Fardin, Marina B.Veronese, Vanessa Fuentes, Daiane S. Mignoni, Fernanda Zaninette e Gláucia Oliveira por todos os momentos que passamos juntas e por todos os momentos que eu sei que ainda virão. Muito obrigada pela amizade e carinho de vocês!*
- ✓ *A todas as minhas queridas amigas pelo apoio e amizade mesmo nos momentos de ausência.*
- ✓ *A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $^1\text{O}_2$ – Oxigênio singleto
- ABA** – Ácido abscísico
- ADH3** – Enzima álcool desidrogenase classe III
- APx** – Enzima ascorbato peroxidase
- ASC** – Ascorbato
- BSTFA** – Bis(Trimetilsilil)trifluoroacetamida
- CAT** – Enzima catalase
- CG-EM** – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
- CLAE** – Cromatografia líquida de alta eficiência
- cPTIO** – 2-[4-carboxifenil]-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
- DHAR** – Enzima dehidroascorbato redutase
- GPOX** – Enzima guaiacol peroxidase
- GPX** – Enzima glutaciona peroxidase
- GR** – Enzima glutaciona redutase
- GSH** – Glutaciona reduzida
- GSNO** – S-nitroglutaciona
- GSNOR** – Enzima S-nitroglutaciona redutase
- GSSG** – Glutaciona oxidada
- H_2O_2 – Peróxido de hidrogênio
- HO_2^{\bullet} – Radical peridroxil
- KCN** – Cianeto de potássio
- LPO** – Peroxidação lipídica
- MDA** – Malondialdeido
- MDAR** – Enzima monodehidroascorbato redutase
- N_2O_3 – Trióxido de dinitrogênio
- NAD(P)H** – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida
- NBT** – Nitro blue tetrazólio
- NO** – Óxido nítrico
- NO_2 – Dióxido de nitrogênio
- NO_2^- – Nitrito
- NO_3^- – Nitrato
- NOS** – Óxido nítrico sintase
- NOx** – Óxidos de nitrogênio

NR – Nitrato redutase
O₂ – Oxigênio
O₂^{•-} – Ânion superóxido
OH[•] – Radical hidroxila
ONOO⁻ – Peroxinitrito
PAL – Enzima fenilalanina amônia-liase
POD – Enzima peroxidase
Prx – Enzima peroxiredoxina
PTIO – 2-fenil-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido
RNS – Espécies reativas de nitrogênio
ROS – Espécies reativas de oxigênio
SNO – nitrosotióis
SNP – Nitroprussiato de sódio
SOD – Enzima superóxido dismutase
TBA – Ácido tiobarbitúrico
λ – Comprimento de onda

ÍNDICE

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
1.1. Importância dos compostos exsudados por sementes para o sucesso da germinação e estabelecimento de plântulas	5
1.2. Alelopatia.....	7
1.3. Catequina	8
1.4. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	11
1.5. Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS).....	14
1.6. Interação ROS x RNS.....	19
1.7. <i>Sesbania virgata</i>	21
2. OBJETIVOS.....	24
2.1. Objetivo Geral	24
2.2. Objetivos específicos	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1. Material biológico.....	25
3.2. Fumigação de sementes de <i>S. virgata</i> com o gás NO.....	25
3.3. Fumigação de catequina comercial e exsudatos com o gás NO	27
3.4. Obtenção dos tecidos e exsudatos das sementes	27
3.5. Quantificação de proteínas	27
3.6. Quantificação de açúcares totais e redutores	27
3.7. Quantificação de fenóis totais.....	28
3.8. Quantificação de flavonoides totais.....	28
3.9. Quantificação de taninos condensados	29
3.10. Quantificação de catequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	29
3.11. Análise dos exsudatos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas	29
3.12. Capacidade de sequestro de NO pelos exsudatos (quelação)	30
3.13. Bioensaios.....	30
3.13.1. Bioensaio de atividade fitotóxica com plântulas de <i>A. thaliana</i>	30
3.13.2. Bioensaio de atividade fitotóxica em sementes de <i>O. sativa</i>	31
3.13.3. Bioensaio de detecção de substâncias antifúngicas	31
3.14. Análise da emissão de NO com 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2).....	32

3.15. Atividade da S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR, EC 1.2.1.1)	32
3.16. Atividade de enzimas antioxidantes	33
3.16.1. Preparação do extrato enzimático	33
3.16.2. Determinação de proteínas.....	33
3.16.3. Atividade da ascorbato peroxidase (APx, EC 1.11.1.11)	33
3.16.4. Atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	33
3.16.5. Atividade da glutathione redutase (GR, EC 1.8.1.7)	34
3.16.6. Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	34
3.16.7. Atividade isoenzimática da superóxido dismutase	34
3.17. Quantificação de peróxido de hidrogênio e determinação da peroxidação lipídica	35
3.18. Localização <i>in situ</i> de NO	36
3.19. Análise estatística	36
4. RESULTADOS.....	37
4.1. Efeito do NO gasoso sobre a germinação e a morfologia de plântulas de <i>Sesbania virgata</i>	37
4.2. NO gasoso x exsudação de metabólitos primários e secundários em <i>S. virgata</i>	38
4.3. NO x catequina	46
4.3. Ligação NO-catequina e o potencial alelopático e antifúngico dos exsudatos de <i>S. virgata</i>	48
4.4. NO gasoso x defesas antioxidantes de <i>S. virgata</i>	54
5. DISCUSSÃO.....	69
5.1. Efeito do NO exógeno na composição e atividade biológica dos exsudatos de <i>Sesbania virgata</i>	69
5.2. Altas concentrações de NO induzem estresse nitrosativo e oxidativo em <i>S. virgata</i> ?.....	75
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

RESUMO

Exsudatos de sementes contêm diversas substâncias que auxiliam a germinação e estabelecimento da plântula no ambiente, podendo contribuir para o comportamento invasivo de algumas espécies. Sementes de *Sesbania virgata* exsudam grande quantidade de açúcares e proteínas durante a germinação, o que as torna muito atrativas ao ataque de microrganismos. Entretanto, essas sementes também exsudam substâncias com atividade antifúngica e fitotóxica, como a sesbanimida e a (+)-catequina, sendo estes os principais compostos exsudados durante a germinação. Diversos compostos são capazes de induzir a produção de metabólitos secundários em plantas, como o óxido nítrico (NO), espécie reativa de nitrogênio (RNS) produzida em resposta ao estresse abiótico, ataque de patógenos e eliciadores fúngicos. O NO sintetizado também atua na proteção contra o estresse oxidativo, por modulação das enzimas antioxidantes e/ou por sequestro direto de espécies reativas de oxigênio (ROS). Tendo em vista que o NO tem sido relatado como um indutor de resposta de defesa em plantas e que sua interação com ROS parece amplificar estas respostas, essa interação poderia modular o potencial antifúngico e alelopático de *S. virgata* e interferir no comportamento invasor desta espécie. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito do NO exógeno sobre a composição e a atividade biológica dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, assim como a relação entre as RNS e ROS durante a germinação e o desenvolvimento inicial destas sementes. Sementes embebidas em água destilada e fumigadas por 12 horas com ar comprimido puro (controle) ou 60 ppm de NO gasoso (tratado), tiveram seus exsudatos coletados durante a embebição e foram dissecadas em cotilédones e raízes. A fumigação com NO não afetou a taxa de germinação e o desenvolvimento das plântulas e não alterou a exsudação de proteínas, flavonoides totais, açúcares totais e redutores. Porém, este tratamento promoveu uma redução no conteúdo de fenóis totais, taninos condensados e catequina dos exsudatos. A análise de sequestro de NO *in vitro* indicou que a catequina comercial e os exsudatos apresentam potencial de sequestro de NO, o que sugere ligação do NO à catequina durante o processo de fumigação. No entanto, essa ligação não diminuiu o potencial biológico dos exsudatos, tendo em vista que os efeitos fitotóxicos sobre plântulas de *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* e a atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* foram mantidos. Os dados de localização *in situ* e de quantificação *in vitro* do NO indicaram teores similares dessa substância em raízes e cotilédones de sementes fumigadas com NO ou ar comprimido, assim como ausência de modulação da atividade da enzima S-nitrosoglutationa (GSNOR), sugerindo ausência de estresse nitrosativo. O tratamento com NO promoveu um aumento nos teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), com conseqüente estímulo da atividade

das enzimas antioxidantes ascorbato peroxidase (APx), catalase (CAT) e glutathione redutase (GR). Apesar da indução do sistema de defesa antioxidante, o aumento no conteúdo de malondialdeído (MDA) indica maior peroxidação lipídica nos tecidos tratados com NO. Em conjunto, os dados obtidos neste trabalho sugerem que a catequina, além de inibir o crescimento de espécies competidoras, é um mecanismo de proteção de *S. virgata* contra o estresse nitrosativo. Esse aleloquímico, em conjunto com a exsudação de outros compostos bioativos, a presença de altos teores de carboidratos de reserva e um eficiente sistema antioxidante, contribuem para o sucesso do estabelecimento de *S. virgata*, mesmo em ambientes considerados inóspitos para muitas espécies.

Palavras Chaves: Óxido nítrico, catequina, metabolismo antioxidante, alelopatia.

ABSTRACT

Seed exudates contain many compounds which can help germination and seedling establishment, and also contribute to the invasive behavior of some species. Seed exudates of *Sesbania virgata* contain large amount of sugars and proteins released during germination, which favor microbial attack. However, these seeds also exude phytotoxic and antifungal compounds like sesbanimida and (+)-catechin, the main compounds leached. Several compounds are able to induce the production of secondary metabolites in plants, as nitric oxide (NO), a reactive nitrogen species (RNS) produced in response to abiotic stress, pathogen attack and fungal elicitors. Moreover, the NO production can also play a protective role against oxidative stress due to modulation of antioxidant enzymes or direct sequestration of reactive oxygen species (ROS). NO has been reported as a defense response inducer in plants and its interaction with ROS seems to amplify these responses. Thereby, this interaction could modulate the antifungal and allelopathic potential of *S. virgata* seeds and interfere with the invasive behavior of this species. The aim of this work was to evaluate the effect of exogenous NO on the composition and biological activity of exudates from *S. virgata* seeds, as well as to investigate the correlation between RNS and ROS during germination and early development. Seeds imbibed in distilled water and fumigated for 12 hours with pure air (control) or 60 ppm of NO gas (treated) were dissected into root and cotyledons and their exudates were collected. NO fumigation did not affect seed germination rate and seedling development and also did not change the exudation of proteins, total flavonoids, total and reducing sugars. However, NO treatment promoted a reduction in the content of total phenols, tannins and catechin. *In vitro* NO scavenging activity indicates that commercial catechin and seed exudates exhibit scavenging potential and suggests a NO-catechin binding during the fumigation process. Nevertheless, this binding did not reduce the biological potential of exudates considering that phytotoxic effects on *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* seedlings, and the antifungal activity against *Cladosporium cladosporioides* were maintained. *In situ* localization and *in vitro* quantification of NO showed similar levels of this molecule in roots and cotyledons fumigated with NO or pure air, as well as the lack of the modulation of GSNOR enzyme activity, suggesting the absence of nitrosative stress. Furthermore, NO treatment increased H₂O₂ levels with consequent stimulation of the activity of antioxidant enzymes ascorbate peroxidase (APx), catalase (CAT) and glutathione reductase (GR). Despite the induction of antioxidant defense system the increase in malondialdehyde (MDA) content indicated the increase of lipid peroxidation in tissues. The data obtained in this work suggest that catechin besides inhibiting the growth of competing species also

functions as a protective mechanism against nitrosative stress in *S. virgata*. This allelochemical in association with the exudation of other bioactive compounds, the presence of high levels of storage carbohydrates and an efficient antioxidant system, contribute to the successful establishment of *S. virgata* even in environments considered adverse for many species.

Key words: Nitric oxide, catechin, antioxidant metabolism, allelopathy.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos compostos exsudados por sementes para o sucesso da germinação e estabelecimento de plântulas

A semente desenvolve-se a partir do óvulo fecundado e ocupa uma posição crítica no ciclo de vida das plantas, por ser o seu principal mecanismo de perpetuação (Bewley & Black 1994). O grande sucesso da semente na perpetuação e disseminação da espécie vegetal deve-se à sua capacidade de distribuir a germinação no tempo, através dos mecanismos de dormência e no espaço, por meio dos mecanismos de dispersão (Carvalho & Nakagawa 2000). Além disso, o sucesso no estabelecimento de um novo indivíduo (o tempo, o lugar, e o vigor das plântulas jovens) é determinado, em grande parte, pelas características bioquímicas e fisiológicas da semente (Bewley & Black 1994). Estas características possuem diversas variações, incluindo o grau de desenvolvimento do embrião, a resistência e permeabilidade do tegumento, tipo, quantidade e localização do material de reserva (Mayer & Poljakoff-Mayber 1982).

A germinação das sementes ortodoxas (tolerantes à dessecação) inicia-se com a embebição (entrada de água) e a reativação do metabolismo que possibilitam a ocorrência de diversos eventos bioquímicos e fisiológicos, que resultam na retomada do crescimento do embrião e na emergência da radícula através do tegumento (Van Staden *et al.* 1987, Bewley & Black 1994, Taiz & Zeiger 2004). Altas quantidades de compostos são armazenadas como fonte de reserva nas sementes, os quais são mobilizados para garantir a germinação e o fornecimento de energia para o crescimento das plântulas, até que estas se estabeleçam como organismos autotróficos (Bewley 1997, Pritchard *et al.* 2002). As reservas das sementes são principalmente constituídas por carboidratos, lipídeos e proteínas (Bewley & Black 1994).

Essas substâncias de reserva podem ser facilmente exsudadas pelas sementes, tornando a zona que circunda as sementes germinantes uma área atrativa para o desenvolvimento de microrganismos potencialmente fitopatogênicos. Em contrapartida, as sementes também produzem diversos metabólitos secundários, os quais podem ser armazenados no embrião ou no tegumento e liberados no início da embebição (Iqbal & Fry 2012). A presença e a exsudação de metabólitos secundários representam uma estratégia de defesa das sementes, uma vez que estes compostos podem afetar o crescimento de microrganismos e também de espécies vegetais competidoras. Essa estratégia de defesa pode ser considerada crucial para garantir o estabelecimento inicial de plântulas no ambiente (Nelson 2004).

Os compostos exsudados por sementes durante a embebição são pré-formados durante o desenvolvimento e maturação da semente (Nelson 2004). Esses compostos devem ser solúveis em água para que possam ser liberados durante o processo de embebição (Ndakidemi & Dakora 2003). A composição de metabólitos exsudados por sementes depende da espécie, do tamanho da semente, do investimento da planta-mãe e da presença de estresse e/ou outros fatores ambientais (Kamilova *et al.* 2006). Os exsudatos de sementes podem ser compostos por açúcares, ácidos orgânicos, aminoácidos, proteínas, peptídeos, flavonoides, alcaloides, terpenoides, esteroides, entre outros (Ndakidemi & Dakora 2003).

Os compostos exsudados, especialmente os metabólitos secundários, agem como sinais químicos nas diferentes interações da rizosfera, podendo atuar como sinalizadores da emergência da plântula para atração de parceiros benéficos no solo, como substâncias capazes de causar toxicidade e inibir o crescimento de outras plantas (fitotoxinas ou aleloquímicos) ou como metabólitos antimicrobianos sintetizados *de novo* em resposta ao ataque de microrganismos (fitoalexinas) (Shaw *et al.* 2006). Os flavonoides são encontrados na maioria das sementes e grãos (Shirley 1998), no entanto, o tipo, quantidade e localização desses compostos variam de acordo com a espécie e estágio de desenvolvimento dos tecidos e sua síntese pode ser modulada por sinais ambientais (Lepiniec *et al.* 2006). Os principais tipos de flavonoides encontrados em sementes são: flavonóis, antocianinas, isoflavonas e proantocianidinas (Lepiniec *et al.* 2006).

Os flavonoides luteolina e daidzeína são indutores de genes de nodulação (*nod*) em *Medicago sativa* e *Phaseolus vulgaris* na simbiose com *Sinorhizobium meliloti* e *Rhizobium leguminosarum* (Peters & Long 1988, Bolaños-Vásquez & Werner 1997). Em soja, as isoflavonas conjugadas (daidzina e genistina) são hidrolisadas e liberadas rapidamente após a embebição das sementes. No entanto, a quantidade de isoflavonas presente nos órgãos intactos da semente é muito superior à quantidade exsudada pela sementes, sugerindo que o processo de exsudação seja seletivo (Graham 1991). Ceballos *et al.* (1998) estudaram a exsudação de aleloquímicos durante a embebição e verificaram que as sementes de *Sesbania vesicaria* (espécie anual) liberam principalmente luteolina, enquanto as de *Sesbania drummondii* (espécie perene) liberam majoritariamente proantocianidinas, que já estavam presentes em alta concentração no tegumento e parênquima subhilar de sementes dormentes. A luteolina, além de seu papel antifúngico, atua como sinal químico estimulando a nodulação por *Rhizobium*, e segundo Ceballos e colaboradores (1998), sua rápida exsudação pode conferir uma grande vantagem adaptativa às espécies anuais, que precisam se estabelecer e crescer rapidamente, visando maximizar seu potencial reprodutivo durante seu ciclo de vida.

Em *Vicia faba*, flavonoides presentes no tegumento, nos cotilédones e na radícula das sementes são exsudados durante a embebição (Bekkara *et al.* 1998).

Em *Copaifera officinalis* e *Copaifera langsdorffii* as cumarinas armazenadas nas sementes também são exsudadas durante a embebição (Veiga Junior *et al.* 2007, Lima Neto *et al.* 2008). Em sementes de *Hymenaea courbaril* foram identificadas duas biscumarinas (ipomopsina e himenaína) que são exsudadas no início da embebição e possuem atividade fitotóxica e antifúngica (Simões 2008, Simões *et al.* 2009).

1.2. Alelopatia

Alelopatia pode ser definida como qualquer efeito direto ou indireto, prejudicial ou benéfico, de uma planta doadora sobre outra planta receptora através da produção de compostos químicos que são liberados para o ambiente (Rice 1984). Contudo, como essa definição é muito ampla, diversos autores consideram apenas os efeitos negativos como sendo efeitos alelopáticos, e desta forma, a alelopatia pode ser definida como um processo em que compostos químicos (fitotoxina ou aleloquímicos) liberados por uma planta podem influenciar o crescimento e o estabelecimento de plantas vizinhas (Teasdale *et al.* 2012).

Em sementes, os aleloquímicos com efeitos autotóxicos possuem importância ecológica, pois, em conjunto com as condições ambientais, podem inibir a germinação prematura quando a semente está ligada à planta mãe, prolongar a germinação, ou permitir a ocorrência da germinação apenas em condições ambientais favoráveis para o sucesso do estabelecimento das plântulas (Mayer & Shain 1974, Friedman & Waller 1983).

Estes compostos, que normalmente derivam do metabolismo secundário e pertencem às classes de compostos fenólicos e terpenoides, têm o potencial de suprimir o crescimento de plantas afetando a sobrevivência de espécies competidoras (Gniazdowska *et al.* 2015). Esses aleloquímicos podem ser liberados como exsudatos de sementes, exsudatos de raízes, como voláteis de folhas verdes ou como substâncias lixiviadas de tecidos vegetais vivos ou mortos (Weir *et al.* 2004).

Quando estes compostos suprimem o crescimento de plantas vizinhas, o fenômeno é considerado como estresse biótico, sendo denominado "estresse aleloquímico" (Cruz-Ortega *et al.* 2002). Similarmente ao encontrado em outros estresses, na alelopatia a mudança do papel regulador de espécies reativas de oxigênio (ROS) na sinalização celular para a sua toxicidade, está provavelmente relacionada a alterações resultantes do desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS (Weir *et al.* 2004, Gniazdowska & Bogatek 2005, Cruz-Ortega *et al.* 2007, Gniazdowska *et al.* 2015).

Compostos presentes no extrato aquoso de folhas de *Helianthus annuus* inibem a germinação de sementes e o crescimento de *Sinapis alba*, devido ao acúmulo de ROS que não são eficientemente eliminados pelo sistema antioxidante (Oracz *et al.* 2007). O estresse aleloquímico causado por *Sicyos deppei* em *Solanum lycopersicum* inibiu o crescimento de raízes e promoveu um desequilíbrio no balanço oxidativo pela geração de ROS e alteração nas enzimas antioxidantes das raízes (Lara-Nuñez *et al.* 2006, Cruz-Ortega *et al.* 2007). O aleloquímico sorgoleona (benzoquinona lipídica), presente em exsudatos de raízes de *Sorghum bicolor*, é capaz de inibir a fotossíntese devido à sua capacidade de interromper a transferência de elétrons entre as plastoquinonas A e B no fotossistema II (Kagan *et al.* 2003). O flavonoide quercetina causa diminuição da respiração em *Glycine max*, por inibir a oxidação de substratos e a absorção de fosfato e por atuar como desacoplador da fosforilação oxidativa (Takahashi *et al.* 1998). Sementes de *Lepidium sativum* exsudam o aleloquímico denominado lepidimoide, um dissacarídeo insaturado, que estimula o crescimento da parte aérea de *Amaranthus caudatus*, pela regulação da expansão celular com efeito similar ao da giberelina, além de inibir o crescimento de raízes (Hasegawa *et al.* 1992, Iqbal & Fry 2012).

1.3. Catequina

O flavonoide catequina pertencente à classe das flavanóis pode dar origem aos taninos condensados (ou proantocianidinas) através de reações de polimerização. A síntese da catequina ocorre inicialmente a partir de três moléculas de malonil-CoA, derivadas da via do acetato, e uma molécula de p -coumaril-CoA, que são condensadas e produzem a tetrahidroxichalcona (Croteau *et al.* 2000). Posteriormente, a naringenina produzida sofre 3-hidroxilação pela enzima flavonona-3-hydroxilase (F3H) dando origem ao dihidroflavonol. Este composto pode ser reduzido pela dihidroflavonol redutase (DFR) NADPH-dependente e dar origem a leucoantocianidina, que pode servir como precursora da síntese das catequinas e dos taninos condensados. A leucoantocianidina pode produzir a (+)-catequina através da enzima leucoantocianidina redutase (LAR) ou pode ser convertida em antocianidina pela enzima antocianidina sintase (ANS). Além disso, a antocianidina pode servir como substrato para a enzima antocianidina redutase (ANR) produzir a (-)-catequina (Pang *et al.* 2007) (Figura 1).

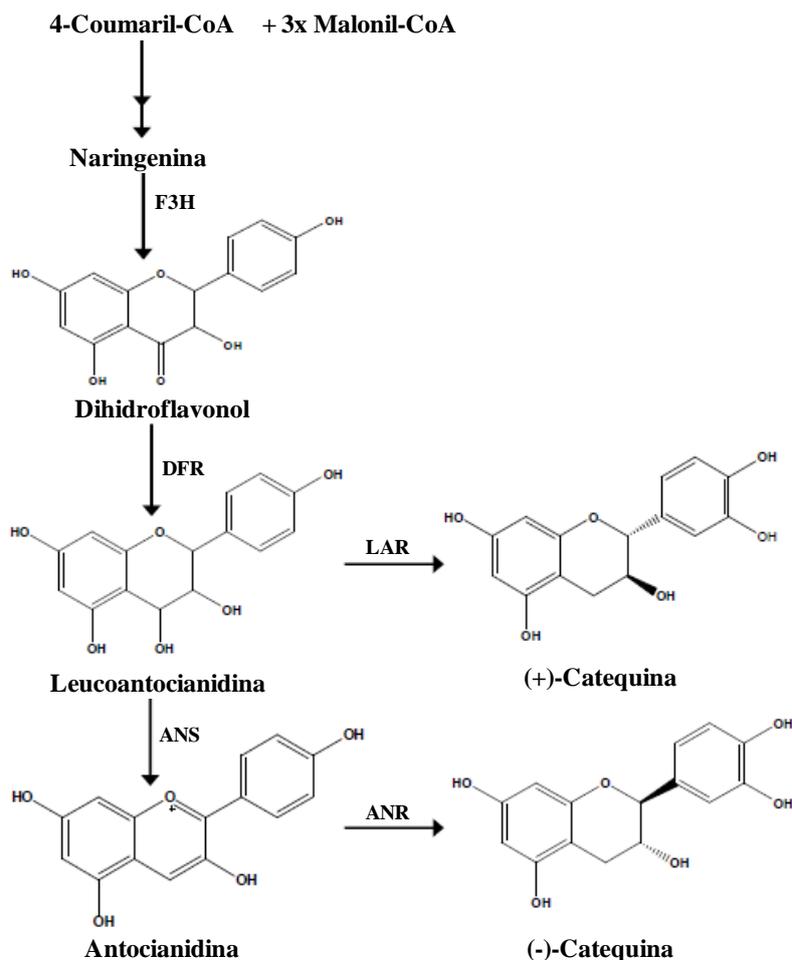


Figura 1. Via biossintética dos enantiômeros (+)-catequina e (-)-catequina (adaptado de Simões 2008). Enzimas: F3H= flavanona-3-hidroxilase; DFR= dihidroflavonol redutase; ANS= antocianidina sintase; LAR = leucoantocianidina redutase, ANR= antocianidina redutase.

A maioria das proantocianidinas encontradas em sementes são polímeros de epicatequina e catequina (Harborne & Williams 2000). A presença de proantocianidinas no vinho, no chá verde e no chá preto está relacionada com os efeitos benéficos destes produtos, devido à capacidade antioxidante normalmente atribuída as catequinas (Sarkar & Bhaduri 2001, Nakagawa & Yokozawa 2002). A capacidade da catequina em sequestrar radicais livres já foi relatada para o oxigênio singlete (Guo *et al.* 1999), ânion superóxido (Guo *et al.* 1999, Nakagawa & Yokozawa 2002), radical peroxila (Yilmaz & Toledo 2004), peroxinitrito (Paquay *et al.* 2000) e óxido nítrico (Paquay *et al.* 2000, Nakagawa & Yokozawa 2002). Esta capacidade de sequestro está relacionada à estrutura das catequinas, sendo que a presença de dihidroxilas ou trihidroxilas no anel B é responsável pela atividade sequestradora, enquanto catequinas ligadas a um grupo galoil na posição 3 possuem uma maior atividade sequestradora (Guo *et al.* 1999, Nakagawa & Yokozawa 2002) (Figura 2).

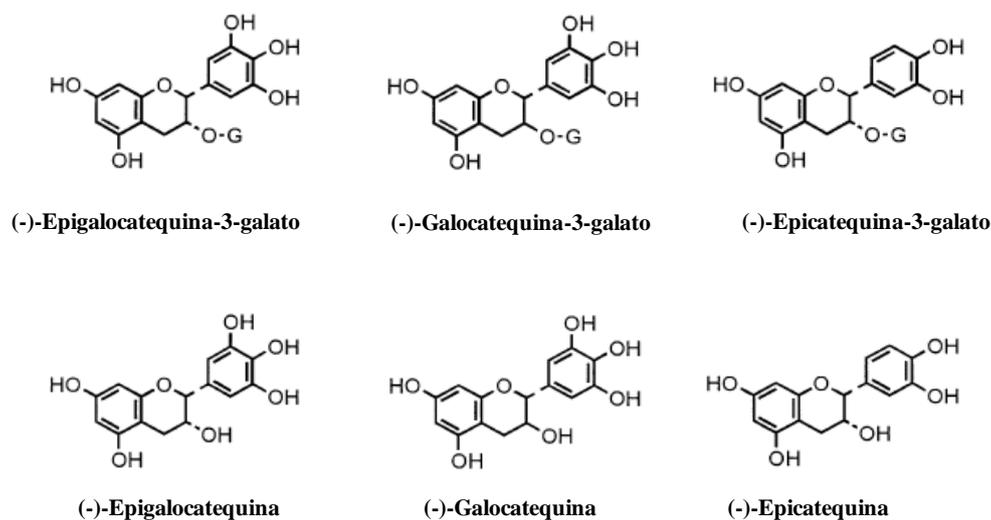


Figura 2. Estrutura química de algumas catequinas. Fonte: Nakagawa & Yokozawa (2002).

A (+)-catequina e a (-)-catequina possuem atividade antibacteriana significativa contra bactérias gram-negativas patogênicas de plantas e este efeito é devido a sua ação bacteriostática (Pollock *et al.* 2011). Estes autores também verificaram que a exsudação de catequina por *Centaurea stoebe* pode ter efeitos diferenciais sobre as populações bacterianas dependendo do local de origem dessas bactérias (solo nativo, invadido e não invadido), e estes efeitos desempenham um papel importante no sucesso invasivo desta espécie. A (+)-catequina também apresenta atividade inibitória do crescimento de fungos colonizadores de raízes como *Trichoderma reesi*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp, ampliando a importância ecológica desse composto para a defesa da planta (Veluri *et al.* 2004). Este composto não atua apenas suprimindo o crescimento de microorganismos, mas também pode servir como fonte de carbono para as bactérias benéficas presentes na rizosfera, tendo em vista que as mesmas podem transformar (-)-catequina em glicerol, que pode ser utilizado como fonte de carbono através do transporte passivo (Wang *et al.* 2013).

A catequina está presente em diversas plantas na forma de dois enantiômeros, a (-) e a (+)-catequina, e apresenta forte atividade fitotóxica (Buta & Lusby 1986, Bais *et al.* 2002, 2003, Iqbal *et al.* 2003). A presença da catequina tem sido relatada em raízes, folhas e sementes de diferentes espécies (Ceballos *et al.* 1998, Bais *et al.* 2002, Wang *et al.* 2003, Simões *et al.* 2008). O nível de fitotoxicidade da catequina varia em função da espécie analisada e das condições experimentais (Inderjit *et al.* 2008). Bais *et al.* (2003) relataram que os efeitos fitotóxicos dos enantiômeros (+) e (-)-catequina exsudados por raízes de *Centaurea maculosa* sobre o crescimento de raízes de *Arabidopsis thaliana* devem-se à rápida produção de ROS, seguida por aumento nos níveis de cálcio e diminuição do pH citoplasmático, levando à condensação do citoplasma e morte celular. Grande controvérsia foi gerada sobre os

dados de Bais *et al.* (2003), que mostram a indução de ROS em raízes de *A. thaliana*. Chobot *et al.* (2009) relatam que esse aumento no acúmulo de ROS pode estar relacionado a um artefato da técnica utilizada, com o emprego do corante fluorescente diclorofluoresceína (DCF), que superestimou os teores de ROS. Duke *et al.* (2009) sugerem que o potencial antioxidante da (+)-catequina e da (-)-catequina seria incompatível com uma eventual atividade pro-oxidante, embora estas duas funções não sejam incompatíveis, conforme recentemente revisado por Gniazdowska e colaboradores (2015). Bais e Kaushik (2010) reconfirmaram as observações preliminares de que a fitotoxicidade provocada (\pm)-catequina é mediada por ROS em *A. thaliana* e sugerem que os aleloquímicos possam ser percebidos diferentemente em função da espécie alvo e da organização das espécies em comunidades mistas ou monoculturas. Algumas espécies, como *Lupinus sericeus* e *Gaillardia grandiflora*, são resistentes ao aleloquímico (+)-catequina liberado pelas raízes de *Centaurea maculosa*, devido à liberação de grandes quantidades de oxalato, que bloqueia a produção de ROS e reduz os danos causados pelo estresse oxidativo em resposta à catequina (Weir *et al.* 2006). Na cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e na microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* os efeitos alelopáticos da (+)-catequina foram atribuídos à indução da formação de ROS que gera o estresse oxidativo para as espécies alvo (Wang *et al.* 2011).

1.4. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente oxidantes e compreendem: o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio simpleto (1O_2), radical peridroxil (HO_2^{\bullet}) e radical hidroxila (OH^{\bullet}) (Halliwell & Gutteridge 2007, Gill & Tuteja 2010). Estas moléculas são produzidas continuamente como subprodutos de diversas vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (Del Río *et al.* 2006, Navrot *et al.* 2007). As ROS são altamente reativas e tóxicas podendo afetar muitas funções celulares causando a oxidação de proteínas, peroxidação lipídica, danos às moléculas de DNA e a morte celular (Foyer & Noctor 2005, Gill & Tuteja 2010).

As células vegetais possuem mecanismos antioxidantes não-enzimáticos e enzimáticos de detoxificação de ROS. Os antioxidantes não-enzimáticos são representados pelo ascorbato (ASC), glutathiona reduzida (GSH), α -tocoferol, carotenoides e flavonoides, e os enzimáticos pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona peroxidase (GPX), monodehidroascorbato redutase (MDAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona redutase (GR), entre outras enzimas (Mittler *et al.* 2004, Gill & Tuteja 2010) (Figura 3).

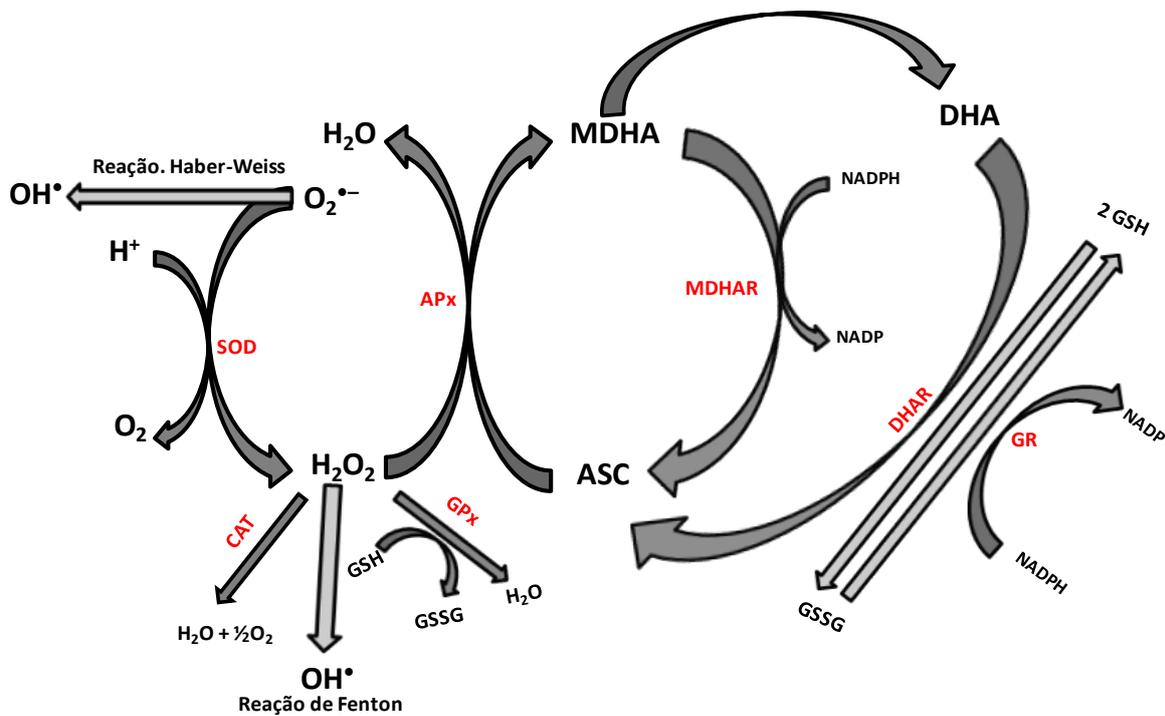


Figura 3. ROS e mecanismos de defesa antioxidantes do ciclo ascorbato-glutationa. Adaptado de Gill & Tuteja (2010).

O processo de detoxificação de ROS é iniciado pela enzima antioxidante superóxido dismutase (SOD), considerada a primeira linha de defesa em nível celular, que realiza a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ produzindo O_2 e H_2O_2 , que é menos reativo. O H_2O_2 é moderadamente reativo e tem meia-vida relativamente longa (1 ms), enquanto outras ROS como $O_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} e 1O_2 possuem meia-vida curta (2-4 μ S) (Bhattacharjee 2005). Três famílias de SOD, nomeadas de cobre-zinco (Cu/ZnSOD), manganês (MnSOD) e ferro (FeSOD) são encontradas em tecidos de plantas, as quais têm diferentes propriedades moleculares, incluindo sensibilidade diferencial a inibidores (Bowler *et al.* 1992). Estes três tipos de isoenzimas podem ser identificados por suas sensibilidades diferenciais ao KCN e H_2O_2 , onde a Cu/ZnSOD é sensível a ambos, FeSOD é sensível apenas ao H_2O_2 , e MnSOD é resistente a ambos os inibidores. Enquanto duas famílias de Cu/ZnSODs são encontradas no citosol e nos cloroplastos de plantas (Kanematsu & Asada 1990, Bowler *et al.* 1992), a atividade Cu/ZnSOD também tem sido detectada no apoplasto extracelular a partir de diferentes tecidos de plantas (Karpinska *et al.* 2001) e nos peroxissomos e glioxissomos (Pastori & Del Río 1997).

A detoxificação do H_2O_2 em plantas é essencial para proteção e sinalização da célula (Apel & Hirt 2004). As plantas possuem pelo menos cinco enzimas diferentes capazes de remover o H_2O_2 : APX, CAT, GPX, peroxiredoxinas (Prx) e peroxidases tipo III (POD)

(Mittler & Poulos 2005). A ação destas enzimas, juntamente com os antioxidantes ASC e GSH, propicia um eficiente mecanismo de detoxificação de H_2O_2 , conhecido como ciclo ascorbato-glutationa ou Foyer-Halliwell-Asada (Noctor & Foyer 1998).

O ASC em sua forma oxidada, a monodehidroascorbato (MDHA), perde sua função antioxidante, mas pode ser regenerado por dois mecanismos: através da redução enzimática pela monodehidroascorbato redutase (MDHAR) ou pode ser dismutado espontaneamente à deidroascorbato (DHA), que posteriormente é reduzido pela deidroascorbato redutase (DHAR) (Gill & Tuteja 2010). A glutatona reduzida (GSH) desempenha diversas funções importantes, contribuindo para a redução do DHA e eliminação de radicais livres diretamente através da doação de seu átomo de hidrogênio, resultando na formação de glutatona oxidada (GSSG) e atuando como um co-substrato para a redução de H_2O_2 pela glutatona peroxidase (GSH-Px). A GR regenera a GSSG em GSH, utilizando nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e, desta forma, desempenha um papel essencial no sistema de defesa contra ROS por possibilitar a manutenção do ciclo metabólico da GSH (Smirnoff 1996, Gill & Tuteja 2010).

A ação coordenada das enzimas responsáveis pela remoção de H_2O_2 e $O_2^{\bullet-}$ é extremamente importante para prevenir a formação de OH^{\bullet} , o qual reage rapidamente com ácidos graxos insaturados das membranas tornando-os espécies radicalares (Halliwell & Gutteridge 2007, Gill & Tuteja 2010). A peroxidação lipídica ocorre devido à reação destes radicais lipídicos produzidos com moléculas próximas e assim sucessivamente, criando um evento em cadeia que termina apenas quando os radicais lipídicos geram dímeros estáveis (Gill & Tuteja 2010). Esse processo provoca danos nas membranas celulares, que podem alterar sua permeabilidade e causar o extravasamento de líquido citoplasmático. Durante a peroxidação lipídica, os subprodutos são formados a partir de precursores poliinsaturados, que incluem pequenos fragmentos de hidrocarbonetos como alcanos, cetonas, malondialdeído (MDA), os quais podem ser quantificados como indicadores da peroxidação lipídica (Morrow 2003, Gill & Tuteja 2010). O óxido nítrico, assim como o ASC, atua em sinergia com o α -tocoferol inibindo a peroxidação lipídica, e apresenta maior capacidade antioxidante que o par α -tocoferol/ASC (Rubbo *et al.* 2000).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua eliminação pelos mecanismos de proteção antioxidantes, causando danos celulares. Este equilíbrio pode ser perturbado por vários estresses bióticos e abióticos, tais como salinidade, radiação UV, seca, metais pesados, temperaturas extremas, deficiência de nutrientes, poluentes do ar, herbicidas e ataques de patógenos (Gill & Tuteja 2010).

A germinação está associada ao aumento acentuado da atividade respiratória e maior produção de ROS, que é desencadeada com a reativação do metabolismo durante o processo de embebição das sementes (Bailly 2004). A produção de ROS também ocorre por ação da NADPH oxidase ou de peroxidases, como parte de um “burst” oxidativo durante a reidratação (Colville & Kranner 2010). A ativação do sistema antioxidante de defesa ocorre imediatamente após a reidratação das sementes (De Gara *et al.* 1997, Tommasi *et al.* 2001, Müller *et al.* 2010), visando manter o equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS para possibilitar a quebra da dormência e germinação de sementes (Oracz *et al.* 2009). O conceito de “janela oxidativa” proposto por Bailly *et al.* (2008) define limites mínimos e máximos de ROS para o desencadeamento dos eventos celulares necessários à quebra de dormência e germinação, sendo que níveis de ROS inferiores ou superiores a esse limite não permitiriam o progresso da germinação. Dentro desta “janela oxidativa”, as ROS desempenham um papel fundamental na sinalização celular, interagindo com as vias de sinalização dos hormônios ou desencadeando os eventos celulares associados à sinalização por ROS, como a expressão de genes, transporte de cálcio ou controle do estado redox.

O aumento da geração de ROS parece ser uma característica comum da fase *sensu stricto* da germinação (até a protrusão da radícula), que é um passo crítico do processo, uma vez que envolve a ativação do sistema de regulação controlado por fatores endógenos (dormência) e externos (condições ambientais: temperatura, disponibilidade de oxigênio e água) (Bailly *et al.* 2008). Durante a germinação de sementes de trigo e de *Pinus pinea* foi verificado um aumento no conteúdo de ASC e GSH que desempenham um papel importante no sucesso da germinação (De Gara *et al.* 1997, Tommasi *et al.* 2001). Em sementes germinantes de girassol o aumento da atividade GR e CAT antes da protrusão da radícula, promoveu a eliminação do H₂O₂ e limitou a peroxidação lipídica (Bailly 2004). Aumento semelhante na atividade de CAT foi descrito durante a germinação de sementes de milho (Puntarulo *et al.* 1991, Chiu *et al.* 2002), *Arabidopsis thaliana* (Gallardo *et al.* 2001) e soja (Posmyk *et al.* 2001). A aplicação exógena de H₂O₂ também tem sido utilizada na promoção da germinação de sementes de *Cinnamomun camphora* (Chen *et al.* 1993), *Hordeum vulgare* (Korystov & Narimanov 1997), *Zinnia elegans* (Ogawa & Iwabuchi 2001) e *Pisum sativum* (Barba-Espin *et al.* 2010).

1.5. Espécies Reativas de Nitrogênio (RNS)

O termo espécies reativas de nitrogênio (RNS) é utilizado para designar o óxido nítrico (NO) e outras moléculas relacionadas, como peroxinitrito (ONOO⁻), trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), dióxido de nitrogênio (NO₂) e nitrosotióis (SNO) como a S-

nitrosoglutationa (GSNO), que possuem funções relevantes em vários processos fisiológicos de células animais e vegetais (Durzan & Pedroso 2002, Corpas *et al.* 2007, Halliwell & Gutteridge 2007). Além disso, os gases NO e NO₂ são comumente denominados óxidos de nitrogênio (NOx) e são reconhecidos como poluentes atmosféricos produzidos por motores de carros e usinas de energia (Delledonne 2005, Corpas *et al.* 2011). Esses gases contribuem para a chuva ácida, a destruição da camada de ozônio e também possuem efeitos nocivos sobre a saúde humana (Corpas *et al.* 2011).

O NO é um radical livre gasoso que se difunde rapidamente através das membranas e atua como um importante mensageiro intra e extracelular, devido ao seu baixo peso molecular e qualidades lipofílicas. Está envolvido em diversos processos fisiológicos, como germinação de sementes (Sarath *et al.* 2006), formação de raízes adventícias (Tewari *et al.* 2007), resposta de defesa ao ataque de patógenos (Delledonne *et al.* 1998, Modolo *et al.* 2005, 2006, Vitor *et al.* 2013), floração (He *et al.* 2004, Seligman *et al.* 2008), senescência de folhas e cotilédones (Hung & Kao 2004, Jasid *et al.* 2009), formação de raízes (Pagnussat *et al.* 2003, Correa-Aragunde *et al.* 2004, Tewari *et al.* 2008) e desenvolvimento de pelos radiculares (Lombardo *et al.* 2006).

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). As plantas podem produzir o NO por mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Neill *et al.* 2003, Wilson *et al.* 2008), principalmente através das vias da L-arginina e do nitrito (NO₂⁻). A produção de NO por enzimas ortólogas à óxido nítrico sintase (NOS) de animais tem sido relatada em diferentes espécies de plantas, pela ação indireta de oxidação de L-arginina em L-citrulina, que é dependente dos inibidores de NOS de mamíferos (Corpas *et al.* 2009). No entanto, genes homólogos à NOS de mamíferos ainda não foram identificados em plantas. O gene *AtNOA1*, que codifica uma enzima do tipo NOS em plantas, foi identificado como potencial responsável pela síntese de NO dependente de L-arginina em *A. thaliana* (Guo *et al.* 2003). Posteriormente, foi demonstrado que esse gene codifica uma GTPase (Zemojtel *et al.* 2006) e que a baixa emissão de NO do mutante *AtNOA1* é uma consequência de alterações na síntese de proteínas (Crawford *et al.* 2006, Liu *et al.* 2010).

A produção de NO em plantas a partir da redução do NO₂⁻ pode ocorrer na reação catalisada pela enzima nitrito:NO redutase (Ni:NOR) na membrana plasmática (Stohr *et al.* 2001) e na reação dependente de NAD(P)H catalisada pela enzima nitrato redutase (NR) no citosol (Dean & Harper 1988, Rockel *et al.* 2002). Além disso, a produção de NO dependente da atividade de NR já foi descrita para diversas espécies de plantas, assim como para

Chlamydomonas reinhardtii (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek 2007). Embora a NR possa apresentar uma atividade secundária redutora de NO_2^- , esta parece ocorrer somente em condições específicas, como baixas concentrações de oxigênio, baixo pH e altos níveis de NO_2^- (Rockel *et al.* 2002, Planchet *et al.* 2005). Estas condições podem ocorrer durante a germinação de sementes (Borisjuk *et al.* 2007, Benamar *et al.* 2008) e quando as raízes são submetidas a condições de alagamento (Oliveira *et al.* 2013). Desta forma, alguns autores sugerem que o principal papel da NR na síntese de NO seja o seu papel na geração de NO_2^- , que posteriormente é reduzido a NO pela cadeia respiratória mitocondrial (Modolo *et al.* 2005). Outros mecanismos não-enzimáticos foram propostos para a formação de NO, como a redução do NO_2^- pelos carotenoides, mediada por luz (Wojtaszek 2000, Del Río *et al.* 2004). As poliaminas, que incluem moléculas como a putrescina, espermidina e espermina, que são sintetizados a partir de L-arginina, podem induzir a produção do NO, no entanto o mecanismo exato ainda é desconhecido (Tun *et al.* 2006).

Os SNO são formados a partir da reação do NO com grupos tiol na presença de oxigênio e mediada por intermediários reativos formados durante a auto-oxidação do NO, como o NO_2 ou N_2O_3 (Kolesnik *et al.* 2013). A GSNO é formada pela reação do NO com a GSH, na presença de oxigênio, e pode funcionar como um reservatório intracelular móvel do NO em células de animais e de plantas (Durner & Klessig 1999, Ng & Kubes 2003, Derakhshan *et al.* 2007, Marino & Gladyshev 2010). A enzima designada como álcool desidrogenase classe III (ADH3) catalisa a redução da GSNO dependente de NADH em GSSG e NH_3 , sendo também conhecida como enzima formaldeído desidrogenase dependente da glutatona (FALDH) ou GSNO redutase (GSNOR) (Liu *et al.* 2001).

O termo “estresse nitrosativo” é utilizado para descrever os danos celulares causados por um desbalanço na síntese de NO que leva a um excesso de produção de NO e outras RNS, que podem acarretar em toxicidade para as células e tecidos (Corpas *et al.* 2011) (Figura 4). O peroxinitrito (ONOO^-), formado pela reação do NO com o $\text{O}_2^{\bullet-}$, pode causar a nitração dos resíduos de tirosina de proteína (Ramirez *et al.* 2011, Astier *et al.* 2011, Corpas *et al.* 2013), que consiste em dos principais mecanismos de modificação pós-traducional em animais e plantas (Leitner *et al.* 2009). A nitração dos resíduos de tirosina possui diversos efeitos sobre as proteínas, como alterações na atividade enzimática, atividade proteolítica e nível de fosforilação (Abello *et al.* 2009), enquanto o aumento da nitração desses resíduos é considerada um bom marcador do estresse nitrosativo (Valderrama *et al.* 2007, Corpas *et al.* 2008, Chaki *et al.* 2011). A S-nitrosilação de proteínas em animais representa um mecanismo de regulação pós-traducional de sua função (Stamler *et al.* 2001) e recentemente este mecanismo tem emergido como atuante em plantas. Diversas proteínas foram identificadas

como candidatas para a S-nitrosilação em plantas através de análises proteômicas, no entanto o papel fisiológico destas modificações ainda precisa ser elucidado (Lindermayr *et al.* 2005, Romero-Puertas *et al.* 2008). Em sementes de *Antiaris toxicaria* o tratamento com NO é capaz de promover um aumento da S-nitrosilação das enzimas antioxidantes revertendo o efeito deletério da dessecação destas sementes (Bai *et al.* 2011).

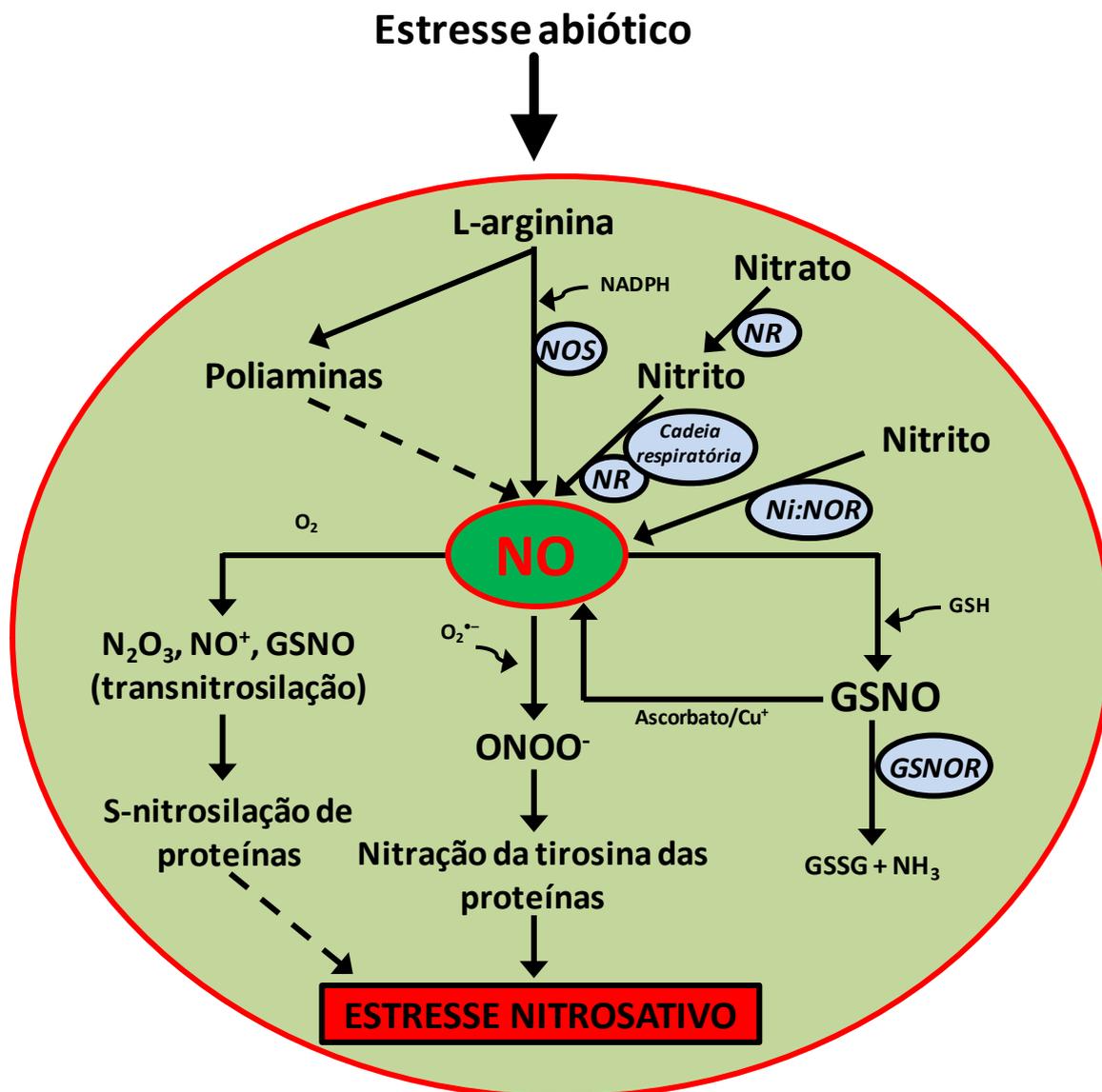


Figura 4. Modelo do metabolismo do NO em células vegetais sobre estresse abiótico. Adaptado de Corpas *et al.* 2011.

Em sementes os efeitos do NO na quebra de dormência e no estímulo da germinação já foram relatados para diversas espécies (Sarath *et al.* 2006, Bethke *et al.* 2004, 2006a, 2006b, Erol *et al.* 2008). Em sementes de alface, cevada e *Paulownia tomentosa*, o NO é capaz de estimular a germinação independentemente da presença de luz, que seria necessária à quebra de dormência dessas espécies (Giba *et al.* 1998, Beligni & Lamatina 2000, Bethke *et al.* 2004). Em sementes de *A. thaliana* o tratamento com soluções doadoras de NO se mostrou

tão eficaz quanto a estratificação para a superação da dormência primária (Bethke *et al.* 2004).

Krasuska e Gniazdowska (2012) propuseram um modelo denominado “porta nitrosativa”, similar ao proposto para ROS na germinação e na quebra de dormência de sementes, relacionando o conteúdo de RNS a estes processos. Nesse modelo, a germinação das sementes só seria possível quando o conteúdo RNS estivesse dentro dos limites da “porta nitrosativa”, sendo que valores inferiores a essa faixa não seriam suficientes para promover a germinação, enquanto valores superiores de RNS induziriam danos nos componentes celulares, que impediriam ou atrasariam a germinação das sementes.

A produção de NO em células e tecidos de plantas pode ocorrer em resposta ao estresse abiótico (Garcês *et al.* 2001) e ataque de patógenos (Delledonne *et al.* 1998), e o NO produzido pode induzir a síntese de metabólitos secundários pelas plantas (Sudha & Ravishankar 2002, Hahlbrock *et al.* 2003). Muitos estudos indicam que o NO está envolvido na produção eliciada de metabólitos secundários, como a saponina (Hu *et al.* 2003), hipericina (Xu *et al.* 2005a), puerarina (Xu *et al.* 2006), catarantina (Xu & Dong 2005), a artemisinina (Zheng *et al.* 2008) e taxanos (Wang *et al.* 2006) em culturas de células e tecidos de plantas. Alguns autores demonstraram que a produção de NO induzida por eliciadores fúngicos pode mediar a ativação de genes de defesa e o acúmulo de metabólitos secundários (Modolo *et al.* 2002, Xu *et al.* 2005a). Através de bioensaios com cotilédones de soja, Modolo e colaboradores (2002) identificaram um acúmulo de gliceolinas, daidzeína e genisteína na presença de eliciadores fúngicos e de doadores de NO, mas o teor e o perfil de acúmulo dos mesmos diferiram conforme o eliciador utilizado, sendo o doador de NO o mais eficiente. A primeira evidência de indução de genes de PAL (fenilalanina amônia liase) e CHS (chalcona sintase) pelo NO foi observada em células de soja em suspensão infectadas com a bactéria avirulenta *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* (Delledonne *et al.* 1998). Um aumento drástico do nível de transcritos PAL e CHS foi detectado nas primeiras 3 horas após a infecção. A adição de um sequestrador de NO, carboxi-PTIO (cPTIO), impediu o acúmulo destes transcritos, sendo que o uso de doadores de NO estimulou a transcrição destes genes (Delledonne *et al.* 1998). O tratamento com metiljasmonato, ácido salicílico ou NO promoveu um aumento na exsudação de metabólitos secundários por raízes de *A. thaliana* e alterações na expressão de genes envolvidos com o transporte de membranas (Badri *et al.* 2008). Embora alguns trabalhos descrevam um efeito do NO na produção de metabólitos secundários em plantas, com consequências sob a resposta de defesa das mesmas, não há relatos de trabalhos publicados que investiguem a relação NO, metabolismo oxidativo e síntese de metabólitos secundários em sementes.

1.6. Interação ROS x RNS

Conforme descrito acima, estas duas famílias de moléculas (ROS e RNS) estão envolvidas na sinalização de vários processos fisiológicos em plantas. No entanto, em condições de estresse ambiental, pode haver um desequilíbrio na produção destes radicais, que podem causar danos às células, sendo que parte das moléculas produzidas pode atuar no reparo dos danos causados (Corpas *et al.* 2013).

O NO atua na proteção contra estresses bióticos e abióticos, como o estresse oxidativo decorrente da exposição à salinidade e metais pesados, principalmente por modulação das enzimas que participam do metabolismo antioxidante e/ou por sequestro direto de ROS (Kopyra & Gwozdz 2003, Laspina *et al.* 2005). Diversos estudos indicaram que o NO pode sequestrar ROS e proteger as células vegetais de danos, enquanto outros têm demonstrado que o NO afeta a produção de ROS ou que ambos interagem durante a morte celular (Clark *et al.* 2000, Delledonne *et al.* 2001, Beligni *et al.* 2002, De Pinto *et al.* 2002). O pré-tratamento com SNP (doador de NO) reverte os efeitos inibitórios do estresse induzido pelo cobre na germinação de sementes de trigo, por promover um aumento na atividade SOD e CAT reduzindo o conteúdo de H₂O₂ e o nível de MDA (Hu *et al.* 2007). Efeito similar foi observado em folhas de *Oryza sativa* submetidas ao estresse por cobre, onde o tratamento com doador de NO também reduziu o conteúdo de MDA e promoveu um aumento da atividade de enzimas detoxificantes de ROS (Yu *et al.* 2005). Por outro lado, em altas concentrações, o NO pode ter um efeito tóxico, sendo capaz de danificar as membranas celulares e inibir a atividade de enzimas antioxidantes levando ao acúmulo de ROS (Romero-Puertas *et al.* 2004, Bethke *et al.* 2007).

A interação NO e ROS tem sido bastante estudada e debatida e, em alguns casos, parece contar com um terceiro componente, o ácido abscísico (ABA), como observado na modulação do fechamento estomático em *A. thaliana* (Desikan *et al.* 2002, Bright *et al.* 2006). A interação entre NO, ROS e ABA também foi bem documentada durante a germinação de sementes de gramíneas (Sarath *et al.* 2007). Peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ABA atuam de maneira antagônica, estimulando e inibindo a germinação, respectivamente. O H₂O₂ foi capaz de reverter parcialmente o efeito inibitório do ABA, sendo que a utilização do PTIO (sequestrador de NO) reverte o estímulo observado na presença de H₂O₂.

A interação entre ROS e RNS, em condições específicas de estresse ambiental, pode causar estresse oxidativo e nitrosativo, como descrito para plantas submetidas a baixas temperaturas (Airaki *et al.* 2012), salinidade (Valderrama *et al.* 2007, Leterrier *et al.* 2012, Tanou *et al.* 2012) e seca (Signorelli *et al.* 2013). Em outros casos, o equilíbrio entre a

produção de NO e de ROS parece determinar o resultado final, como observado em culturas de células de *Glycine max* em que altas concentrações de NO não levam à morte celular se não forem acompanhadas de um “burst” oxidativo (Delledonne *et al.* 2001).

As células vegetais respondem a diversos eliciadores bióticos e abióticos ativando uma vasta gama de reações (fluxo de íons através da membrana, síntese de ROS, fosforilação e desfosforilação de proteínas). Estes são componentes presumíveis da via de transdução de sinal que leva à respostas de defesa, como ativação de genes de defesa, hipersensibilidade e morte celular (Wu *et al.* 2007). Tem sido sugerido que o NO atua sinergisticamente com as ROS, amplificando estas respostas de defesa (Wang & Wu 2005). Em raízes adventícias de *Panax ginseng*, a aplicação de NO exógeno por meio do SNP ativou a atividade NADPH oxidase, que induziu um aumento de $O_2^{\cdot-}$ e estimulou a atividade de enzimas antioxidantes (SOD, CAT e APX). O aumento da atividade destas enzimas sob eliciação do NO foi responsável pelo menor teor de H_2O_2 e menor peroxidação lipídica (Tewari *et al.* 2008). Em raízes adventícias de *Echinacea purpurea*, o papel do NO sobre a produção de ROS pode estar relacionado com a concentração da solução doadora aplicada. O tratamento com SNP (até 100 μ M) provocou um declínio no conteúdo de H_2O_2 e peroxidação lipídica, porém concentração mais elevada deste doador de NO (250 μ M) teve efeito pró-oxidante, aumentando os níveis de H_2O_2 e da peroxidação lipídica, além de diminuir a atividade APX (Wu *et al.* 2007). Em embriões de maçã, a fumigação com NO promoveu a perda de eletrólitos imediatamente após a fumigação, sendo que esse aumento temporário da permeabilidade da membrana pode promover a germinação, e permitir a liberação de H_2O_2 para o meio (Gniazdowska *et al.* 2010, Krasuska & Gniazdowska 2012).

A análise de expressão em larga escala em plântulas de *A. thaliana* tratadas com duas concentrações de SNP (0,1 e 1 mM) indicou 342 genes super-expressos e 80 genes com redução do acúmulo de transcritos por efeito do NO. Dentre esses genes, os pertencentes às categorias “geração e remoção de ROS” e “proteção contra estresse oxidativo” se mostraram bastante afetados pelo tratamento com NO, reforçando o “cross-talk” entre essas duas vias metabólicas (Parani *et al.* 2004). Zago *et al.* (2006) relataram que, dos 214 transcritos sequenciados em células de tabaco induzidas à morte celular, 152 genes foram induzidos de forma independente por NO ou H_2O_2 , indicando uma sobreposição entre as vias de sinalização desencadeadas por cada molécula.

Evidências da relação entre ROS e RNS tem se acumulado na última década, resultando na hipótese de que as vias de sinalização oxidativa e nitrosativa estejam conectadas nas respostas de plantas aos estresses ambientais (Molassiotis & Fotopoulos 2011, Corpas & Barroso 2013, Puppo *et al.* 2013). Desta forma, a interação entre os processos hormonais e os

mecanismos de produção e eliminação de ROS e RNS torna-se um aspecto fundamental para determinar a tolerância das plantas às condições ambientais adversas (Salgado *et al.* 2015).

1.7. *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 de crescimento rápido, infestante, perene, reproduzida por semente, com hábito arbustivo que pode atingir de 2 a 4 m de altura (Figura 5).

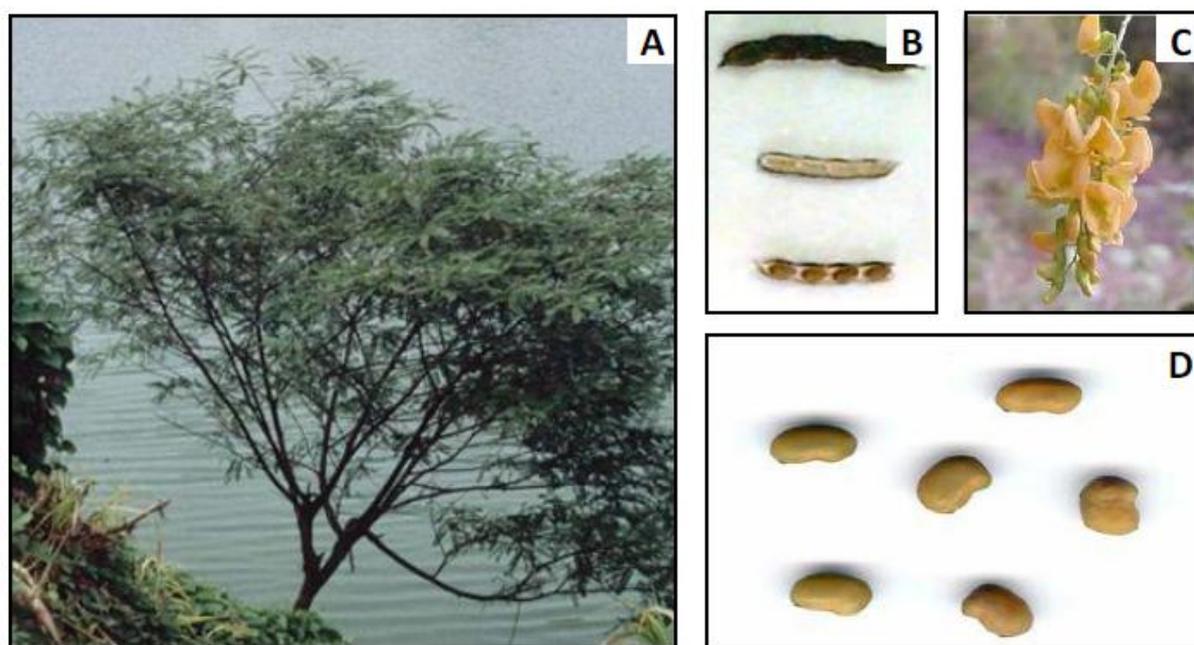


Figura 5. Arbusto (A), fruto maduro com sementes (B), flores (C) e sementes (D) de *Sesbania virgata*. Adaptado de Simões (2008).

Esta espécie produz um grande número de sementes com alta viabilidade e que são dispersas dentro de frutos de legumes indeiscentes que flutuam na água (Pott & Pott 1994, Simões *et al.* 2008). Além disso, as sementes dessa espécie possuem germinação rápida e bastante homogênea, algo pouco comum entre sementes de plantas nativas. As sementes apresentam dormência tegumentar e endosperma que acumula galactomanano como

polissacarídeo de reserva de parede celular. O processo germinativo dessas sementes 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.* 2000). 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). Recentemente, Zerlin (2011) demonstrou que o tratamento com soluções doadoras de NO não afeta a embebição e a germinação de sementes de *S. virgata*, porém atrasa a degradação da reserva de galactomanano utilizada no desenvolvimento inicial da plântula (Zerlin 2011). Estes resultados sugerem que presença do tegumento e do galactomanano controlem a entrada do NO aplicado reduzindo assim os efeitos promovidos por esta molécula.

As sementes desta espécie acumulam no tegumento flavonoides e proantocianidinas e no embrião acumulam o alcaloide sesbanimida A, que apresenta atividade antifúngica (Simões 2008). Simões *et al.* (2008) encontraram grandes quantidades de (+)-catequina nos exsudatos de sementes de *S. virgata*, que possuem atividade fitotóxica sobre *A. thaliana* e *O. sativa*. El Id e colaboradores (2015) mostraram que os aleloquímicos exsudados por *S. virgata* apresentam maior potencial de inibição da germinação e desenvolvimento de espécies cultivadas do que de espécies nativas que co-ocorrem com *S. virgata*. A presença de proteína com atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatogênicos já foi observada em sementes de *S. virgata* (Praxedes *et al.* 2011). Altas concentrações de ABA também foram detectadas nos exsudatos destas sementes (D.S. Mignoni, comunicação pessoal).

S. virgata é encontrada em locais muito úmidos ou alagados, principalmente em solos modificados, como campos de arroz irrigado 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 disso, esta espécie é considerada uma espécie promissora para a recuperação de áreas degradadas e revegetação de mata devido a sua rusticidade, tolerância a solos de baixa fertilidade e condições de baixa oxigenação, e capacidade de competir com plantas herbáceas (Zayat 1996, Coutinho *et al.* 2005, Zanandrea *et al.* 2010). No entanto, no nordeste brasileiro *S. virgata* começou a colonizar margens de rios e reservatórios de água artificiais, apresentando um comportamento invasivo devido à formação de populações maciças dominantes que suprimem a regeneração natural de plantas nativas (Souza *et al.* 2011).

Tendo em vista que o NO tem sido relatado como um indutor de resposta de defesa em plantas e que sua interação com ROS parece amplificar estas respostas, essa interação poderia

modular as atividades biológicas em sementes de *S. virgata*, que em condições normais exsudam grande quantidade de substâncias com atividade microbiana e fitotóxica, como a catequina e a sesbanimida A. Desta forma, a interação entre NO x ROS poderia alterar o potencial antifúngico e alelopático interferindo no potencial invasor desta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho teve por objetivo analisar o efeito do óxido nítrico (NO) exógeno sobre a composição e atividade biológica dos exsudatos de sementes, assim como avaliar sua relação com o metabolismo nitrosativo e oxidativo durante a germinação e o desenvolvimento inicial de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar possíveis alterações na composição química dos exsudatos induzidas por NO e determinar se essas alterações afetam sua atividade fitotóxica e antifúngica, por meio da realização de bioensaios com *A. thaliana*, *Oryza sativa* e *Cladosporium cladosporioides*.
- Determinar se a fumigação com altas concentrações de NO induz um estresse nitrosativo em sementes germinantes de *S. virgata*, por meio da quantificação e localização de NO nos tecidos e medidas de atividades de enzimas relacionadas;
- Avaliar se a fumigação com altas concentrações de NO induz o acúmulo de espécies reativas de oxigênio nos tecidos e se há indução do sistema antioxidante enzimático, por meio da quantificação de H₂O₂ e peroxidação lipídica e dosagem da atividade de algumas enzimas antioxidantes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material biológico

- Sementes de *Sesbania virgata* foram coletadas de 10 matrizes situadas em Lavras (MG), em abril de 2011.
- Sementes de *Arabidopsis thaliana* L. do ecótipo Columbia foram cedidas pela Dra. Ione Salgado (UNICAMP).
- Sementes de *Oryza sativa* irrigado cultivar BRS Ourominas foram fornecidas pelo EMBRAPA Arroz e Feijão (GO).
- O fungo *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A. de Vries (CCIBt140) foi obtido a partir de culturas fornecidas pela Micoteca do Instituto de Botânica de São Paulo e mantido em meio BDA (batata-dextrose-ágar), no escuro a 25°C por 15 dias.

3.2. Fumigação de sementes de *S. virgata* com o gás NO

As sementes de *S. virgata* foram escarificadas por abrasão, com o auxílio de uma lixa, na região acima do hilo. Após a escarificação, quinze sementes foram distribuídas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo um papel de filtro embebido com água destilada na razão 0,5 mL . semente⁻¹. Para investigar o efeito do NO na germinação, as placas foram fumigadas com NO gasoso, no laboratório da Professora Dra. Ione Salgado, do Departamento de Biologia Vegetal da Universidade Estadual de Campinas, em câmaras construídas para este fim (Figura 6).



Figura 6: Câmara de fumigação de NO gasoso.

As sementes de *S. virgata* foram fumigadas na concentração de 60 ppm do gás NO por um período de 12 horas, conforme descrito por Vitor e colaboradores (2013). O tratamento foi realizado em câmaras de acrílico (Trevisan Tec. LTDA), devidamente lacradas com tampa transparente, contendo um tubo para entrada e outro para saída de gases. A exposição a uma atmosfera de 60 ppm se deu pelo fluxo contínuo de 300 mL. min⁻¹ de gás NO diluído em 210 mL . min⁻¹ de ar sintético puro. Como controle, as sementes foram expostas somente à atmosfera de ar sintético puro. O fluxo total de gases foi medido com um dispositivo de medição de vazão (bolhomêtro). Todo o procedimento foi realizado no interior de uma capela. Após o tratamento, as placas foram mantidas em câmaras do tipo BOD a 26°C com fotoperíodo de 12 horas, por até 3 dias. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata. Após a fumigação os exsudatos e as sementes foram coletados, e utilizados para as análises descritas a seguir (Figura 7).

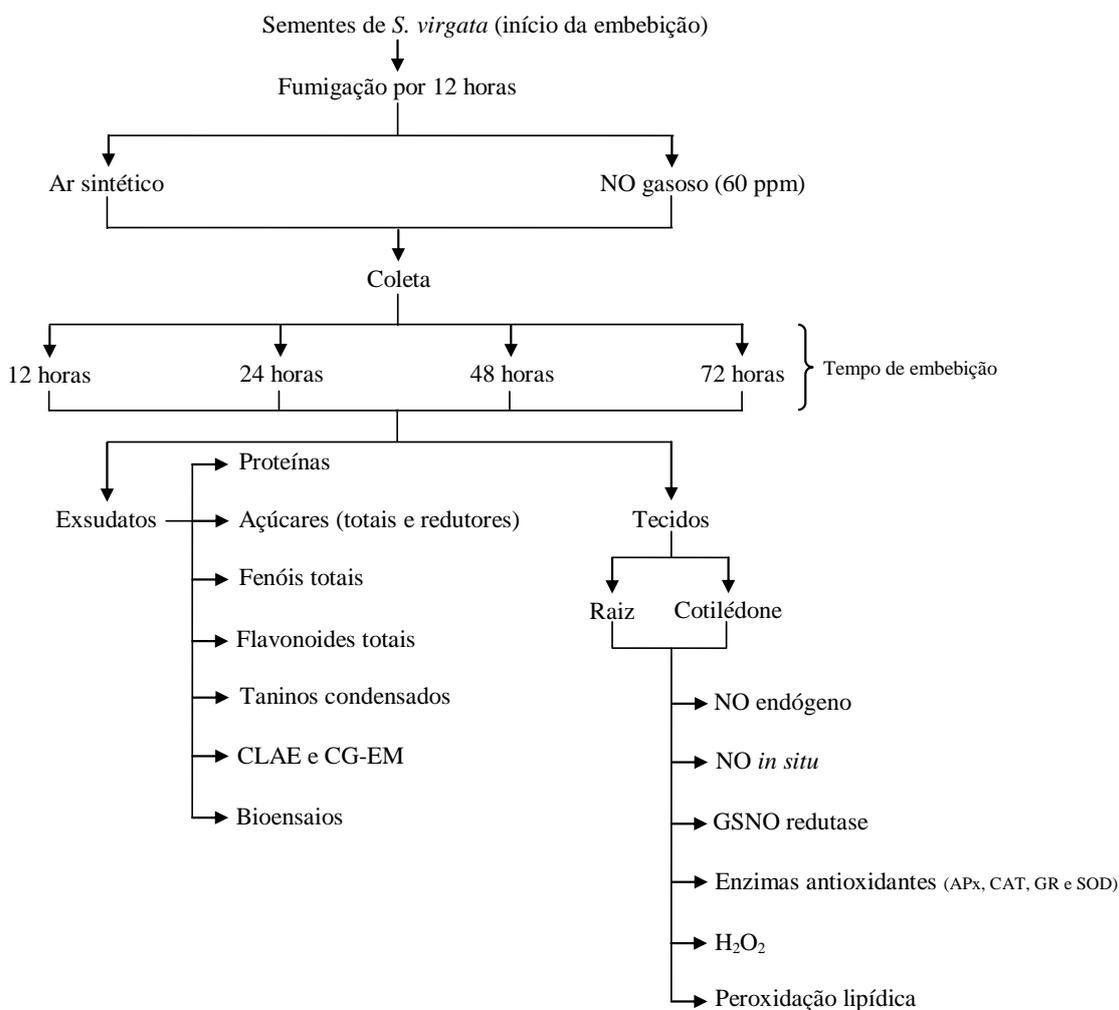


Figura 7. Fluxograma representando a fumigação e análises realizadas com os exsudatos e os tecidos de sementes de *S. virgata*.

3.3. Fumigação de catequina comercial e exsudatos com o gás NO

Os exsudatos de sementes de *S. virgata* foram coletados por lavagem dos papéis de filtro com água destilada, filtrados em membrana de nylon e o seu volume foi ajustado para três vezes o volume utilizado na embebição (volume final = 30 mL) (Simões 2008). A seguir, (+)-catequina de fonte comercial (Sigma) ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e exsudatos coletados de sementes *S. virgata* (24, 48 e 72 horas) foram distribuídos em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo um papel de filtro. As placas contendo a catequina comercial e os exsudatos coletados foram fumigadas com NO gasoso e ar sintético por um período de 12 horas conforme descrito anteriormente. Após a fumigação, a solução foi coletada e os papéis de filtro foram lavados com água destilada e seu volume ajustado para três vezes o volume utilizado (volume final = 8 mL). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4. Obtenção dos tecidos e exsudatos das sementes

As fumigações foram iniciadas juntamente com o processo de embebição das sementes de *S. virgata* (0 horas ou tempo 0) e os exsudatos foram coletados após o término da fumigação (12 horas) e a cada 24 horas de embebição até 3 dias (24, 48 e 72 horas de embebição). As sementes foram coletadas e dissecadas em cotilédones e raízes, que foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados à -80°C . Os exsudatos foram coletados por lavagem dos papéis de filtro com água destilada conforme descrito anteriormente no item 3.3.

3.5. Quantificação de proteínas

Exsudatos de sementes de *S. virgata* tiveram o seu conteúdo de proteínas estimado pelo método de Bradford (1976). A interação entre as proteínas e o corante Coomassie Brilliant Blue (BioRad) produz o complexo proteína-corante de coloração azul que é proporcional à quantidade de proteínas presentes na amostra. A análise da formação desse complexo foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 595 nm e a quantificação realizada utilizando uma curva padrão com albumina de soro bovino (BSA, Sigma).

3.6. Quantificação de açúcares totais e redutores

Os exsudatos de *S. virgata* foram submetidos à dosagem do conteúdo de açúcares totais pelo método fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956). Neste método, os açúcares reagem com o ácido sulfúrico produzindo o furfural, que reage com o fenol produzindo um composto de coloração amarela-alaranjada proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra.

A análise da formação desse composto foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 490 nm e a quantificação realizada utilizando uma curva padrão de glucose.

Os exsudatos também foram analisados quanto aos teores de açúcares redutores de acordo com o método Somogyi-Nelson (Somogyi 1945). Os açúcares redutores, quando aquecidos em meio alcalino, reduzem o íon cúprico a óxido cuproso que reage com o arsênio-molibdato e produz o óxido de molibdênio de coloração azul-esverdeado. A análise da formação do óxido de molibdênio foi verificada em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 520 nm e a quantificação realizada utilizando uma curva padrão de glucose.

3.7. Quantificação de fenóis totais

O conteúdo de fenóis totais presentes nos exsudatos foi determinado pelo ensaio com o reagente Folin-Ciocalteu conforme descrito por Marinova e colaboradores (2005), com adaptações para microplacas. Em uma placa de Elisa foram adicionadas alíquotas do exsudato, água destilada e 10 μ L do reagente Folin-Ciocalteu (volume final de reação de 100 μ L). Após 5 minutos foram adicionados 100 μ L de carbonato de sódio (7%) e água destilada (volume final de 250 μ L) e a reação foi incubada a temperatura ambiente por 90 minutos. O ensaio de Folin-Ciocalteu baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas em meio alcalino produzindo um complexo de coloração azul. Após incubação por 90 minutos, a formação do complexo foi determinada no comprimento de onda (λ) 750 nm em espectrofotômetro para microplacas e o conteúdo de fenóis totais estimado através de curva padrão com ácido gálico.

3.8. Quantificação de flavonoides totais

O conteúdo de flavonoides totais dos exsudatos foi determinado pelo ensaio colorimétrico do cloreto de alumínio conforme Chang *et al.* (2002), com adaptações para microplaca. Em uma placa de Elisa foram adicionadas alíquotas do exsudato, 75 μ L de etanol (75%) e 25 μ L de acetato de potássio (200 mM). Após 5 minutos, foram adicionados 5 μ L de cloreto de alumínio (10%) e água destilada até obter um volume final de 250 μ L, que foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos. A determinação do conteúdo de flavonoides é baseada na formação do complexo flavonoide-alumínio de coloração amarelada. Após incubação, a quantidade desse complexo foi avaliada em espectrofotômetro para microplacas a 415 nm e o conteúdo de flavonoides totais estimado em função da curva padrão de quercetina.

3.9. Quantificação de taninos condensados

Os exsudatos foram submetidos à dosagem de taninos condensados (proantocianidinas) pelo método de vanilina clorídrica (Broadhurst & Jones 1978). Este método colorimétrico baseia-se na reação da vanilina em meio fortemente ácido com os taninos (principalmente os flavanóis), formando um complexo vanilina-tanino de coloração avermelhada. No entanto, como este ensaio pode sofrer interferências de flavanóis monoméricos amplamente distribuídos, tais como catequina e epicatequina (Hagerman & Butler 1989), esta análise pôde ser utilizada como um método preliminar para se estimar a quantidade de catequina presente nos exsudatos. A análise do complexo vanilina-tanino foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda (λ) de 500 nm e a quantificação realizada utilizando uma curva padrão de (+)-catequina.

3.10. Quantificação de catequina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análise da catequina foi realizada conforme descrito por Simões (2008), onde alíquotas de 20 mL dos exsudatos coletados (equivalente aos exsudatos de 10 sementes) foram submetidas à partição líquido-líquido por 3 vezes em mesmo volume com acetato de etila (AcOEt). A fração AcOEt obtida foi filtrada em sulfato de sódio anidro e evaporada até a secura em rota-evaporador. Os extratos secos foram solubilizados em metanol (MeOH) na proporção de 100 μ L por semente e purificados em filtros Millipore de 45 μ m.

Vinte microlitros de cada amostra foram aplicados em coluna C18 em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Pro Star, Varian. A separação foi realizada em gradiente linear com água e MeOH acidificados com 0,1% de ácido acético (20% à 100 % MeOH, vazão de 0,8 mL. min⁻¹). A detecção foi realizada a 280 nm e a identificação e quantificação da catequina determinada utilizando curva padrão de (+)-catequina.

3.11. Análise dos exsudatos por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas

Os exsudatos particionados com AcOEt foram analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) conforme descrito por Roessner *et al.* (2001), com modificações. Primeiramente, 200 μ L de exsudatos particionados com AcOEt foram secos à vácuo, sendo em seguida submetidos a derivatização com 200 μ L de piridina, 50 μ L *N-O*-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) e cloridrato de metoxiamina (20 mg/mL em piridina) a 75 °C durante 1 hora. As amostras foram então transferidas para frascos de vidro, os quais foram lacrados e injetados automaticamente em um sistema CG-EM composto por um cromatógrafo a gás (GC 6890 series) acoplado a um espectrômetro de massas

quadrupolo (MSD 5973N) (Agilent Technologies). A separação cromatográfica foi realizada em coluna de 30 metros DB-5 com espessura de 0,25 mm e filme de 0,25 μm . A temperatura inicial do forno foi de 70° C por 5 min, a temperatura final de 280° C por 1 min, com uma taxa crescente de 5° C . min^{-1} , sendo utilizado o hélio como gás de arraste (taxa de 1 mL . min^{-1}). Os dados foram gerados e analisados através do programa Chemstation (Agilent Technologies) e os picos detectados foram comparados com os padrões corridos e com a NIST 08 Spectral Library.

3.12. Capacidade de sequestro de NO pelos exsudatos (quelação)

Para avaliar a capacidade da catequina em quelar o NO, os exsudatos controle e tratado (coletados às 24 horas de embebição), assim como a catequina comercial, foram analisados em relação ao seu potencial de sequestro de NO. A análise foi realizada utilizando uma solução saturada de NO preparada por borbulhamento com gás NO puro em um frasco selado de borracha, contendo tampão fosfato (pH 7,2), previamente de-aerado com argônio. A concentração da solução saturada de NO foi estimada em aproximadamente 1,7 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, que corresponde à saturação máxima deste gás em solução aquosa a 25°C (Henry *et al.* 1997). O sequestro do NO foi quantificado utilizando o sensor eletroquímico ISO-NOP conectado ao analisador de radicais livres (Apollo 4000), onde a taxa de degradação do NO foi avaliada durante 30 segundos pelo decaimento do tamanho do pico na presença ou ausência das soluções testadas (Paquay *et al.* 2000). Os valores foram comparados com o controle (contendo apenas o NO) e expressos em relação ao tamanho do pico deste controle.

3.13. Bioensaios

3.13.1. Bioensaio de atividade fitotóxica com plântulas de *A. thaliana*

Para avaliar os efeitos fitotóxicos dos exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar e NO, plântulas de *A. thaliana* foram crescidas em meio líquido MS contendo exsudatos de diferentes períodos de embebição, conforme metodologia modificada de Simões e colaboradores (2008). Sementes de *A. thaliana* foram desinfestadas por 8 minutos em solução de hipoclorito de sódio (0,3% de cloro ativo) e lavadas por 8 vezes com água destilada autoclavada. As sementes foram germinadas em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo meio basal MS (Murashige & Skoog 1962) sólido (0,9% de Agar e 3% de sacarose), sob temperatura de 25 °C e fotoperíodo de 16 horas. Após 7 dias, as plântulas foram transferidas para microplacas de cultura de tecidos com 12 poços (2,5 cm de diâmetro x 2 cm de profundidade) contendo 1 mL de meio MS líquido (1 plântula/poço), e mantidas em um

agitador orbital a 25 ± 2 °C, com fotoperíodo de 16 horas. Após 1 dia, os diferentes exsudatos de sementes de *S. virgata* (12, 24, 48 e 72 horas de embebição) e (+)-catequina comercial (200 µg e 500 µg) foram ensaiados quanto à sua atividade fitotóxica em plântulas de *A. thaliana*. Os exsudatos e padrões foram dissolvidos em metanol e aplicados na concentração de $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ no meio MS líquido, e este solvente também foi utilizado como controle negativo do ensaio sendo aplicado nas plântulas controle. As plântulas foram mantidas sob agitação constante por 7 dias. Após este período, as plântulas foram removidas dos poços das placas, fotografadas e analisadas quanto ao comprimento da raiz e da parte aérea, massa fresca e seca da raiz e parte aérea. Como o desenvolvimento das raízes de *A. thaliana* submetidas aos exsudatos foi drasticamente afetado, as raízes de cada tratamento foram pesadas em conjunto e posteriormente foi calculada a média da massa seca de cada plântula.

3.13.2. Bioensaio de atividade fitotóxica em sementes de *O. sativa*

Também se avaliou o efeito fitotóxico dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, com diferentes períodos de embebição, sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de sementes de *O. sativa* (arroz). As sementes de arroz foram desinfestadas conforme descrito por Simões (2008). Em seguida, cinco sementes de arroz foram distribuídas em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo catequina comercial ($1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) ou solução de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de exsudatos fumigados com ar e NO gasoso (12, 24, 48 e 72 horas de embebição). Para controle do ensaio, sementes de arroz foram distribuídas em placas contendo apenas água destilada. O ensaio foi realizado em triplicata e as placas mantidas em câmaras do tipo BOD a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas, sendo a distribuição das placas inteiramente casualizada dentro da câmara. Após 6 dias, as plântulas foram fotografadas e analisadas em relação ao comprimento da raiz e da parte aérea, massa seca da raiz e da parte aérea.

3.13.3. Bioensaio de detecção de substâncias antifúngicas

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada com alíquotas de 200 µg de extratos, obtidos por partição com AcOEt dos exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar e NO (12, 24, 48 e 72 horas de embebição). Estes extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada em placa de sílica-gel 60 F254 Merck (CCD) eluída no sistema de solventes clorofórmio: metanol (8:2, v/v). A nistatina (5 µg) foi utilizada como padrão e como controle positivo do bioensaio. O ensaio de bioautografia foi realizado utilizando uma suspensão de esporos do fungo *C. cladosporioides* em meio líquido de sais e glucose. A suspensão de conídios do fungo ($>2 \times 10^6$ conídios/mL) foi borrifada sobre a cromatoplaça e esta foi incubada em câmara úmida a 26 °C, no escuro, por 72 horas (Homans & Fuchs 1970).

Após este período, a presença de zonas claras de inibição indicou a ocorrência de compostos com atividade antifúngica. As cromatoplasas foram fotografadas e os valores de Rf calculados.

3.14. Análise da emissão de NO com 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2)

O NO foi quantificado segundo metodologia adaptada de Ye *et al.* (2004). A 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2) é uma molécula não fluorescente, que reage com derivados do NO, formados na presença de oxigênio, e produz o triazolofluoresceína (DAF-2T), que é altamente fluorescente e tem excitação e emissão máxima em 495 e 515 nm, respectivamente. Sementes de *S. virgata* fumigadas com ar e NO gasoso foram coletadas após 12, 24 e 72 horas, e separadas em raízes e sementes sem raízes. O material vegetal foi pesado e colocado em um tubo contendo 670 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) e 30 µL de solução de DAF-2 concentrada (500 µM). Em seguida, o material foi incubado por 1 hora em temperatura ambiente (no escuro). Após este período, o tecido vegetal foi retirado e os tubos foram centrifugados a 13400 x g por 5 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e congelado a -80°C até a realização da leitura. O branco consistiu em tampão fosfato com DAF-2, submetido às mesmas condições que as amostras. As amostras foram diluídas em tampão fosfato 0,1 M (volume final = 1,5 mL) e a análise da fluorescência realizada em espectrofluorímetro, com excitação a 495 nm e emissão de 500 a 550 nm. A análise foi realizada em colaboração com a Dra. Ione Salgado, no Departamento de Bioquímica da UNICAMP.

3.15. Atividade da S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR, EC 1.2.1.1)

A atividade da enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) foi determinada pelo consumo de NADH conforme descrito por Frungillo *et al.* (2013). Raízes e cotilédones (12, 24, 48 e 72 horas de embebição) foram homogeneizados em 400 µL do tampão de extração constituído por 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 500 µM cisteína, 500 µM PMSF e 25 µM leupeptina. Os homogeneizados foram centrifugados a 13400 × g a 4 °C por 20 min e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. A mistura de reação foi composta por 50 mM tampão fosfato (pH 7,2), 175 µM NADH e 175 µM GSNO. O monitoramento do consumo de NADH foi realizado em espectrofotômetro a 340 nm durante 300 segundos com intervalo de 10 segundos. A atividade GSNOR foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹. cm⁻¹ (Foyer & Halliwell 1976) e expressa como µmol de NADH . min⁻¹. mg⁻¹ de proteína.

3.16. Atividade de enzimas antioxidantes

3.16.1. Preparação do extrato enzimático

Raízes e cotilédones isolados de sementes de *S. virgata* com 12, 24, 48 e 72 horas de embebição foram previamente triturados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C . Os extratos enzimáticos brutos foram obtidos pela homogeneização de 0,1 g de raízes ou cotilédones em 1,5 mL do tampão de extração constituído por 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA, 1 mM de ácido ascórbico, 10% glicerol e 1% polivinil polipirrolidona insolúvel (PVPP). Os homogeneizados foram centrifugados a $15600 \times g$ a 4°C por 20 min e os sobrenadantes coletados e utilizados para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes e de proteínas.

3.16.2. Determinação de proteínas

O conteúdo de proteínas dos extratos enzimáticos foi estimado pelo método de Bradford (1976) tendo albumina de soro bovino (BSA) como padrão, conforme descrito no item 3.5.

3.16.3. Atividade da ascorbato peroxidase (APx, EC 1.11.1.11)

A atividade da ascorbato peroxidase (APx) foi realizada pela medição da oxidação do ascorbato dependente de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Torsethaugen *et al.* 1997). A mistura de reação foi composta por 0,1 M de tampão fosfato (pH 7,0), 50 mM de ácido ascórbico, 0,1 mM de H_2O_2 e 100 μL de extrato enzimático. A oxidação do ascorbato foi observada pelo decaimento da absorbância a 290 nm, durante 60 segundos de reação com intervalo de 1 segundo. A atividade da APx foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Nakano & Asada 1981) e expressa em μmol de ascorbato $\cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.16.4. Atividade da catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo decaimento da absorbância a 240 nm durante 60 segundos com intervalo de 1 segundo, devido à degradação de H_2O_2 (Annstrong & Whiteman 2007). A mistura de reação foi composta por 50 mM tampão fosfato (pH 7,0), 10,3 mM de H_2O_2 e 100 μL de extrato enzimático. Os cálculos da atividade foram realizados com base no coeficiente de extinção molar de $36 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Boscolo *et al.* 2003) e expressos em μmol de $\text{H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína.

3.16.5. Atividade da glutathiona redutase (GR, EC 1.8.1.7)

A atividade da glutathiona redutase (GR) foi estimada pelo consumo do substrato NADPH, medido pelo decaimento da absorbância a 340 nm durante 60 segundos com intervalo de 1 segundo (Schaedler & Bassham 1977). A mistura de reação foi composta por 50 mM Tris-HCl (pH 7,8), 0,15 mM NADPH, 0,5 mM glutathiona oxidada (GSSG), 3 mM MgCl₂, 1 mM EDTA e 100 µL de extrato enzimático. A atividade da GR foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 6,22 mM⁻¹. cm⁻¹ (Foyer & Halliwell 1976) e expressa como µmol de NADPH . min⁻¹ . mg⁻¹ de proteína.

3.16.6. Atividade da superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi realizada de acordo com método descrito por Stewart & Bewley (1980). A mistura de reação foi composta por tampão fosfato 50 mM (pH 7,8), 13 mM metionina, 75 mM cloreto de tetrazólio-nitrozul (NBT), 2 mM riboflavina, 100 nM EDTA, e 100 µL de extrato enzimático. Os tubos foram agitados e colocados sob fonte luminosa fluorescente de 40 W por 20 min. Simultaneamente a esta reação, tubos contendo toda a solução de reação e amostra foram mantidos no escuro. A atividade da SOD baseia-se na fotoredução de O₂ pela riboflavina que forma o radical superóxido, e este por sua vez reduz o NBT para formar o composto azul de formazan. Na presença da SOD esta segunda redução não ocorre porque a enzima dismuta o superóxido mantendo a coloração da solução inicial (Beauchamp & Fridovich 1971). Desta forma, a atividade da enzima foi quantificada em espectrofotômetro a 560 nm, pela diferença entre as absorbâncias das amostras iluminadas e não iluminadas. Uma unidade de atividade da SOD foi considerada como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do NBT.

3.16.7. Atividade isoenzimática da superóxido dismutase

A atividade da SOD também foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (PAGE) 12%, utilizando sistema de mini-gel (BioRad), conforme Davies (1971). O princípio da reação para determinação da atividade da SOD em gel é o mesmo descrito para a atividade em espectrofotômetro, onde na presença da SOD ocorre menor formação de formazan e o gel fica claro, sendo que na ausência da SOD há maior formação de formazan e o gel fica escuro.

Após a determinação da concentração de proteína nos extratos enzimáticos (Bradford 1976), alíquotas contendo 20 µg de proteína e o tampão de amostra foram aplicadas em cada poço. A eletroforese foi conduzida a 4°C com uma voltagem constante de 50 V/gel. Após o término da corrida, o gel foi incubado por 20 minutos na mistura de reação contendo 0,1 mM

NBT, 10 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina e 50 mM Tris-HCl (pH 8,3) com agitação constante e na ausência de luz. Depois da lavagem do gel, este foi mergulhado em água e exposto a luz até que as bandas de SOD aparecessem por revelação negativa. Em seguida, a reação foi interrompida com uma solução 6% de ácido acético. A captura da imagem dos géis foi realizada em sistema de fotodocumentação L-Pix (Loccus Biotecnologia) e as imagens analisadas com o software LABIMAGE 1D 1.10 (Loccus Biotecnologia).

Para determinação das isoenzimas da SOD, utilizou-se o método de inibição com KCN e H₂O₂ (Ferreira *et al.* 2002). Para isto, um gel contendo apenas uma amostra foi dividido em três partes sendo cada parte revelada com um reagente diferente. A primeira parte foi revelada com a mistura de reação contendo riboflavina e NBT (conforme descrito anteriormente). A segunda parte foi incubada em solução 10 mM KCN e a terceira parte incubada em 10 mM H₂O₂ por 20 min na ausência de luz. Após este período, as partes do gel foram lavadas e incubadas na mistura de reação contendo riboflavina e NBT por 20 min. Posteriormente os géis foram expostos à luz até o aparecimento das bandas de SOD e a reação foi interrompida com uma solução 6% de ácido acético. A identificação das isoenzimas foi realizada através da exclusão de bandas, conforme representação a seguir (Figura 8):

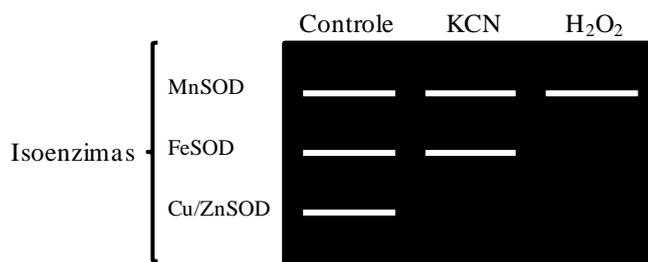


Figura 8: Representação da determinação das isoenzimas da SOD através da inibição de bandas com KCN e H₂O₂.

3.17. Quantificação de peróxido de hidrogênio e determinação da peroxidação lipídica

A quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a determinação da peroxidação lipídica foram realizadas no mesmo extrato. Raízes e cotilédones macerados (100 mg) foram homogeneizados em 1 mL de ácido tricloroacético (0,1%) e centrifugados a 15600 x g por 10 min a 4°C (Alexieva *et al.* 2001).

A avaliação do conteúdo de H₂O₂ foi realizada de acordo com Boaretto *et al.* (2014). A reação foi composta por 200 µL de extrato, 200 µL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,0) e 800 µL de iodeto de potássio (1M), incubado a 4°C por 1 hora (no escuro). O conteúdo de H₂O₂ foi determinado em espectrofotômetro a 390 nm. O resultado foi expresso em µg de H₂O₂ . g⁻¹ de massa fresca.

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada através da concentração do malondialdeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica que reage com o ácido tiobarbitúrico. O homogeneizado (250 µL) foi adicionado a 1 mL de uma solução contendo 20% de ácido tricloroacético e 0,5% de ácido tiobarbitúrico. A mistura foi incubada a 95°C por 30 minutos e centrifugada a 15600 x g por 5 min (Boaretto *et al.* 2014). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 535 e 600 nm e a concentração de MDA estimada pelo cálculo da $ABS_{535nm} - ABS_{600nm}$ com base no coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em nmol MDA. g^{-1} de massa fresca.

3.18. Localização *in situ* de NO

Para a detecção de NO, raízes e cotilédones de sementes submetidas à fumigação com ar e NO foram cortados à mão e incubados em 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,4) contendo 10 mM DAF-2DA (Sigma-Aldrich) por 15 minutos a 25°C no escuro (Sandalo *et al.* 2008). A reação do NO com DAF-2DA produz DAF-2T, que é monitorado em um microscópio de fluorescência. Posteriormente, os cortes foram lavados duas vezes com 10 mM tampão Tris-HCl (pH 7,4) por 15 minutos cada e as lâminas foram montadas. As secções foram analisadas sob filtro azul (~450-490 nm) para observação de compostos fenólicos e filtro verde (~500-560 nm) para detecção de NO, em microscópio de fluorescência Widefield (Leica DM 5500B). Neste equipamento, é possível a aquisição de uma mesma imagem nos diferentes filtros e a sobreposição das imagens de forma a distinguir a emissão de compostos fenólicos e emissão de NO. As imagens foram adquiridas e processadas neste mesmo equipamento, a partir do software Leica LAS-AF. Esta análise foi realizada nos laboratórios de Evolução e Diversidade e de Neurociências da Universidade Federal do ABC.

3.19. Análise estatística

O delineamento experimental foi totalmente casualizado. A análise estatística foi realizada com auxílio do teste t-Student, a fim de comparar o tratamento controle (Ar) com o NO para cada tempo de embebição. Os resultados dos bioensaios de atividade fitotóxica foram submetidos à análise de variância um fator (ANOVA) e ao teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do NO gasoso sobre a germinação e a morfologia de plântulas de *Sesbania virgata*

A análise da taxa de germinação de sementes de *S. virgata* indicou que a porcentagem máxima de germinação foi atingida entre 48 e 72 horas de embebição, porém não foram observadas diferenças significativas entre o tratamento com NO e o controle (Figura 9).

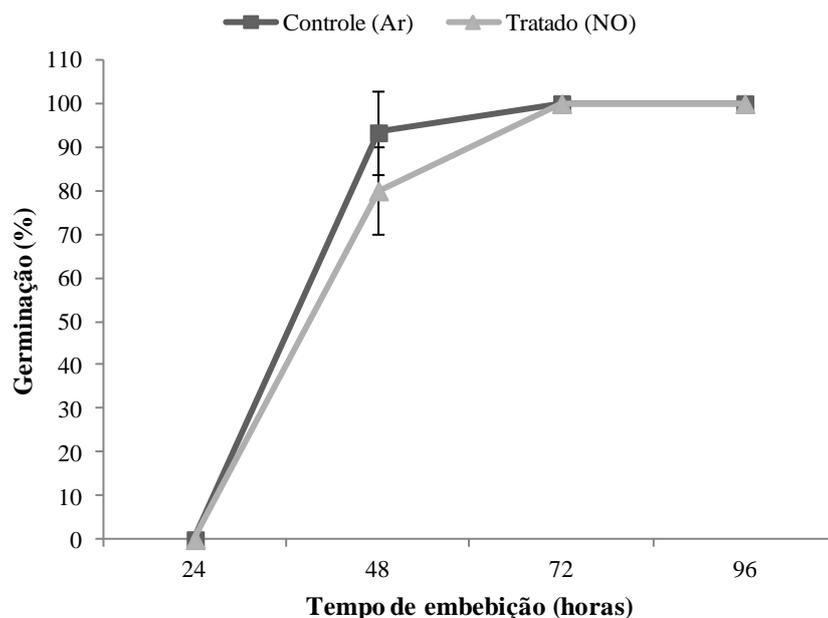


Figura 9. Taxa de germinação de sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As barras representam o desvio padrão das médias (n=4).

A fumigação com NO também não afetou o desenvolvimento das plântulas, tendo em vista o aspecto similar entre os tratamentos em relação à morfologia dos cotilédones, hipocótilo e raízes (Figura 10).

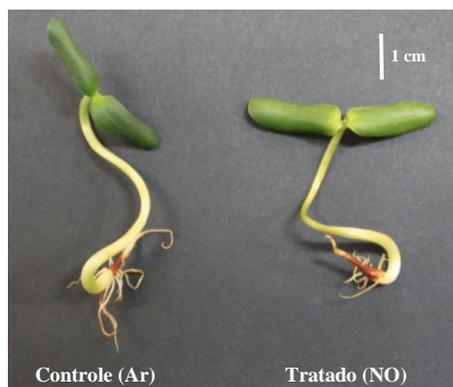


Figura 10. Morfologia de plântulas de *S. virgata* com 21 dias após a embebição. As sementes foram submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas.

4.2. NO gasoso x exsudação de metabólitos primários e secundários em *S. virgata*

Na análise do teor de proteínas exsudadas pelas sementes de *S. virgata* observou-se que a fumigação com NO não promoveu alterações em comparação com o controle, sendo detectadas quantidades similares de proteínas totais nos exsudatos durante todo o período de embebição (Figura 11). O pico de exsudação de proteínas foi observado em 48 horas de embebição.

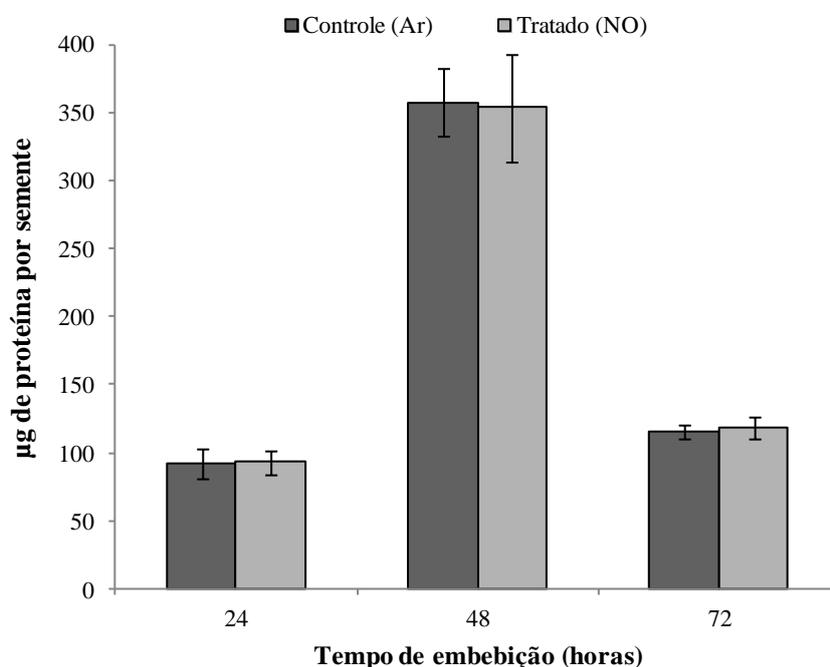


Figura 11. Quantificação do teor de proteínas totais exsudadas por sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas com exsudatos controle e tratado coletados após 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=6).

Na Figura 12, pode-se observar que o tratamento com NO não alterou a exsudação de açúcares totais em relação ao controle (Figura 12A). Quanto aos açúcares redutores, também não foram observadas diferenças significativas na exsudação destes açúcares entre sementes controle e tratadas com o NO (Figura 12B). De um modo geral houve diminuição no teor de açúcares totais e redutores exsudados ao longo do processo germinativo e pós-germinativo em ambos os tratamentos.

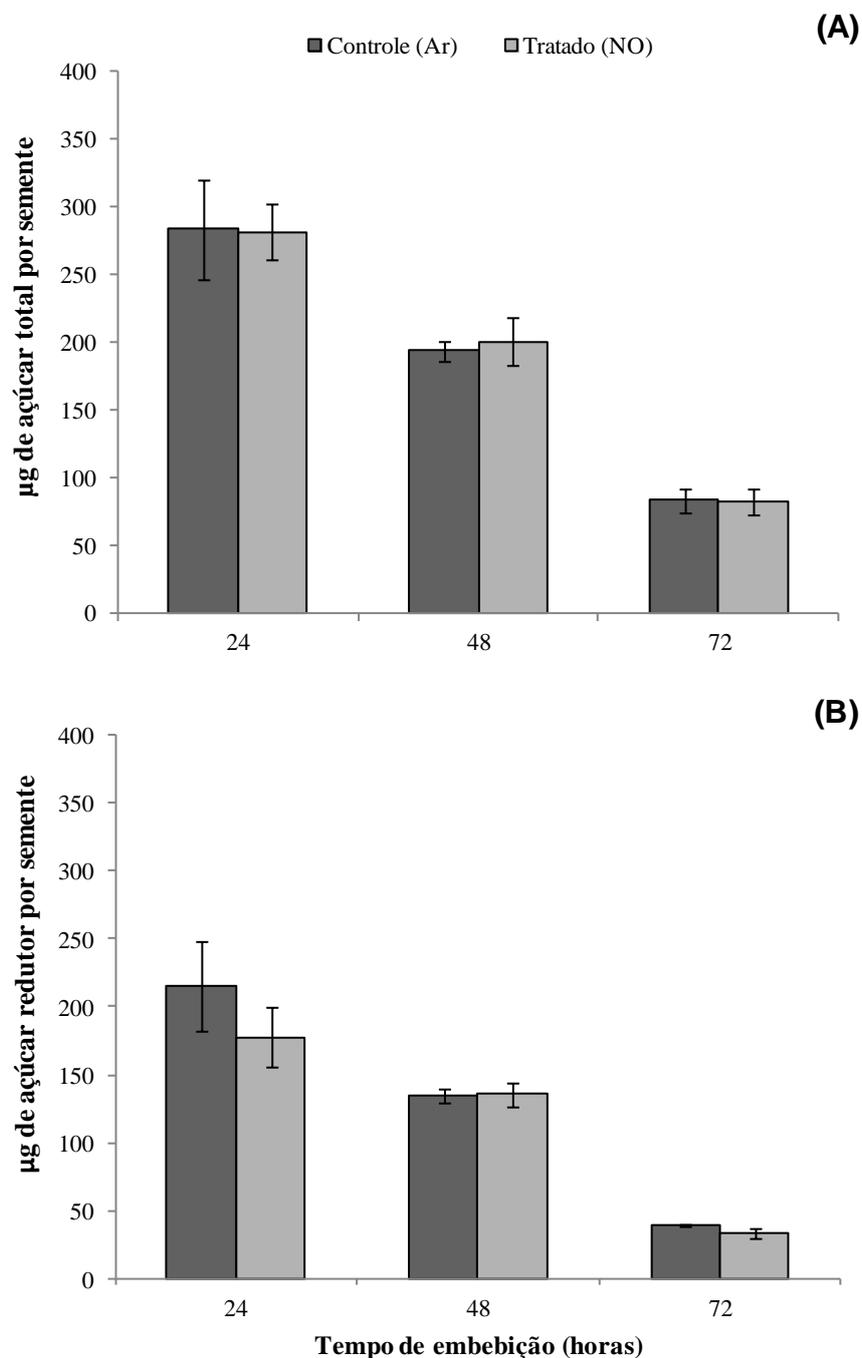


Figura 12. Quantificação de açúcares totais (A) e açúcares redutores (B) exsudados por sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas com exsudatos controle e tratado

coletados após 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=6).

A análise do conteúdo de fenóis totais indicou que em 12 e 24 horas de embebição houve uma menor exsudação deste composto por sementes tratadas com NO quando comparadas ao controle (Figura 13). Após este período, os exsudatos controle e tratado com NO apresentaram valores similares de fenóis totais. Quando analisamos o perfil geral da exsudação destes compostos, verificamos que ocorre uma maior exsudação entre o início da embebição e a germinação (48 horas), e que posteriormente há uma redução drástica no conteúdo de fenóis.

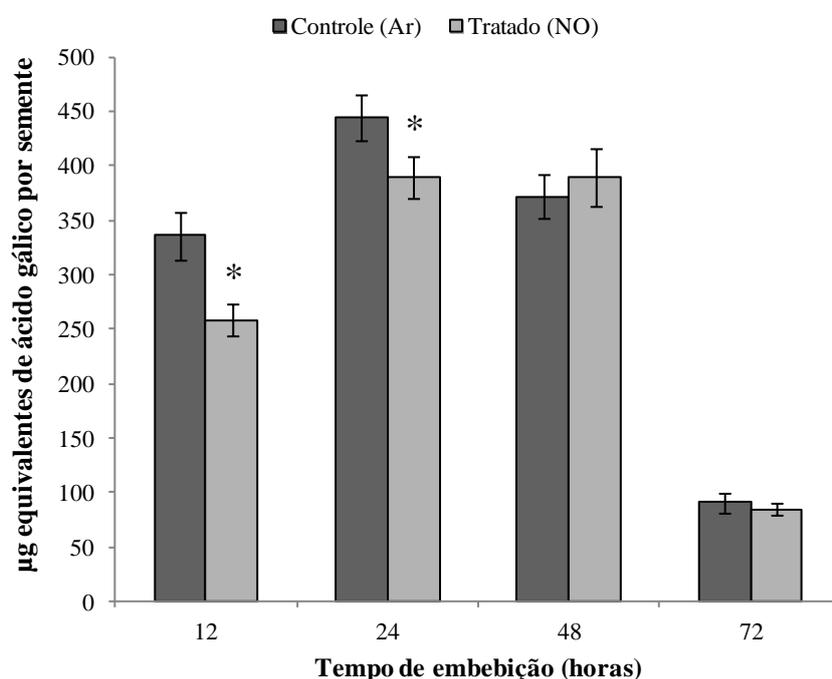


Figura 13. Quantificação de fenóis totais exsudados por sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas com exsudatos controle e tratado coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=6). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, $P < 0,05$).

Em relação aos flavonoides totais, a comparação entre os exsudatos de sementes fumigadas com ar e NO não indicou diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do período analisado (Figura 14). A análise do perfil de exsudação de flavonoides totais apresentou um pico em 24 horas de embebição, seguido por uma redução em seu conteúdo em 48 horas.

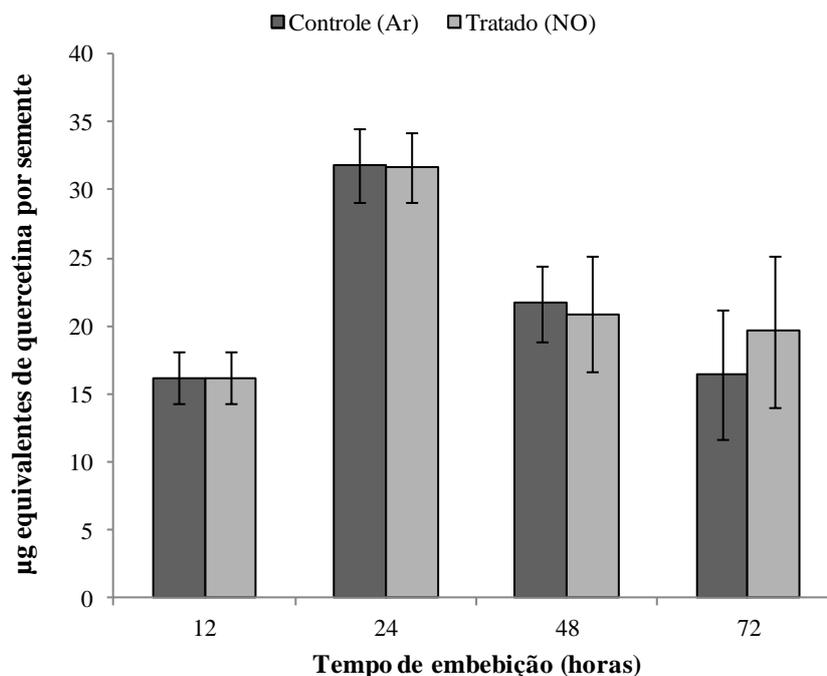


Figura 14. Quantificação de flavonoides totais exsudados por sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas com exsudatos controle e tratado coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=6).

A análise de taninos condensados indicou uma diminuição significativa nos níveis desta classe de compostos nos exsudatos de sementes fumigadas com NO em 12 e 24 horas de embebição (Figura 15). Tendo em vista que neste método, tanto as catequinas quanto os dímeros e trímeros de catequina reagem com a vanilina-clorídrica, a diminuição observada se deve provavelmente à queda no teor de catequina, composto exsudado em grandes quantidades pelas sementes de *S. virgata* (Simões 2008). Contudo, o tratamento com NO também promoveu um aumento na exsudação de taninos em 48 horas. Se analisarmos o perfil de exsudação de taninos condensados ao longo da embebição, em sementes controle observamos um pico em 24 horas seguido por uma redução em seu conteúdo durante o período avaliado, sendo que no tratamento com NO esse pico aparece apenas em 48 horas. Além disso, a partir de 96 horas os taninos/catequina não foram detectados nos exsudatos pela dosagem colorimétrica, indicando que a exsudação desses compostos cessou tanto no tratamento com NO como no controle (dados não mostrados).

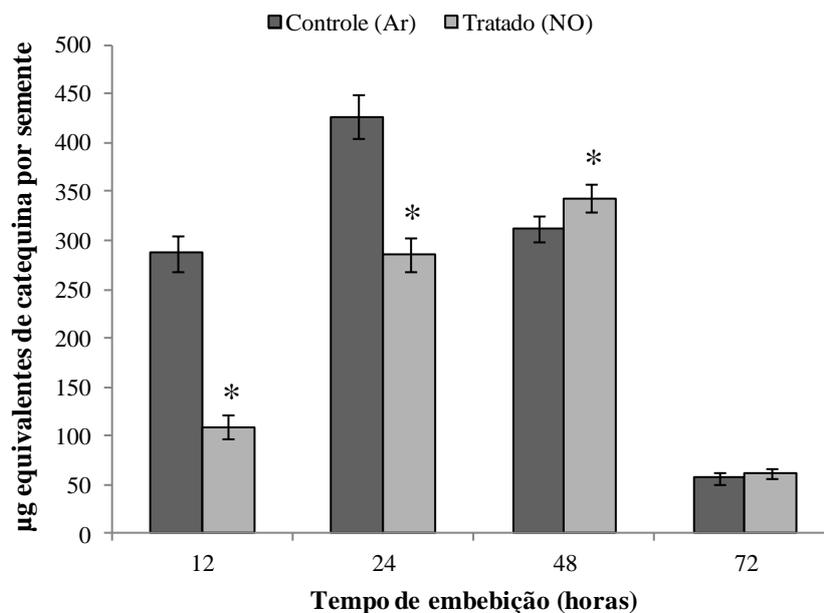


Figura 15. Quantificação de taninos condensados exsudados por sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas com exsudatos controle e tratado coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=8). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, $P < 0,05$).

Análises realizadas por CLAE indicaram a diminuição no teor de catequina exsudada pelas sementes fumigadas com NO em 12 e 24 horas de embebição (Figura 16), confirmando os dados da dosagem colorimétrica de taninos condensados. Em 48 horas, observou-se um aumento no conteúdo de catequina exsudada pelas sementes tratadas com NO em relação ao controle, também de modo similar ao observado nas análises de taninos condensados. Além disso, quando analisamos o perfil geral da catequina verificamos que ambos os tratamentos apresentam um pico de exsudação desse composto em 24 horas seguido por uma redução em seu conteúdo ao longo do período avaliado.

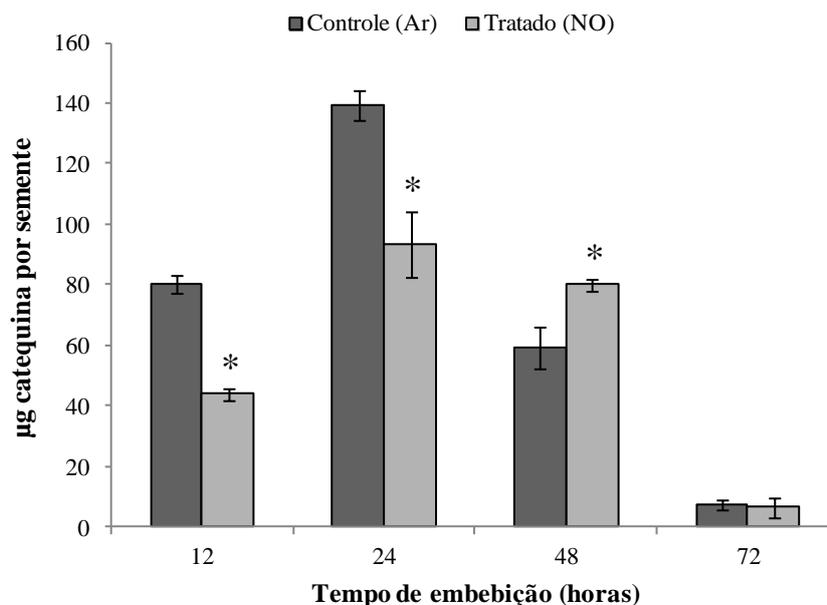


Figura 16. Quantificação de catequina presente em exsudatos de sementes de *S. virgata* submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. Os exsudatos controle e tratado foram coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição e submetidos a partição com acetato de etila. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a catequina foi detectada e quantificada utilizando padrão comercial. As barras representam o desvio padrão das médias (n=4). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, $P < 0,05$).

Tendo em vista a alteração nos teores de catequina, segundo identificação por CLAE pela comparação com o tempo de retenção do padrão comercial, realizou-se a análise dos exsudatos por CG-EM, que permitiu a identificação específica da catequina baseada no padrão de fragmentação de íons desse composto, possibilitando assim a confirmação da presença de catequina nos exsudatos. A proporção relativa da catequina também indicou uma diminuição no tratamento com NO em 12 e 24 horas de embebição e uma tendência de aumento em 48 horas (Figura 17).

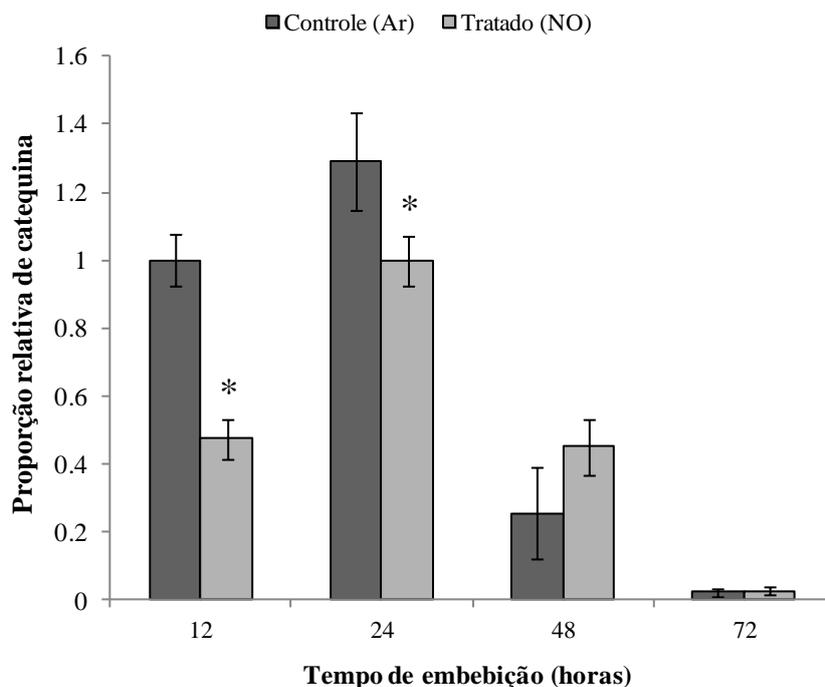


Figura 17. Proporção relativa de catequina presente em exsudatos de sementes de *S. virgata*. As sementes foram submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. Os exsudatos controle e tratado foram coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição e submetidos a partição com acetato de etila. As análises foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM). Todos os valores foram normalizados para o controle (Ar) com 12 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, $P < 0,05$).

Além da quantificação de catequina, a análise por CLAE em outro comprimento de onda (254 nm) foi empregada visando detectar eventuais diferenças no perfil de exsudação de outros flavonoides. Os perfis cromatográficos foram semelhantes para os exsudatos controle e tratado com NO quando comparamos o mesmo tempo de embebição (Figura 18). Também é possível observar que a intensidade dos picos (mVolts) foi bastante similar entre os tratamentos. Além disso, a análise dos exsudatos controle e tratado por CG-EM não indicou alterações no perfil de outros compostos (dados não mostrados).

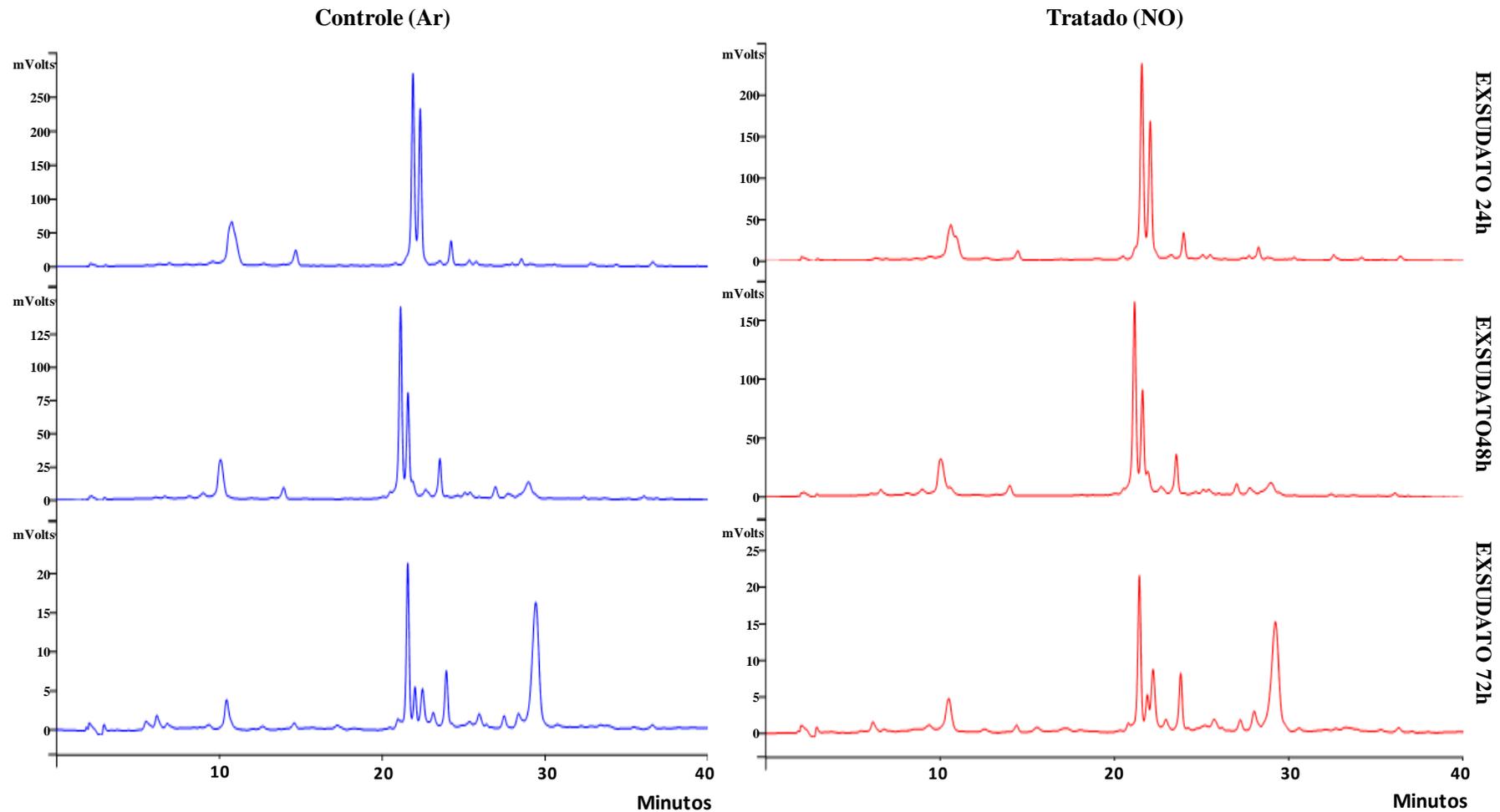


Figura 18. Perfis cromatográficos obtidos por CLAE ($\lambda = 254 \text{ nm}$) dos exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. Os exsudatos controle e tratado foram coletados após 24, 48 e 72 horas de embebição e submetidos a partição com acetato de etila. A separação foi realizada em gradiente linear com água e acetonitrila acidificados com 0,1% de ácido acético (10% a 35 % acetonitrila, vazão de $0,8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$).

4.3. NO exógeno x conteúdo de catequina

O menor conteúdo de catequina observado em 12 e 24 horas nas sementes de *S. virgata* fumigadas com NO sugere: i) diminuição da síntese de catequina pelo NO ou; ii) degradação da catequina durante o processo de fumigação; ou iii) reação da catequina com NO. Para testar as hipóteses acima, procedeu-se primeiramente à dosagem de catequina nos exsudatos previamente liberados e coletados de sementes e fumigados isoladamente, na ausência de sementes, com ar comprimido e NO gasoso. Foram analisados exsudatos fumigados na presença e ausência de luz, tendo em vista que a catequina é um composto fotossensível, e que a luz poderia estimular a degradação desse composto.

A análise da catequina presente nestes exsudatos mostrou que o tratamento com NO reduziu drasticamente seu conteúdo nos exsudatos de 24 horas de embebição, independente da presença ou ausência de luz (Figura 19). Em 48 horas, houve uma diminuição no conteúdo de catequina no tratamento com NO apenas quando fumigado na presença de luz.

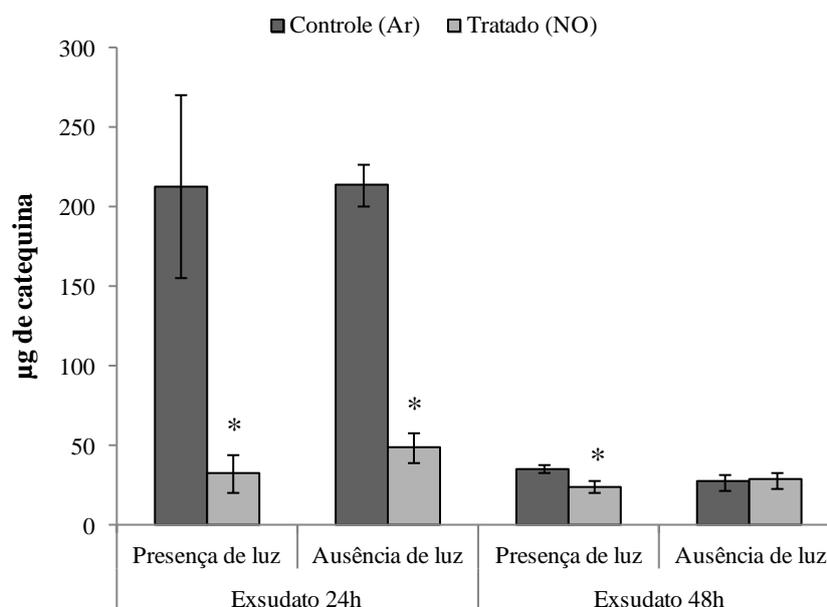


Figura 19. Quantificação de catequina presente em exsudatos de *S. virgata* submetidos a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas na presença ou ausência de luz. Os exsudatos de 24 e 48 horas de embebição foram primeiramente coletados e apenas depois submetidos a fumigação (concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$). As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a catequina foi detectada e quantificada utilizando padrão comercial. As barras representam o desvio padrão das médias ($n=3$). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com exsudatos do mesmo período e influência da luz (teste t-Student, $P<0,05$).

Visando confirmar esses resultados, processo semelhante de fumigação foi realizado com catequina comercial na presença ou ausência da luz durante o período de fumigação. A análise de catequina por CLAE indicou uma diminuição significativa nos níveis de catequina

comercial nas placas fumigadas com NO (Figura 20), assim como verificado para os exsudatos fumigados. A comparação da fumigação na presença e na ausência de luz indicou um perfil semelhante, indicando que a luz não é responsável pela diminuição nos teores de catequina observada na presença do NO gasoso. Além disso, a diminuição dos teores de catequina no padrão comercial fumigado indicam que não houve alteração na síntese desse composto.

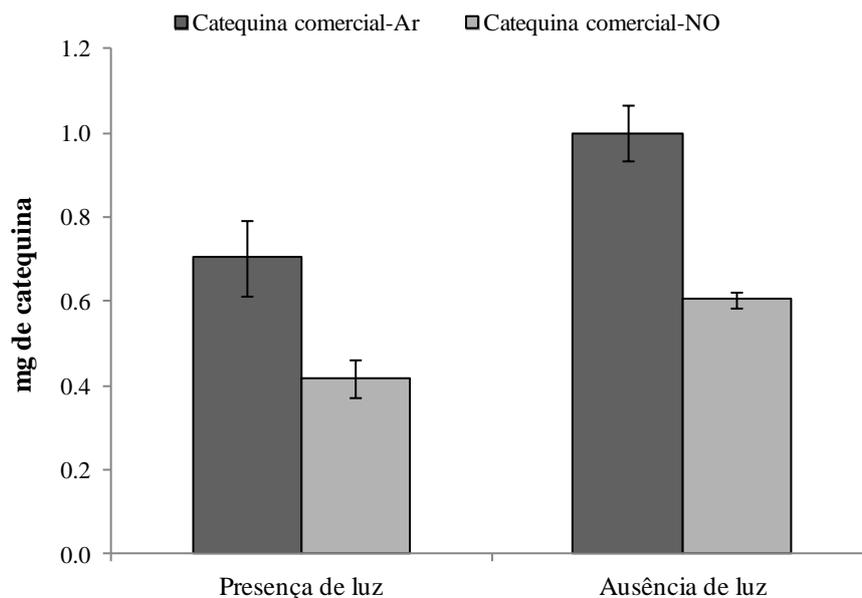


Figura 20. Quantificação de catequina presente no padrão de catequina comercial submetido a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas na presença ou ausência de luz. O material foi coletado após a fumigação e as análises realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos em relação à fumigação com ar e NO e influência da luz (teste t-Student, $P < 0,05$).

Exsudatos controle e tratado com maior teor de catequina (24 horas de embebição), assim como a catequina comercial, foram analisados em relação à capacidade destas amostras em sequestrar o NO *in vitro*. Os resultados indicam que tanto a catequina comercial quanto os exsudatos apresentam capacidade de sequestro de NO. O exsudato controle, que não teve contato com o gás NO durante o processo de fumigação, e a catequina comercial (25,8 nmol . mL⁻¹), possuem uma capacidade semelhante de sequestrar o NO disponível na solução saturada, de 20,1 e 23,8%, respectivamente. Já o exsudato tratado, no qual parte das moléculas de catequina já estaria ligada ao NO pelo processo de fumigação ou que estaria oxidada e o composto formado não teria capacidade de sequestro, apresentou uma menor capacidade de sequestro de NO *in vitro* (3,8%) (Tabela 1). Além disso, pode-se observar que

a capacidade de sequestro de NO da catequina comercial aumenta com o incremento da concentração desse composto, porém concentrações muito elevadas (86,1 nmol . mL⁻¹) passam a ter um efeito inibitório sobre o sequestro de NO.

Tabela 1. Potencial de sequestro da catequina comercial e de exsudatos de *S. virgata* em sequestrar o NO. As sementes foram submetidas a fumigação com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas e os exsudatos coletados após 24 horas de embebição. A análise foi realizada utilizando uma solução saturada de NO (aproximadamente 1,7 mmol . L⁻¹) e o sequestro do NO quantificado utilizando o sensor eletroquímico ISO-NOP conectado ao analisador de radical livre (Apollo 4000). Os valores representam a média de três repetições.

Tratamento	Conteúdo de catequina (nmol)	Sequestro de NO (%)
Catequina comercial	8,6	-0,5
	17,2	13,1
	25,8	23,8
	86,1	7,7
Exsudato controle (Ar - 24h)	28,9	20,1
Exsudato tratado (NO - 24h)	20,7	3,8

4.3. Ligação NO-catequina e o potencial alelopático e antifúngico dos exsudatos de *S. virgata*

A análise do efeito do NO sobre a fitotoxicidade dos exsudatos de *S. virgata* foi realizada em duas espécies-alvo: *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*. Estas espécies foram selecionadas tendo em vista estudo prévio realizado por Simões *et al.* (2008) com exsudatos de *S. virgata* e devido à capacidade invasora de *S. virgata* em plantações de arroz alagado (Kissmann & Groth 1999).

No bioensaio com plântulas de *A. thaliana*, após 7 dias de crescimento, foi possível verificar alterações morfológicas visíveis nas raízes na presença de catequina comercial e de exsudatos obtidos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar e NO gasoso (Figura 21). Além de um escurecimento nas raízes, verificou-se uma redução no tamanho das raízes e na quantidade de raízes laterais no tratamento com exsudatos e na catequina comercial (50 µg . µL⁻¹). Os exsudatos também afetaram o desenvolvimento da parte aérea em relação ao controle com metanol.

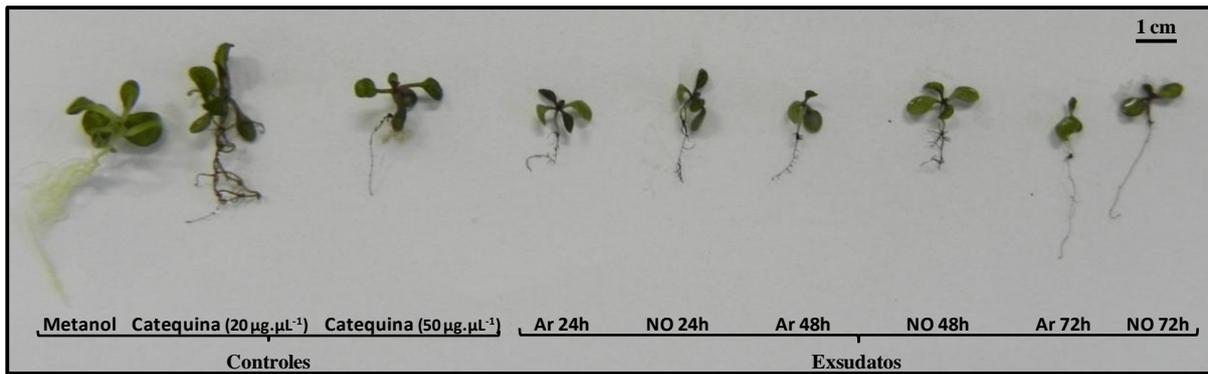


Figura 21. Fitotoxicidade de (+)-catequina comercial e de exsudatos brutos de *S. virgata* sob plântulas de *A. thaliana* após 7 dias de tratamento. Os exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas foram coletados após 24, 48 e 72 horas de embebição. Estes exsudatos brutos foram aplicados sob as plântulas de *A. thaliana* na concentração de $50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

Estas diferenças visíveis foram confirmadas pelas análises de comprimento e massa dos tecidos (Tabela 2). Os efeitos promovidos pelos exsudatos no comprimento da raiz foram semelhantes ao observado para a maior concentração da catequina comercial utilizada ($50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Efeito similar foi verificado para o comprimento da parte aérea, onde o tratamento com exsudatos promoveu uma redução no comprimento assim como verificado para a catequina comercial ($50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). No entanto, os tratamentos com exsudatos obtidos de sementes controle e fumigadas com NO, em diferentes períodos de embebição, tiveram efeitos similares sobre o comprimento da raiz e da parte aérea de plântulas de *A. thaliana*.

Em relação à massa seca da parte aérea de *A. thaliana*, verificou-se uma diminuição neste parâmetro nos tratamentos com catequina comercial e exsudatos de *S. virgata* quando comparados ao controle em metanol. Além disso, um efeito mais acentuado dos exsudatos sobre o desenvolvimento da parte aérea das plântulas pôde ser observado em relação à catequina comercial. Entretanto, não houve diferença significativa entre os danos causados pelos exsudatos controle e tratado sobre o acúmulo de massa seca da parte aérea. Em raízes de *A. thaliana*, a massa seca foi menor nos tratamentos com catequina e exsudatos, sendo que os exsudatos promoveram efeitos semelhantes aos da maior concentração de catequina comercial ($50 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). No tratamento com exsudatos, os menores valores de massa foram observados nos exsudatos controle com 24 horas de embebição e nos exsudatos tratados com NO em 48 e 72 horas.

Tabela 2. Comprimento e massa seca da parte aérea (PA) e da raiz de plântulas de *A. thaliana* cultivadas durante 7 dias em meio MS líquido contendo (+)-catequina comercial e exsudatos brutos de *S. virgata*. Os exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas foram coletados após 24, 48 e 72 horas de embebição. Estes exsudatos brutos foram aplicados sob as plântulas de *A. thaliana* na concentração de 50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ e a catequina comercial na concentração de 20 e 50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. As barras indicam o desvio padrão das médias (n=3). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste a posteriori Tukey, P<0,05).

	Tratamento	Comprimento (mm)		Massa seca (mg)		
		PA	Raiz	PA	Raiz*	
Controles	Metanol	6.70 \pm 1.06a	30.43 \pm 3.6a	3.74 \pm 0.73a	1.475	
	Catequina comercial (20 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	6.22 \pm 1.09a	14.38 \pm 2.13b	2.38 \pm 0.58b	0.690	
	Catequina comercial (50 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	5.82 \pm 1.47ab	11.36 \pm 2.38bc	2.22 \pm 0.46b	0.073	
Exsudatos		24 horas	4.89 \pm 0.60b	10.55 \pm 2.66c	0.97 \pm 0.22c	0.036
	Controle (Ar)	48 horas	4.58 \pm 0.79b	9.25 \pm 1.76c	0.84 \pm 0.17c	0.050
		72 horas	4.13 \pm 0.35b	11.38 \pm 2.56bc	1.1 \pm 0.28c	0.088
			24 horas	4.36 \pm 0.50b	9.91 \pm 2.66c	0.98 \pm 0.42c
	Tratado (NO)	48 horas	4.44 \pm 0.53b	10.1 \pm 2.96c	0.94 \pm 0.18c	0.027
		72 horas	4.56 \pm 0.53b	9.33 \pm 2.12c	0.98 \pm 0.23c	0.030

* As raízes de plântulas de *A. thaliana* foram pesadas em conjunto para a determinação da massa seca devido ao efeito drástico dos tratamentos sobre as raízes.

A análise morfológica de plântulas de *O. sativa* após o 6º dia de crescimento mostrou uma redução no desenvolvimento de raízes em sementes tratadas com exsudatos de *S. virgata*, sendo que as sementes tratadas com catequina comercial apresentaram uma morfologia semelhante ao do controle em água (Figura 22). Os exsudatos de 12 horas de embebição apresentaram um efeito mais drástico, sendo que as plântulas de arroz tratadas com exsudatos de 24, 48 e 72 horas desenvolveram raízes laterais. Em relação a parte aérea, todos os tratamentos apresentaram uma morfologia similar. Não foram observadas diferenças morfológicas entre as plântulas crescidas na presença de exsudatos controle ou fumigados com NO.



Figura 22. Efeito de (+)-catequina comercial e exsudatos brutos de *S. virgata* sob o desenvolvimento inicial de plântulas de *O. sativa* após 6 dias de tratamento. Os exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas foram coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. A catequina comercial e os exsudatos brutos foram aplicados na concentração de $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Para a análise dos parâmetros de desenvolvimento, além da catequina comercial, foram adicionados como controle a catequina comercial fumigada com ar comprimido ou gás NO. O comprimento da parte aérea não foi alterado pelo tratamento com exsudatos e catequina comercial em relação ao controle com água (Tabela 3). No entanto, ao analisar o comprimento da raiz observamos que o tratamento com a catequina comercial promoveu um maior crescimento em relação aos controles em água e com catequina comercial fumigada. Os exsudatos diminuíram significativamente o crescimento radicular das plântulas de arroz, no entanto não houve diferença significativa entre os exsudatos obtidos de sementes fumigadas com ar comprimido ou NO de um mesmo período de embebição. Apesar disso, a análise dos exsudatos de diferentes dias de embebição sobre o comprimento radicular indicou que os exsudatos de 12 horas promoveram o efeito mais drástico, os exsudatos de 24 e 48 horas

tiveram um efeito similar, enquanto que o exsudato de 72 horas promoveu a menor inibição do crescimento radicular.

Na análise da massa seca da parte aérea não houve diferenças significativas entre os tratamentos e os controles, assim como observado para o comprimento da parte aérea (Tabela 3). Nas raízes, o tratamento com catequina não afetou o acúmulo de massa seca. Já o tratamento com exsudatos promoveu redução significativa da massa seca das raízes em relação aos controles com água e catequinas (comercial e fumigada), contudo sem diferenças entre os exsudatos fumigados com ar comprimido ou NO.

Tabela 3. Comprimento e massa seca da parte aérea (PA) e da raiz de plântulas de *O. sativa* após 6 dias de tratamento com catequina e exsudatos de *S. virgata*. Os exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas foram coletados após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As sementes de *O. sativa* foram germinadas em água, catequina comercial e fumigada (1 mg . mL⁻¹) e exsudatos (1 mg . mL⁻¹). As barras indicam o desvio padrão das médias (n=6). Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas (ANOVA, teste a posteriori Tukey, P<0,05).

Tratamento		Comprimento (mm)		Massa seca (mg)		
		PA	Raiz	PA	Raiz	
Controles	Água	27.21 ± 4.78a	46.18 ± 5.82b	1.16 ± 0.13a	1.53 ± 0.10a	
	Catequina comercial	28.61 ± 4.37a	55.65 ± 5.73a	1.15 ± 0.10a	1.64 ± 0.14a	
	Catequina-Ar	24.88 ± 6.52a	51.65 ± 7.41ab	1.11 ± 0.17a	1.63 ± 0.34a	
	Catequina-NO	24.93 ± 3.60a	50.89 ± 9.32ab	1.05 ± 0.08a	1.62 ± 0.05a	
Exsudatos	Controle (Ar)	12 horas	25.08 ± 4.97a	11.26 ± 2.62c	1.12 ± 0.09a	0.63 ± 0.21b
		24 horas	24.78 ± 3.79a	18.13 ± 5.08d	1.21 ± 0.04a	0.79 ± 0.21b
		48 horas	24.59 ± 3.85a	15.58 ± 4.12d	1.19 ± 0.07a	0.81 ± 0.12b
		72 horas	25.4 ± 5.33a	25.8 ± 4.93e	1.18 ± 0.05a	1.04 ± 0.20b
	Tratado (NO)	12 horas	25.46 ± 3.69a	13.05 ± 4.35cd	1.20 ± 0.09a	0.69 ± 0.18b
		24 horas	25.54 ± 3.84a	18.41 ± 4.64d	1.23 ± 0.06a	0.87 ± 0.08b
		48 horas	22.82 ± 4.69a	15.47 ± 2.65d	1.14 ± 0.04a	0.77 ± 0.05b
		72 horas	24.23 ± 4.60a	27.03 ± 4.70e	1.22 ± 0.20a	1.03 ± 0.31b

A análise de bioautografia possibilitou a detecção de substâncias antifúngicas em extratos obtidos pela partição com acetato de etila de exsudatos de sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido e NO (Figura 23). Na maioria das amostras foi verificada a presença de três halos de inibição do crescimento fúngico ($R_f=0,45$; $R_f=0,64$; $R_f=0,84$), sendo que nos exsudatos de 72 horas um quarto halo de inibição pôde ser observado ($R_f=0,74$). O tratamento com NO aparentemente diminuiu a atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioides* em exsudatos de 24 e 48 horas, sendo que em 24 horas o exsudato tratado com NO apresentou apenas dois halos de inibição antifúngica. Entretanto, em 72 horas a substância com R_f de 0,74 apresentou uma maior atividade inibidora do fungo no tratamento com NO, sugerindo que o NO tenha promovido um aumento da substância que foi exsudada apenas neste período de embebição. Já a análise desta cromatoplaca em luz ultravioleta (UV), indicou que as substâncias antifúngicas observadas pelos halos de inibição não absorvem nesse comprimento de onda (dados não mostrados).

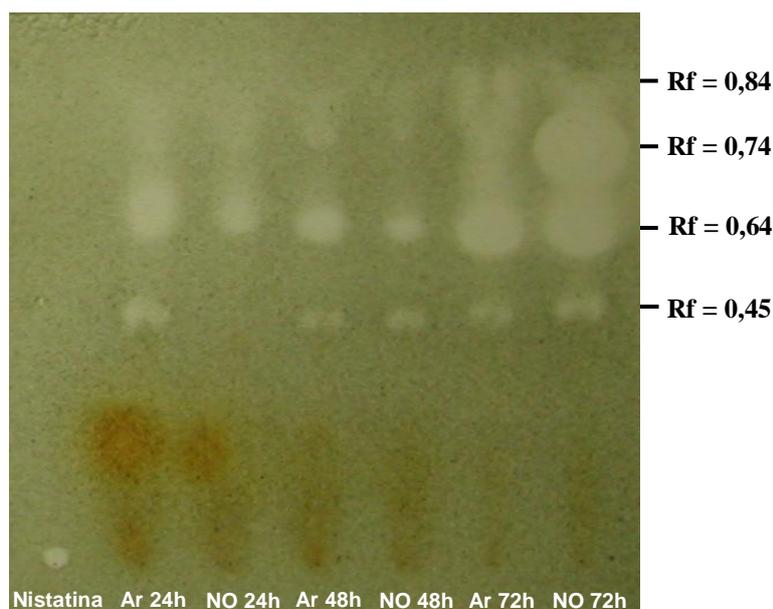


Figura 23. Bioautografia em camada delgada em placa de sílica-gel de exsudatos de *S. virgata* submetidos a partição com acetato de etila. Os exsudatos foram coletados de sementes fumigadas com ar (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas em diferentes períodos de embebição (24, 48 e 72 horas). As placas foram desenvolvidas em clorofórmio: metanol (8:2 v/v). A bioautografia foi realizada com esporos do fungo *C. cladosporioides* e as zonas claras correspondem à inibição do crescimento do fungo.

4.4. NO exógeno x defesas antioxidantes de *S. virgata*

A análise da emissão de NO em raízes e em sementes sem raízes, por fluorimetria, indicou uma maior concentração de NO em 72 horas de embebição, porém sem diferenças

entre os tratamentos (Figura 24A e 24B), sendo que os teores de NO foram em média cinco vezes mais elevados em raízes do que em sementes.

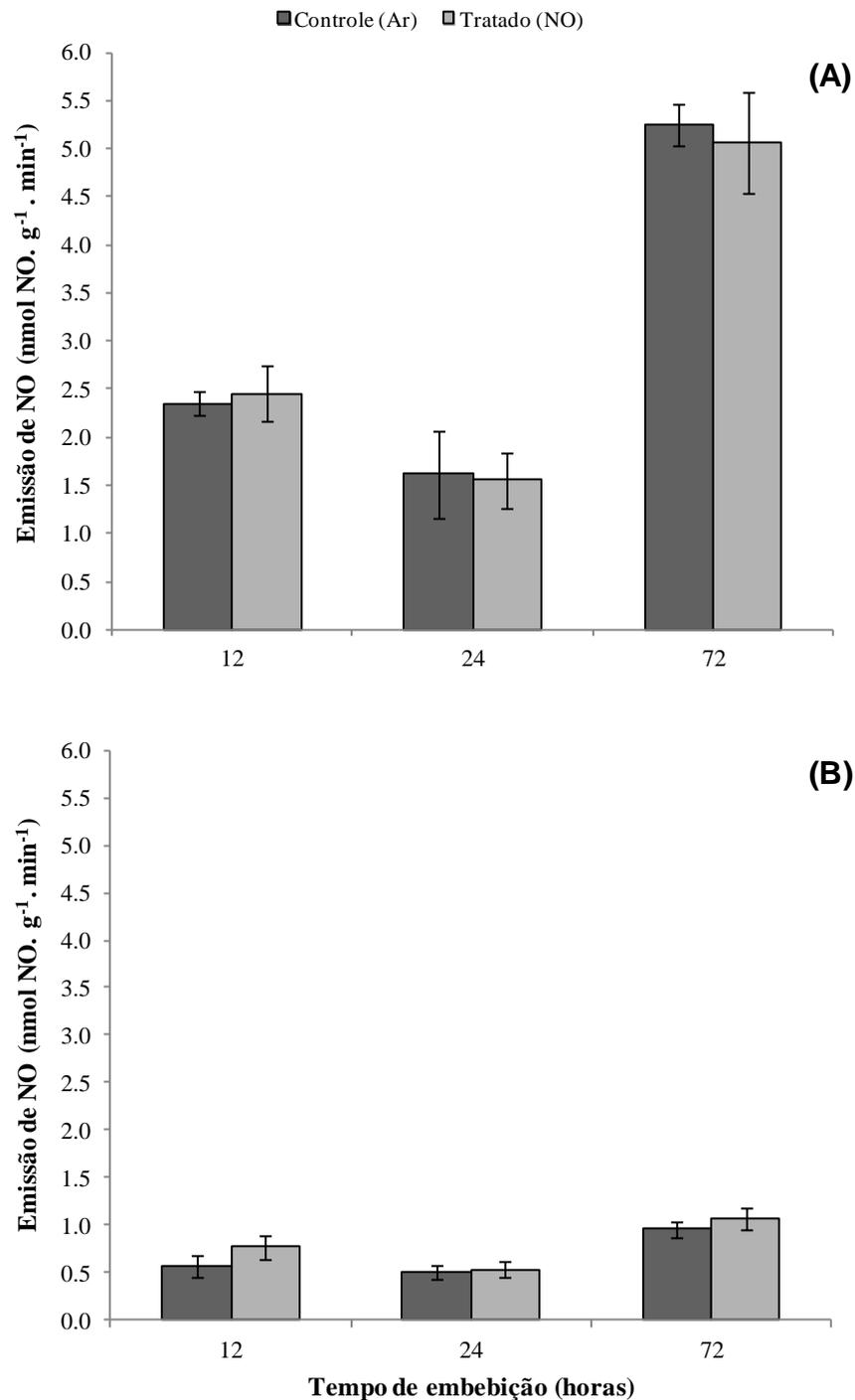


Figura 24. Quantificação da emissão de NO em sementes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas em raízes (A) e em sementes sem raízes (B) após 12, 24 e 72 horas de embebição. Os dados correspondem ao valor máximo de emissão de NO obtido no comprimento de onda (λ) 515 nm. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3).

A localização celular do NO endógeno foi analisada por microscopia de fluorescência utilizando o marcador fluorescente DAF-2 DA, em secções transversais das raízes após 12, 24, 48 e 72 horas (Figura 25). Nos cortes transversais da raiz primária, uma fluorescência verde mais intensa foi observada na epiderme e nas células do cilindro vascular especialmente em 12 e 24 horas, indicando maior conteúdo de NO no início do processo de embebição. Posteriormente, em 48 e 72 horas foi possível observar maior fluorescência na epiderme e nas paredes das células do córtex, sendo que em 72 horas também se verificou maior fluorescência nas células câmbio e do protoxilema. No entanto, não foram observadas diferenças entre as raízes de sementes controle e tratadas com NO.

Em cotilédones, a localização celular do NO endógeno indicou fraca fluorescência verde (Figura 26), sendo que a fluorescência azul, que corresponde à presença de compostos fenólicos, foi muito intensa (dados não mostrados). Uma maior fluorescência verde correspondente à presença de NO foi verificada apenas na epiderme, independente do período de embebição. Além disso, não foram observadas diferenças em relação à localização do NO entre o controle e tratamento com NO.

Os dados de localização *in situ* do NO confirmam os dados de quantificação *in vitro*, com teores similares de NO nos tecidos de sementes fumigadas com NO ou ar comprimido (controle).

Para avaliar o efeito de um eventual estresse nitrosativo provocado pela fumigação com NO analisou-se a atividade da enzima S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) em raízes e cotilédones.

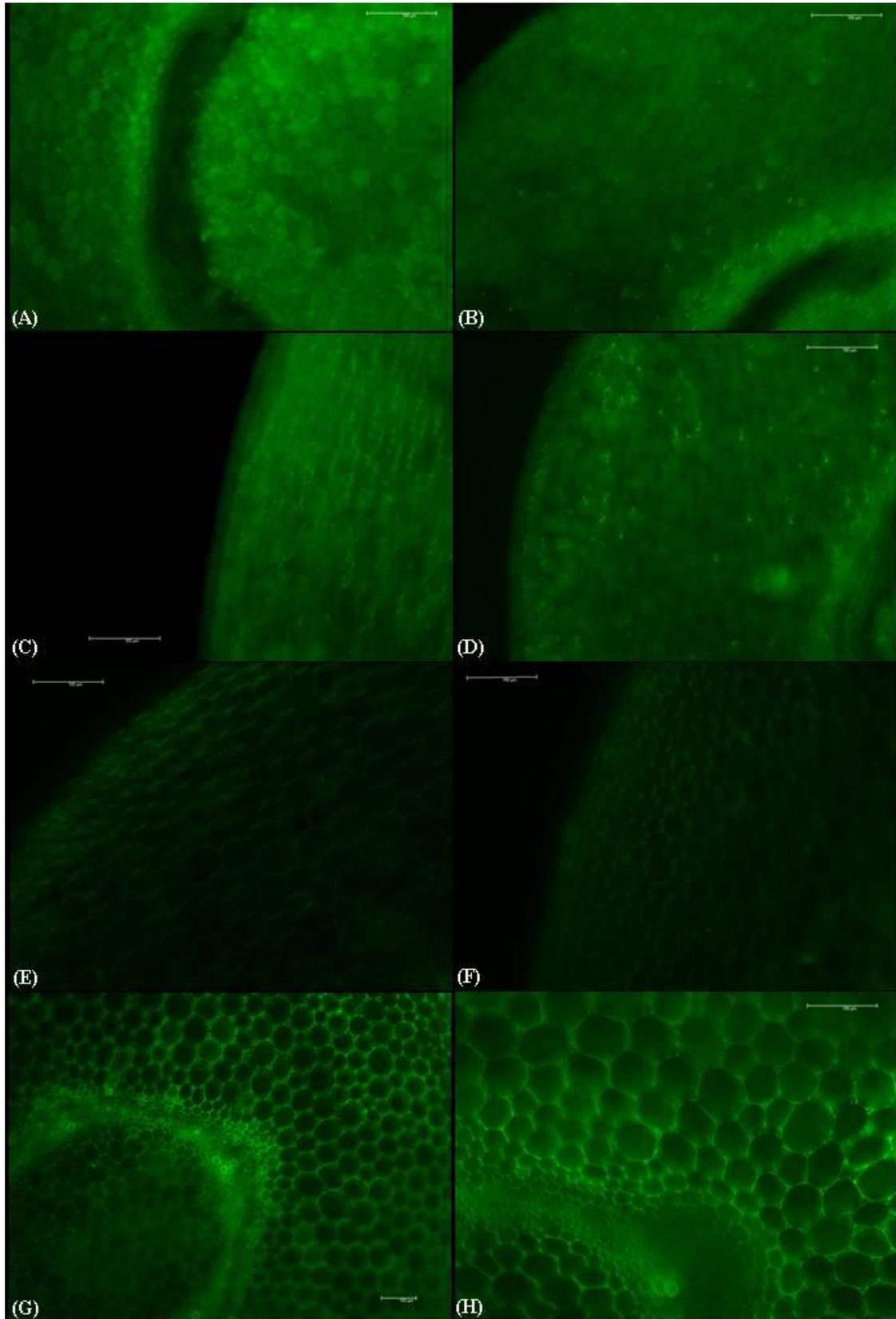


Figura 25. Localização *in situ* do NO em raízes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (tratado) (60 ppm) por 12 horas. Raízes controle com 12 horas (A), 24 horas (C), 48 horas (E) e 72 horas (G); e raízes tratadas com 12 horas (B), 24 horas (D), 48 horas (F) e 72 horas (H).

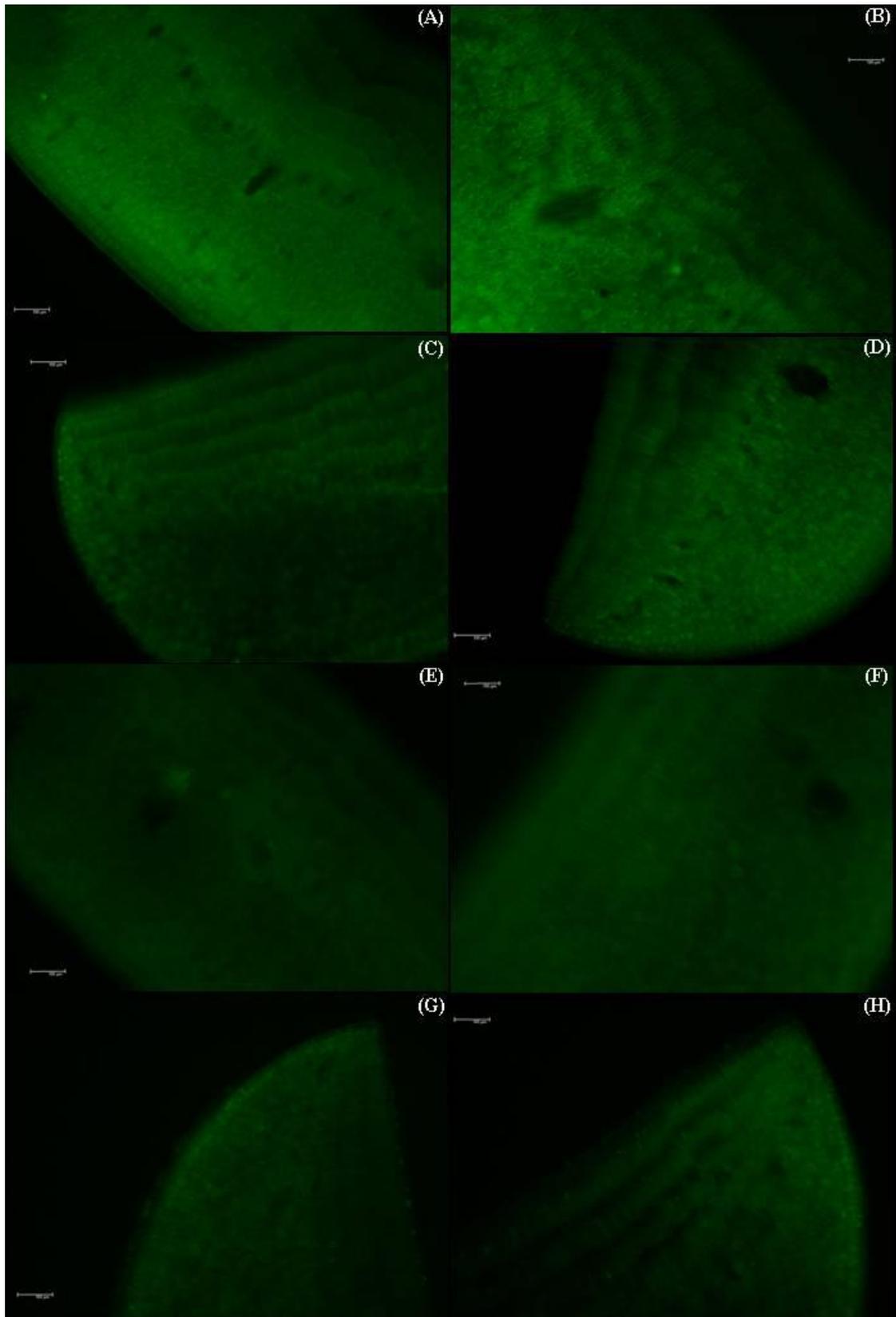


Figura 26. Localização *in situ* do NO em cotilédones de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (tratado) (60 ppm) por 12 horas. Cotilédones controle com 12 horas (A), 24 horas (C), 48 horas (E) e 72 horas (G); e raízes tratadas com 12 horas (B), 24 horas (D), 48 horas (F) e 72 horas (H).

Em raízes, verificou-se um aumento da atividade GSNOR ao longo do período avaliado, porém sem diferenças significativas entre o controle e o tratamento com NO (Figura 27A).

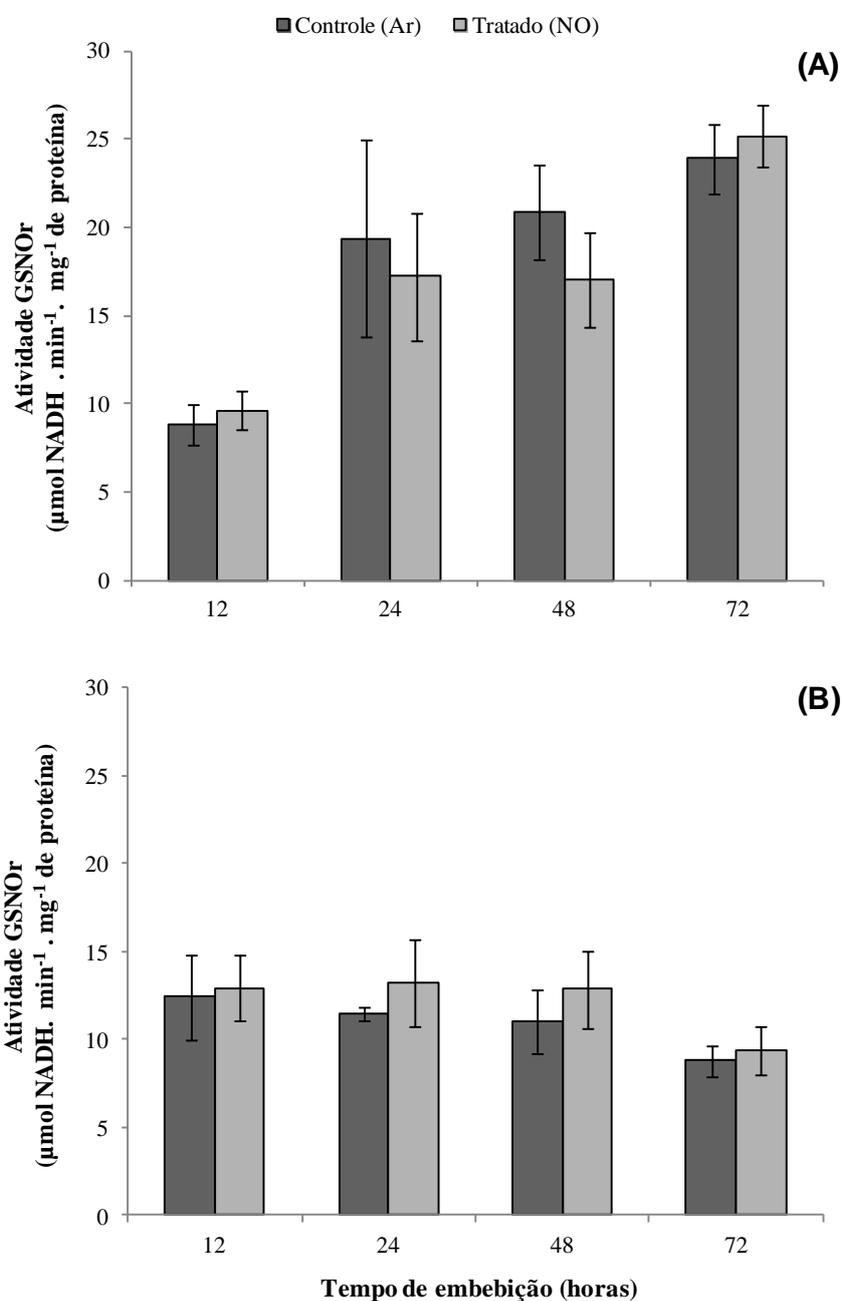


Figura 27. Atividade da enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) em raízes (A) e em cotilédones (B) de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas em raízes e cotilédones coletados com 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3).

Em cotilédones, a atividade GSNOR manteve-se constante até 48 horas, e apresentou pequena redução em 72 horas de embebição. No entanto, não foram observadas diferenças

significativas entre os tratamentos (Figura 27B). De modo geral as raízes apresentam maior atividade para esta enzima do que os cotilédones, o que corrobora com o maior teor de NO quantificado nesse tecido.

Para verificar se o NO afeta o sistema antioxidante de *S. virgata* procedeu-se à análise de atividade de algumas enzimas antioxidantes em raízes e cotilédones isolados de sementes fumigadas com ar e NO gasoso.

A análise destas enzimas em raízes indicou que o tratamento com NO promoveu um aumento significativo na atividade da enzima ascorbato peroxidase (APx) em 48 e 72 horas de embebição (Figura 28A). Além disso, podemos observar que a atividade da APx aumentou ao longo da embebição em ambos os tratamentos. A atividade da enzima catalase (CAT) apresentou pequenas variações ao longo da embebição, sem diferenças significativas entre os tratamentos (Figura 28B).

A atividade da glutathiona redutase (GR) diminuiu significativamente no tratamento com NO em 72 horas de embebição (Figura 28C). Esta enzima apresentou maior atividade em 24 horas e após este período diminuiu gradativamente em ambos os tratamentos. A enzima superóxido dismutase (SOD) teve um perfil semelhante no controle e no tratamento com NO, com maior atividade em 24 e 48 horas de embebição (Figura 28D).

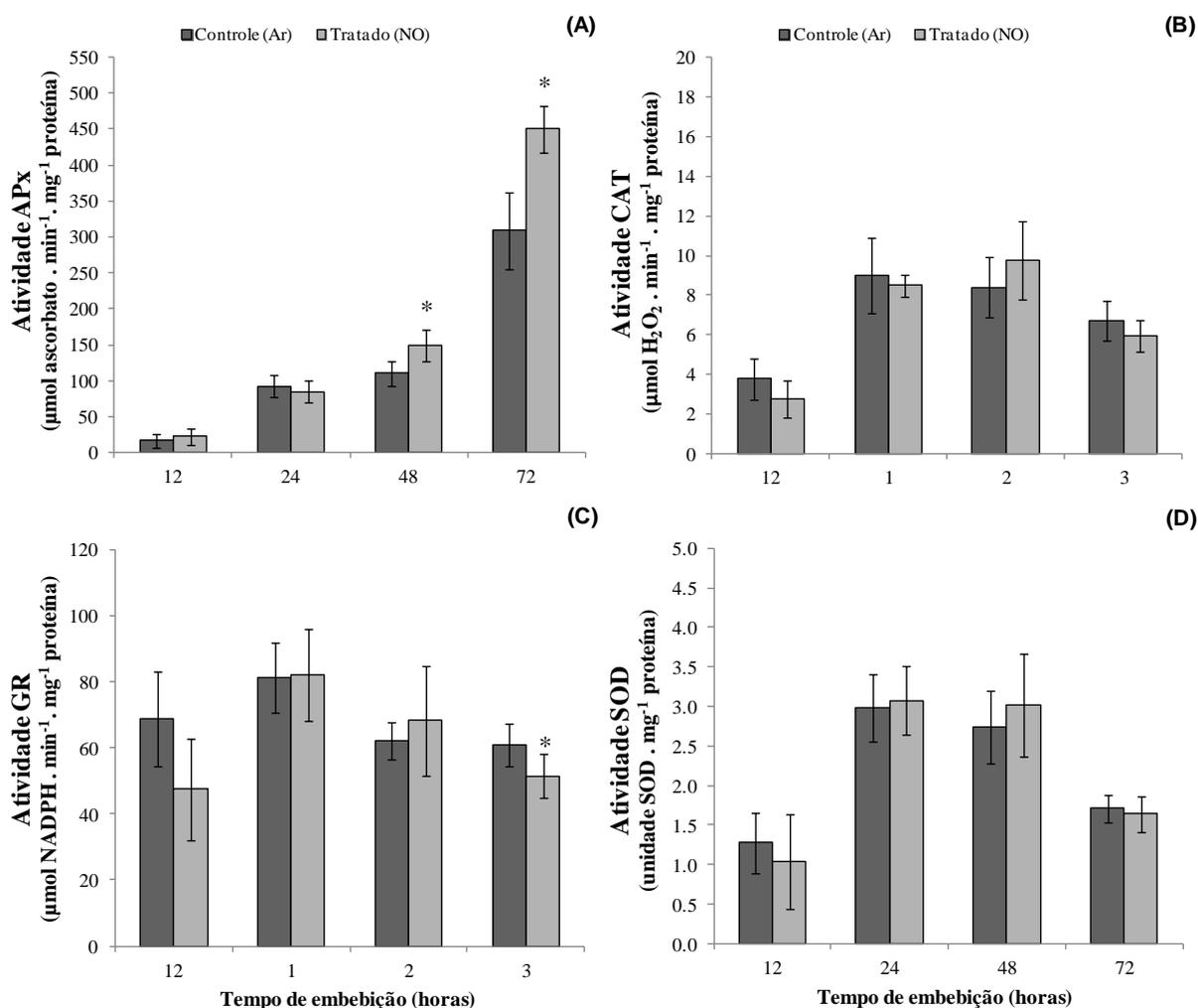


Figura 28. Atividade de enzimas antioxidantes em raízes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. (A) Ascorbato peroxidase (APx), (B) Catalase (CAT), (C) Glutaciona redutase (GR) e (D) Superóxido dismutase (SOD) após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão (n=6). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, $P < 0,05$).

Desta forma, a análise das enzimas antioxidantes nas raízes indicou que o tratamento com NO promoveu um aumento na atividade da APx e uma diminuição na da GR. Além disso, estas duas enzimas apresentam perfis de atividade opostos, sendo que a atividade da GR diminui e a da APx aumenta com o tempo da embebição.

A análise das enzimas antioxidantes nos cotilédones mostrou um aumento significativo na atividade da APx no tratamento com NO em 48 horas de embebição (Figura 29A). A atividade da APx foi mais baixa em 12 horas e manteve-se elevada em 24, 48 e 72 horas. O tratamento com NO também promoveu diminuição da atividade da CAT em 24 horas com posterior aumento em 48 e 72 horas de embebição (Figura 29B). O perfil geral da CAT foi semelhante em ambos os tratamentos com um aumento da sua atividade ao longo do

tempo de embebição. A GR apresentou um aumento significativo da atividade GR em 48 horas no tratamento com NO (Figura 29C). O pico de atividade da GR foi observado em 24 horas, seguido de diminuição no final do período de embebição. Em relação à SOD, não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento com NO, sendo que o pico de atividade foi observado em 24 horas de embebição (Figura 29D).

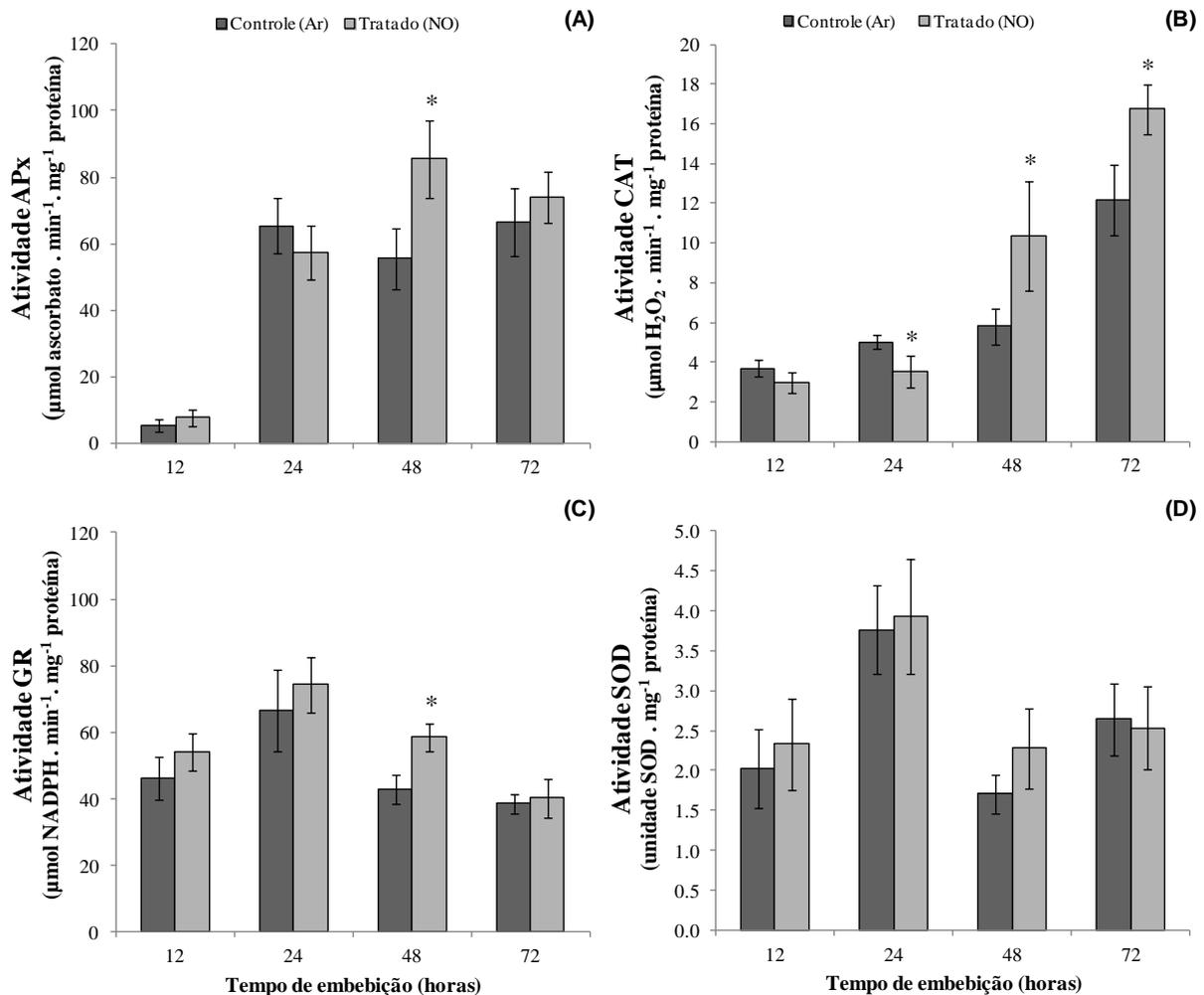


Figura 29. Atividade de enzimas antioxidantes em cotilédones de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. (A) Ascorbato peroxidase (APx), (B) Catalase (CAT), (C) Glutaciona redutase (GR) e (D) Superóxido dismutase (SOD) após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão (n=6). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, P<0,05).

O tratamento com NO nos cotilédones promoveu uma maior atividade das enzimas antioxidantes APx, CAT e GR. As enzimas apresentaram perfis de atividade similares em raízes e cotilédones, com exceção da CAT.

Tendo em vista que a medida colorimétrica de atividade da SOD não permite distinguir as diferentes isoformas, realizou-se a análise da atividade isoenzimática da SOD em gel. Inicialmente foi realizada a determinação das isoformas presentes em raízes e cotilédones de *S. virgata* através do método de inibição com KCN e H₂O₂. Esta análise possibilitou a detecção de três isoformas: uma MnSOD e duas Cu/ZnSOD (I e II) presentes em raízes e cotilédones (Figura 30).

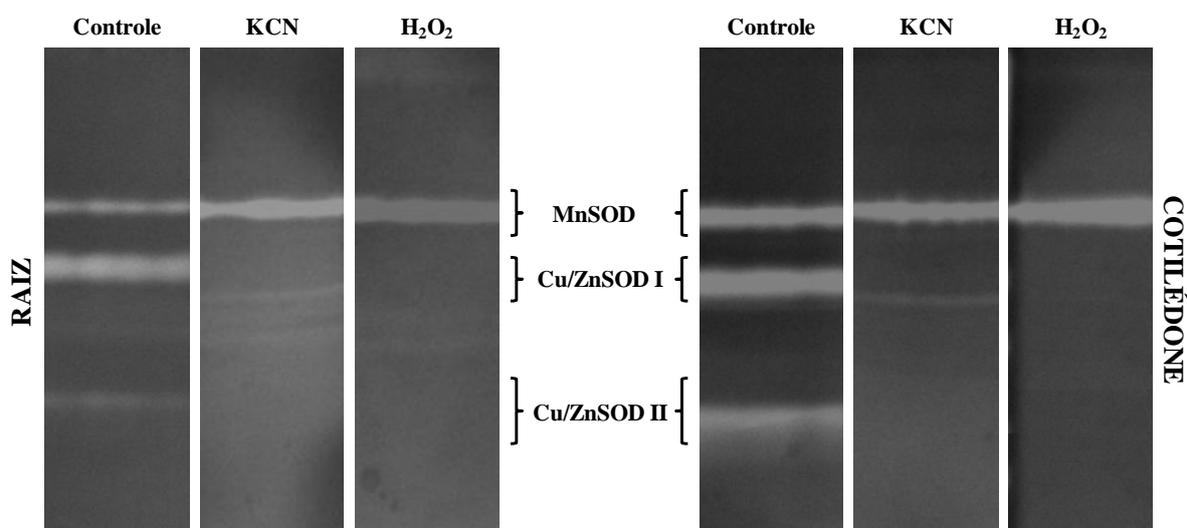
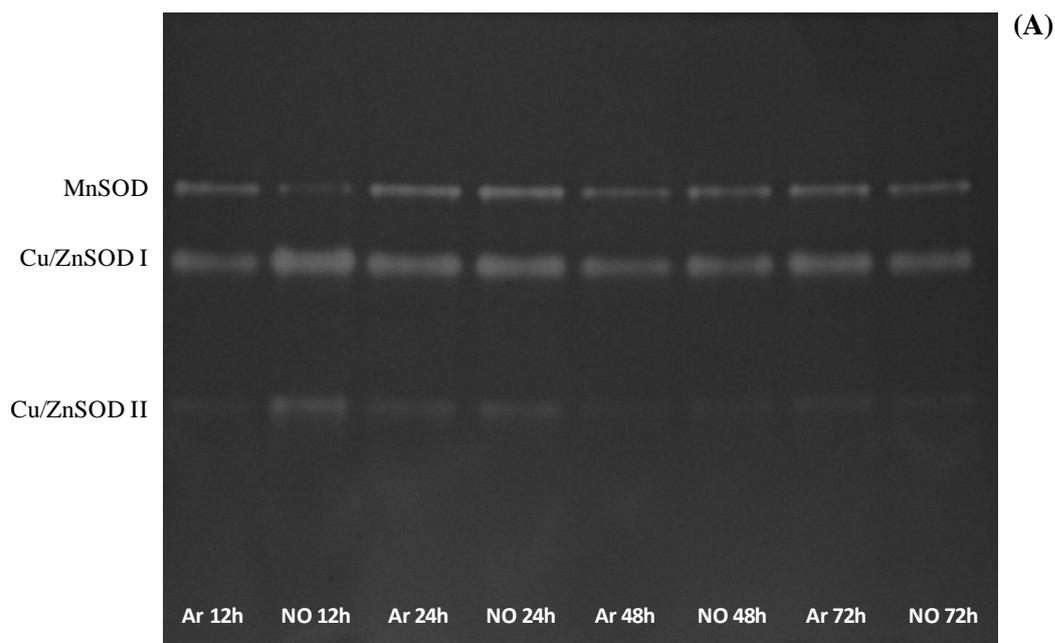


Figura 30. Revelação diferencial de isoenzimas da superóxido dismutase (SOD) em raízes e cotilédones de sementes de *S. virgata*. KCN inibe a atividade de Cu/ZnSOD e H₂O₂ inibe Cu/ZnSOD e FeSOD. A atividade da SOD foi determinada por eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante (PAGE).

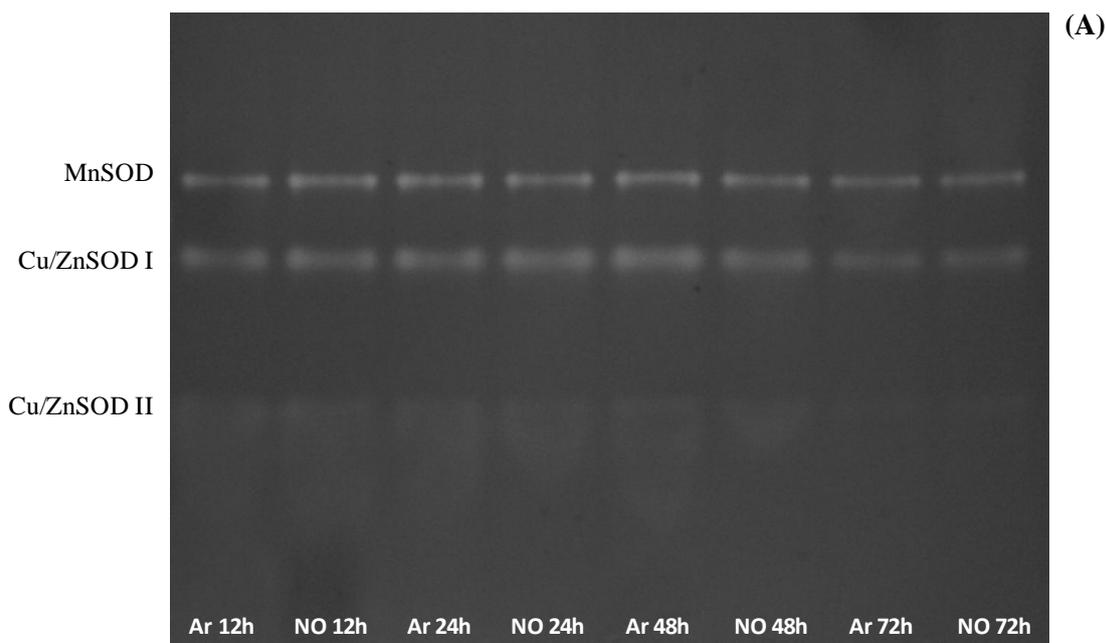
Em raízes, estas três isoformas foram detectadas tanto no controle quanto no tratamento com NO e independente do tempo de embebição (Figura 31A). Além disso, a análise visual do gel indicou que em ambos os tratamentos a isoenzima Cu/ZnSOD I apresentou maior atividade, a MnSOD uma atividade intermediária e a Cu/ZnSOD II menor atividade. Para quantificação da atividade das diferentes isoenzimas de SOD detectadas foi realizada uma análise densitométrica, considerando o controle fumigado com ar comprimido e coletado após 12 horas de embebição como o padrão para a normalização (100%). Em raízes com 12 horas de embebição, o tratamento com NO promoveu uma redução da atividade da isoenzima MnSOD e um aumento na Cu/ZnSOD I e Cu/ZnSOD II em relação ao controle (Figura 31B). Além disso, também pôde ser observada redução da atividade da isoenzima Cu/ZnSOD II no tratamento com NO em 24, 48 e 72 horas de embebição em relação ao tratamento com ar comprimido.



Isoformas	Valores normalizados							
	12h		24h		48h		72h	
	AR	NO	AR	NO	AR	NO	AR	NO
MnSOD	100	64	104	105	85	96	101	91
Cu/ZnSOD I	100	133	108	99	82	90	94	85
Cu/ZnSOD II	100	147	155	122	100	83	104	82

Figura 31. Atividade isoenzimática da superóxido dismutase (SOD) em raízes de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. **(A)** Atividade da SOD em gel de poliacrilamida não-desnaturante (PAGE). **(B)** Tabela de densitometria com medidas da atividade relativa de cada isoforma de SOD em função da intensidade da banda. Os valores são expressos em porcentagem e foram normalizados em função da intensidade da banda do controle com 12 horas de embebição, para cada isoenzima.

Em cotilédones, a atividade isoenzimática da SOD também indicou a presença de três isoformas em ambos os tratamentos e em todos os tempos de embebição avaliados (Figura 32A). Na análise visual do gel verificou-se uma maior atividade da isoenzima Cu/ZnSOD I, uma atividade intermediária da MnSOD e uma menor atividade da Cu/ZnSOD II tanto no controle quanto no tratado. Os valores normalizados da SOD indicaram, diferentemente do observado em raízes, um maior efeito do NO na atividade da isoforma Cu/ZnSOD I, com aumento de atividade em 24 horas e diminuição em 48 horas (Figura 32B).



Isoformas	Valores normalizados							
	12h		24h		48h		72h	
	AR	NO	AR	NO	AR	NO	AR	NO
MnSOD	100	105	135	106	142	132	109	116
Cu/ZnSOD I	100	109	118	153	162	118	110	115
Cu/ZnSOD II	100	98	104	104	88	101	64	67

Figura 32. Atividade isoenzimática da superóxido dismutase (SOD) em cotilédones de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas após 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. **(A)** Atividade da SOD em gel de poliacrilamida não-desnaturante (PAGE). **(B)** Tabela de densitometria com medidas de atividade relativa de cada isoforma da SOD em função da intensidade da banda. Os valores são expressos em porcentagem e foram normalizados em função da intensidade da banda do controle com 12 horas de embebição, para cada isoenzima.

Apesar das alterações observadas em raízes e cotilédones, o aumento de atividade de uma isoforma parece ser compensado pela diminuição da atividade de outra isoforma de SOD, o que torna os valores de atividade total da SOD semelhantes entre os tratamentos, como verificado na dosagem colorimétrica (Figura 28D e 29D).

Na quantificação de ROS, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), verificou-se que o teor de H_2O_2 em raízes decresce ao longo da embebição e que o tratamento com NO promoveu um aumento significativo na concentração de H_2O_2 neste tecido com 48 horas de embebição (Figura 33A). Nos cotilédones o tratamento com NO promoveu um aumento significativo no conteúdo de H_2O_2 em 24 horas (Figura 33B). Perfil similar ao de raízes foi

observado para o teor de H_2O_2 em cotilédones com diminuição ao longo da embebição. Os cotilédones apresentaram teores mais elevados de H_2O_2 quando comparados com as raízes (Figura 33).

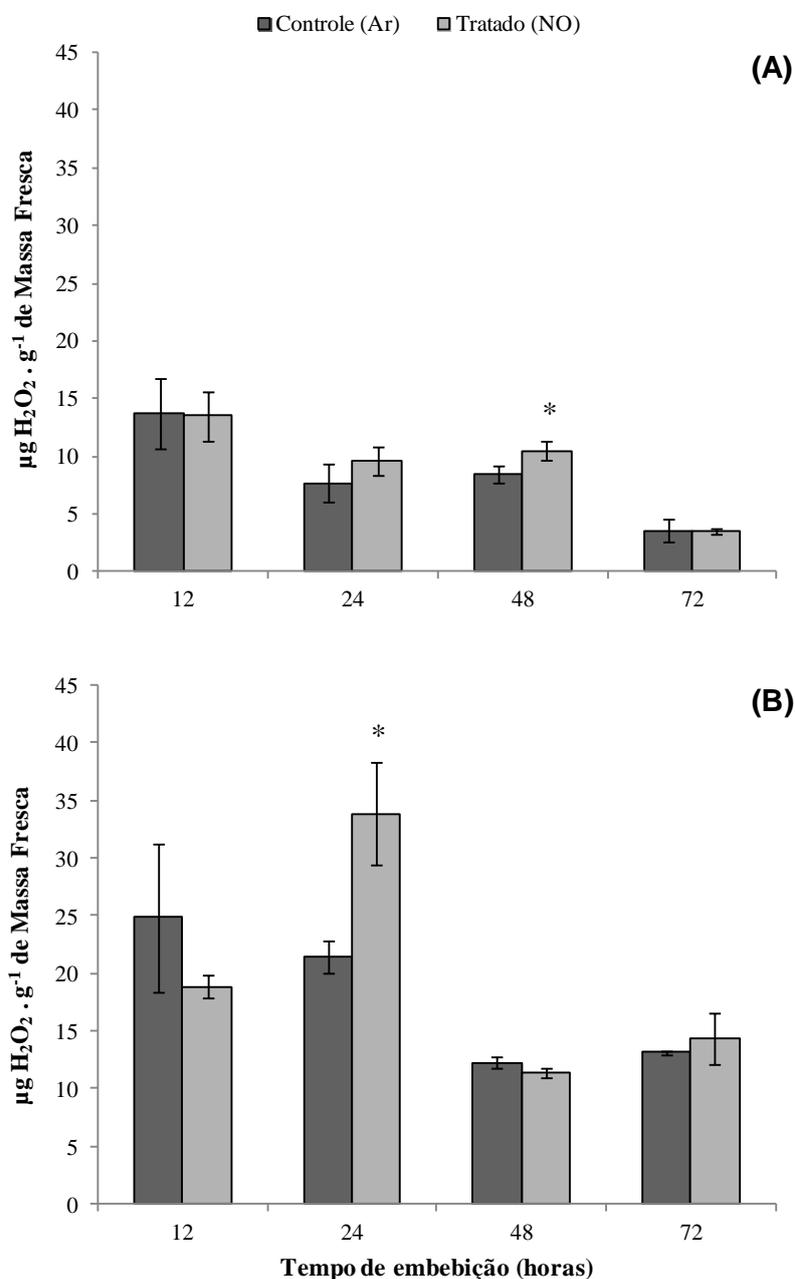


Figura 33. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em raízes (A) e em cotilédones (B) de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas em raízes e cotilédones com 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, $P < 0,05$).

A análise de malondialdeído (MDA), indicativo dos níveis de peroxidação lipídica,

mostrou que o NO induz o aumento no conteúdo de MDA em raízes com 72 horas de embebição (Figura 34A).

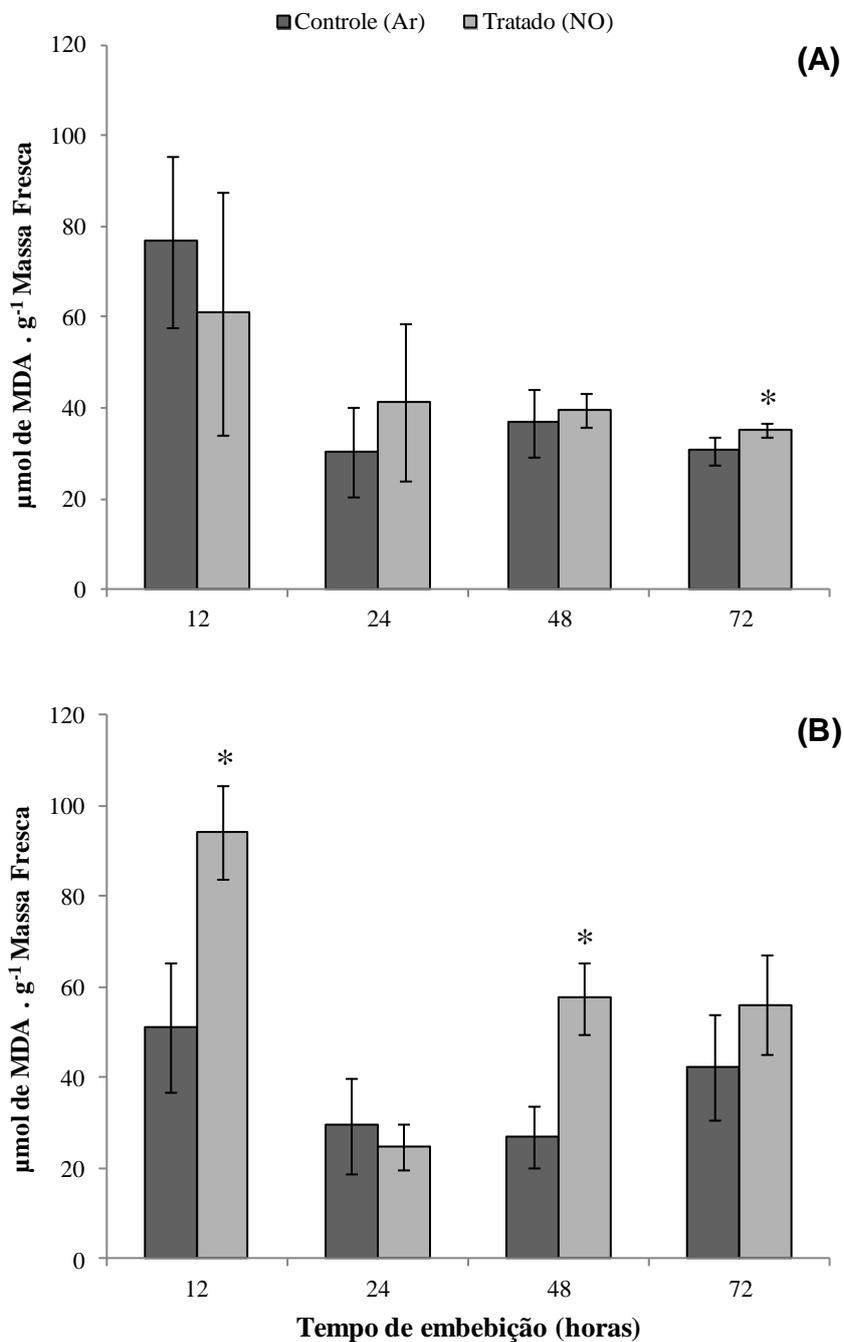


Figura 34. Determinação da peroxidação lipídica pelo conteúdo de malondialdeído (MDA) em raízes (A) e em cotilédones (B) de *S. virgata* fumigadas com ar comprimido (controle) e NO gasoso (60 ppm) por 12 horas. As análises foram realizadas em raízes e cotilédones com 12, 24, 48 e 72 horas de embebição. As barras representam o desvio padrão das médias (n=3). Os asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos com o mesmo tempo de embebição (teste t-Student, P<0,05).

As raízes apresentaram maior conteúdo de MDA em 12 horas de embebição, sendo

que posteriormente houve redução em seu conteúdo, que se manteve constante durante o período avaliado. Nos cotilédones o tratamento com NO promoveu um aumento significativo no conteúdo de MDA em 12 e 48 horas (Figura 34B), indicando maior peroxidação lipídica com o tratamento com NO.

5. DISCUSSÃO

5.1. Efeito do NO exógeno na composição e atividade biológica dos exsudatos de *Sesbania virgata*

Diversos autores já demonstraram que o óxido nítrico (NO) estimula a germinação de sementes de *Lactuca sativa*, *Lupinus albus*, *Lens culinaris*, *Arabidopsis thaliana*, *Hordeum vulgare*, *Panicum virgatum* e *Beta vulgaris* (Sarath *et al.* 2006, Bethke *et al.* 2004, 2006a, 2006b, Erol *et al.* 2008, Gniazdowska *et al.* 2012). Nestes trabalhos, o efeito do NO sobre a germinação foi investigado por meio do uso de soluções doadoras de NO, como o nitrito, o nitrato, o nitroprussiato de sódio (SNP) e a S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP). O SNP é o doador mais comumente utilizado sendo que, além do NO, o nitrito e o cianeto também são liberados durante sua decomposição (Bethke *et al.* 2006b). Zerlin (2011) avaliou o efeito de diferentes soluções doadoras de NO e verificou que estes tratamentos não estimularam a germinação das sementes de *Sesbania virgata*, diferentemente do observado para a maioria das espécies estudadas. Da mesma forma, a fumigação com NO gasoso não afetou a porcentagem de germinação de sementes de *S. virgata*, confirmando os dados obtidos anteriormente. Apesar da concentração de NO aplicada durante a fumigação (60 ppm) ter sido muito superior à concentração de NO presente na atmosfera (0,4 a 71 ppb), a fumigação com NO não promoveu danos à germinação das sementes e morfologia das plântulas, indicando alta tolerância dessa espécie à elevadas concentrações de NO atmosférico. A fumigação de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), em condições similares às usadas no presente trabalho, levou à necrose dos tecidos e morte das sementes (Oliveira, Zerlin & Gaspar, comunicação pessoal), provavelmente devido à presença de um tegumento permeável contendo estômatos.

Tendo em vista a alta tolerância de *S. virgata*, no presente trabalho optamos por utilizar altas concentrações de NO gasoso que simulassem um estresse nitrosativo, visando avaliar os mecanismos de defesa da espécie. Além disso, o sistema de fumigação com NO evita a presença de compostos interferentes como o cianeto, que requerem uma série de controles adicionais, além de permanecerem na água de germinação, que também foi avaliada quanto a exsudação de seus compostos.

Durante a germinação, as plantas liberam aminoácidos, ácidos orgânicos, açúcares, flavonoides e diversos metabólitos secundários (Somers *et al.* 2004). Os compostos exsudados por sementes são liberados geralmente durante o processo de embebição e auxiliam no processo de germinação e estabelecimento da plântula no ambiente, atuando em

funções biológicas importantes, como na defesa contra patógenos, nas associações simbióticas e também na inibição do crescimento de outras espécies vegetais por efeito alelopático (Ndakidemi & Dakora 2003).

Em sementes de *S. virgata*, a exsudação de proteínas, açúcares e metabólitos secundários ocorre desde as primeiras horas de embebição. Os maiores teores de proteínas exsudadas por sementes de *S. virgata* foram quantificados no segundo dia após a embebição, período no qual ocorre a taxa máxima de germinação das sementes. Durante a germinação, as sementes podem liberar compostos que estimulam a quimiotaxia de bactérias benéficas auxiliando no estabelecimento de relação simbiótica, como os aminoácidos glutamato e aspartato, exsudados por sementes de soja (Barbour *et al.* 1991), e o aminoácido canavanina exsudado por sementes de *Glycyrrhiza uralensis* (Cai *et al.* 2009). Algumas sementes exsudam proteínas que podem prevenir a infecção por microorganismos, como as proteínas transportadoras de lipídeos presentes em *Vigna unguiculata* (Diz *et al.* 2003, Nóbrega *et al.* 2005) e proteínas antifúngicas em *Cicer arietinum* (Anusuya & Sathiyabama 2014). Além disso, também têm sido relatada a presença de peptídeos antifúngicos e antibacterianos isolados de sementes de *Mirabilis jalapa* (Cammue *et al.* 1992), *Amaranthus caudatus* (Broekaert *et al.* 1997), *Raphanus sativus* (Terras *et al.* 1992), *Passiflora edulis* (Pelegri *et al.* 2006), *Phaseolus vulgaris* (Leung *et al.* 2008) e *Cucurbita maxima* (Wang & Ng 2003).

Desta forma, as proteínas presentes nos exsudatos das sementes de *S. virgata* podem estar relacionadas à defesa contra o ataque de microorganismos durante o processo germinativo, uma vez que a presença de proteína com atividade inibitória do crescimento de fungos fitopatogênicos já foi identificada em sementes desta espécie (Praxedes *et al.* 2011). Contudo, não foram observadas diferenças significativas na exsudação de proteínas entre o tratamento com NO gasoso e o controle, que sugerissem uma alteração no potencial de defesa dessa espécie contra microorganismos. Vale ressaltar, no entanto, que as sementes foram germinadas em placas de Petri e que estudos em casa de vegetação ou em ambiente natural poderiam ajudar a compreender se a resposta do NO é diferente na interação com a rizosfera, pois ao reconhecer um fitopatógeno, a planta pode desencadear mecanismos de defesa mediados por NO.

Além de atuar no potencial de defesa contra microorganismos, o NO pode modular diretamente o potencial de infecção do fitopatógeno, como observado para *A. thaliana* cuja fumigação com 60 ppm de NO diminuiu a susceptibilidade das plantas à infecção por *Pseudomonas syringae*, devido à redução do crescimento bacteriano no tecido. Paralelamente, a fumigação direta da cultura de *P. syringae*, com a mesma concentração de NO gasoso,

acarretou em morte de 30% das bactérias em suspensão, sugerindo um efeito microbicida e bacteriostático do NO (Vitor *et al.* 2013).

Os microrganismos da rizosfera utilizam os compostos solúveis liberados pelas sementes germinantes e raízes de plantas como principais fontes de nutrientes, sobretudo os açúcares (Somers *et al.* 2004, Kato & Arima 2006, Lugtenberg 2015). Em *C. arietinum* a quantidade de carboidratos solúveis exsudados pelas sementes foi diretamente relacionada à susceptibilidade ao fungo *Rhizoctonia bataticola*, causador de doenças em sementes e plântulas desta espécie (Singh & Mehrotra 1980). Estes autores verificaram ainda que as variedades de *C. arietinum* mais susceptíveis ao fungo, apresentavam teores de carboidratos cinco vezes mais elevados do que as variedades resistentes.

Em sementes de *S. virgata* a exsudação dos açúcares totais e redutores foram maiores no início da embebição diminuindo gradativamente até 72 horas. Os açúcares encontrados neste período inicial são provenientes da degradação dos oligossacarídeos da série da rafinose, os quais servem como fonte de carbono no início do período germinativo, antes da protusão da radícula (Buckeridge & Dietrich 1996). Após este período, ocorreu um aumento acentuado do conteúdo de açúcares totais e um pequeno aumento de açúcares redutores (dados não mostrados). O acréscimo nos teores de açúcares exsudados após 72 horas se deve à mobilização do galactomanano (polissacarídeo de reserva de parede celular) presente no endosperma das sementes, uma vez que se inicia o processo de degradação pós-germinativa desse polissacarídeo, liberando oligossacarídeos que serão utilizados para o desenvolvimento da plântula (Buckeridge & Reid 1996, Tonini *et al.* 2006, 2007).

Embora o tratamento com soluções doadoras de NO tenha estimulado a degradação do galactomanano e levado a um aumento do teor de manose/galactose nos diferentes tecidos das sementes de *S. virgata* (Zerlin 2011), o tratamento com NO gasoso não alterou significativamente a exsudação dos açúcares totais e redutores, sugerindo que o NO não tenha promovido uma maior susceptibilidade da espécie a infestação por microorganismos. No entanto, a análise por bioautografia possibilitou a detecção de uma substância antifúngica com Rf de 0,74, detectada apenas com 72 horas de embebição, que foi fortemente induzida pela fumigação com NO. A presença de substância com atividade antifúngica liberada apenas neste dia também já foi relatada por Simões (2008), porém esta substância não pôde ser identificada até o presente momento. Outros três halos de inibição do crescimento do fungo *Cladosporium cladosporioides* foram identificados. Este fungo é considerado uma espécie fitopatogênica em caju, tomate, milho e pinhão-manso por ser o causador da podridão de *Cladosporium* (Kobayashi *et al.* 2011, Mendes & Urban 2014). Dentre os halos de inibição

observados, o de Rf 0,64 pode corresponder à substância sesbanimida A, identificada por Simões (2008) em frações obtidas de exsudatos de *S. virgata*, que apresentou um Rf de 0,62 e forte atividade inibidora do crescimento do fungo *C. sphaerospermum*. No entanto, essa substância não foi alterada pela fumigação com NO. Os dados indicam que o NO afeta o potencial antifúngico contra o fitopatógeno testado, entretanto novos estudos precisam ser realizados para confirmar os resultados obtidos e testar o potencial destes exsudatos contra outros microrganismos.

A exsudação de ácidos fenólicos, catequina, naringenina, campferol, quercetina, luteolina e miricetina já foi descrita para diversas espécies de leguminosas como *Medicago sativa* (Hartwig *et al.* 1991), *P. vulgaris* (Hungria *et al.* 1991), *Vicia faba* (Bekkara *et al.* 1998) e *Lotus pedunculatus* (Steele *et al.* 1999), sendo que em *V. faba* a catequina é o composto fenólico majoritário nos exsudatos de sementes em 24 horas de embebição (Bekkara *et al.* 1998). O flavonóide (+)-catequina é sintetizado no tegumento e exsudado por sementes de *S. virgata*, sendo encontrado em altas concentrações nos exsudatos no primeiro dia de embebição (Simões *et al.* 2008). A quantidade de catequina exsudada pelas sementes de *S. virgata* é cerca de dez vezes maior do que a relatada para outras espécies de *Sesbania* (Simões *et al.* 2008). A análise do perfil geral da exsudação de catequina no presente trabalho também indicou uma maior exsudação deste composto em 24 horas e o seu decréscimo a partir do segundo dia de embebição, similar ao relatado por Simões *et al.* (2008) em análises realizadas com exsudatos acumulados ao longo da germinação.

No presente trabalho, a maior exsudação de compostos fenólicos e taninos condensados ocorreu nas primeiras 48 horas, enquanto a maior exsudação de flavonoides totais ocorreu com 24 horas de embebição. Sementes de *S. virgata* tratadas com NO apresentaram menores teores de fenóis totais e taninos condensados em 12 e 24 horas de embebição, sendo que o conteúdo de flavonoides totais não foi alterado pelo tratamento com NO. A dosagem de flavonoides totais pelo método de cloreto de alumínio permite detectar os flavonoides da classe dos flavonóis e flavonas, como a quercetina, que já foi detectada no tegumento de sementes de *S. virgata*, mas não é exsudada (Simões *et al.* 2008). Desta forma, os dados sugerem que as alterações observadas nos fenóis totais se devem a variações nos teores de taninos condensados. A redução no conteúdo de taninos condensados promovida pelo NO em 12 e 24 horas de embebição indicou, portanto, menor teor de catequina nos exsudatos tratados, o que pôde ser confirmado pelas análises de CLAE e CG-EM. Além das análises colorimétricas, as análises de perfil dos exsudatos por CLAE e CG-EM confirmaram

a pequena variação nos demais metabólitos secundários exsudados entre controle e tratamento com NO.

A aplicação de NO exógeno é capaz de aumentar a produção de metabólitos secundários em células vegetais e microrganismos (Xu *et al.* 2005b, Wu *et al.* 2009, Wang *et al.* 2011, Dong *et al.* 2012). Wu e colaboradores (2007) verificaram que a aplicação de 100 μM de SNP promoveu um acúmulo de compostos fenólicos, flavonoides e derivados do ácido caféico em raízes adventícias de *Echinacea purpurea*, enquanto que uma concentração mais elevada (250 μM) causou um declínio no acúmulo destes compostos. No fungo *Russula griseocarnosa*, a fumigação com NO promoveu um aumento no conteúdo de fenóis totais e flavonoides totais, além do aumento da atividade das enzimas fenilalanina amônio-liase e chalcona sintase, indicando a ativação dessas vias biosintéticas (Dong *et al.* 2012). No entanto, a diminuição no conteúdo de catequina em 12 e 24 horas induzida por NO em *S. virgata* não parece estar relacionada à alterações na via de síntese desse composto, tendo em vista que a fumigação dos exsudatos na ausência das sementes, assim como da catequina comercial, resultou em efeito similar de diminuição dos teores de catequina. Desta forma, estes resultados sugeriram a oxidação da catequina durante o processo de fumigação com NO.

Apesar de a catequina ser um composto fotossensível, a luz não interferiu nos efeitos promovidos pelo NO, indicando que não houve degradação de catequina pela luz durante o processo de fumigação. A estabilidade da catequina também é dependente do pH, sendo que em solução alcalina esta substância é muito instável e decompõe-se em poucos minutos, enquanto em solução ácida ela é relativamente estável (Zhu *et al.* 1997). Nos exsudatos de sementes de *S. virgata*, o pH medido foi similar entre os tratamentos e variou entre 5 e 6 (dados não mostrados), correspondendo à faixa de pH em que não há alterações na estabilidade da catequina (Zhu *et al.* 2002). Em conjunto, os resultados indicam que a diminuição no conteúdo de catequina nos exsudatos, promovida pelo tratamento com o NO, não se deve a menor síntese e/ou exsudação desse composto pelas sementes de *S. virgata*. Desta forma, a redução do conteúdo de catequina nos exsudatos fumigados, assim como a redução do conteúdo de catequina comercial, quando tratados com NO, sugere que a catequina reaja quimicamente com o NO durante o processo de fumigação.

Os flavonoides podem atuar de modo direto no sequestro de radicais livres, devido à reatividade do grupo hidroxila que pode ser oxidado por radicais, resultando em uma forma mais estável (Nijveldt *et al.* 2001). Desta forma, os flavonoides estabilizam as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio tornando os radicais inativos (Korkina & Afanas'ev 1997, Nijveldt *et al.* 2001). A capacidade de sequestro de óxido nítrico e peroxinitrito já foi

demonstrada para extratos de chá verde e chá preto, que possuem grande quantidade de catequinas, e que ao menos em parte, são responsáveis pelos efeitos benéficos atribuídos a estes produtos (Paquay *et al.* 2000, Nakagawa & Yokozawa 2002). Além disso, a análise do sequestro de NO pela catequina comercial foi dependente da concentração, assim como verificado por Nakagawa e Yokozawa (2002). O potencial de sequestro de NO do exsudato controle, de aproximadamente 20%, é similar ao apresentado pelas diferentes formas de catequina presentes em extratos de chá verde (Nakagawa & Yokozawa 2002), sendo que a (+)-catequina presente nos exsudatos de *S. virgata* apresenta um potencial intermediário de sequestro, devido à ausência do grupo galoil. Os exsudatos fumigados com NO apresentaram menor potencial de sequestro, em torno de 4%, sugerindo que durante o processo de fumigação uma parte da catequina tenha se ligado ao NO de forma estável e que esta ligação tenha reduzido ou alterado os sítios de ligação ao NO, reduzindo assim a capacidade sequestradora dos exsudatos tratados. A capacidade de sequestro de espécies reativas de oxigênio ainda precisa ser investigada, mas se considerarmos os efeitos antioxidantes comprovados das catequinas de vinho, chá verde e chá preto (Bastianetto *et al.* 2000, Paquay *et al.* 2000, Sarkar & Bhaduri 2001), a (+)-catequina de *S. virgata* deve apresentar capacidade similar de sequestrar ROS.

Conforme pôde ser observado neste trabalho, a ligação NO-catequina não diminuiu seu potencial fitotóxico, tendo em vista que os exsudatos obtidos de sementes fumigadas com NO foram capazes de alterar o desenvolvimento de plântulas de *O. sativa* e *A. thaliana*, de modo similar ao observado para os exsudatos fumigados com ar comercial e para exsudatos não fumigados (Simões *et al.* 2008). Os exsudatos de *S. virgata* inibiram o desenvolvimento da parte aérea e radicular de plantas de *A. thaliana* e o desenvolvimento radicular de *O. sativa*. Os efeitos inibitórios foram mais drásticos na presença de exsudatos coletados nas primeiras 24 horas, que corresponde ao período de maior exsudação de catequina. Os exsudatos promoveram um efeito inibitório maior do que o observado com a catequina comercial, sendo que em *O. sativa* a catequina comercial promoveu, inclusive, um aumento no comprimento das raízes. O efeito de concentrações entre 6 a 200 µM de (+)-catequina comercial no desenvolvimento de raízes e parte aérea de *Brassica nigra* e *Sinapis alba*, mostrou comportamentos que variam de inibição à indução do crescimento, conforme o tratamento, regime luminoso e órgão avaliado (Chobot *et al.* 2009), mostrando que esses fatores também podem determinar o efeito fitotóxico de um aleloquímico.

Os efeitos inibitórios mais pronunciados promovidos pelos exsudatos de sementes de *S. virgata* devem ser atribuídos não somente à ação fitotóxica da catequina, mas também a

outros metabólitos secundários presentes nos exsudatos que podem atuar de forma isolada ou em conjunto com a catequina. Outros flavonoides têm sido encontrados no tegumento de sementes de espécies de *Sesbania* e de outras Fabaceae (Ceballos *et al.* 1998, Silva *et al.* 2004, Pang *et al.* 2007). Em sementes de *S. punicea* a presença de sesbanimida A pode inibir o crescimento de plântulas de várias espécies (Gorst-Allman *et al.* 1984, Powell *et al.* 1990, Van Staden & Grobbelaar 1995). Simões *et al.* (2008) detectaram frações fitotóxicas derivadas de exsudatos das sementes de *S. virgata* que não continham (+)-catequina na sua composição, sugerindo que esta semente provavelmente exsude outras fitotoxinas potenciais que podem estar relacionadas com o caráter invasivo desta espécie. O fato da fumigação com NO não afetar o potencial fitotóxico dos exsudatos sugere que a oxidação do NO na presença da catequina não altere sua atividade alelopática ou que outras substâncias compensem uma eventual perda de atividade da catequina.

5.2. Altas concentrações de NO induzem estresse nitrosativo e oxidativo em *S. virgata*?

Um dos maiores obstáculos na pesquisa com óxido nítrico consiste em determinar sua exata localização e quantificação em extratos ou tecidos de plantas, devido à natureza instável da molécula e sua baixa produção celular (Stör & Stremlau 2006). Diversos métodos foram desenvolvidos para detecção de NO, como ensaios quimioluminescentes e medidas com eletrodos. No entanto, alguns métodos são limitados pela baixa sensibilidade, pequena resolução espacial ou pelo alto custo (Broillet *et al.* 2001). Os marcadores fluorescentes são amplamente utilizados para detecção de NO em plantas. Dentre os marcadores mais comuns estão a diaminofluoresceína (DAF-2) e sua forma diacetato, (DAF-2DA), permeável às membranas celulares (Kojima *et al.* 1998). No entanto, esses marcadores, sofrem influência de diversos fatores, como concentração de NO e cálcio e incidência de luz (Broillet *et al.* 2001). Quando utilizado em conjunto com microscopia de fluorescência, o DAF possibilita a definição exata do local de geração de NO, sendo que o DAF-2 DA tem sido amplamente utilizado para este fim (Mur *et al.* 2013).

Em sementes de *S. virgata* a aplicação de NO exógeno não interferiu na síntese de NO endógeno, que permanece constante nas sementes durante todo o período, sendo que teores mais elevados foram observados somente em raízes ao final da embebição. Em *P. virgatum* e sorgo, os maiores teores de NO endógeno foram detectados entre 24 e 30 horas de embebição, período que coincide com o início da germinação destas espécies (Simontacchi *et al.* 2004, Sarath *et al.* 2006).

A análise da localização *in situ* do NO em raízes e cotilédones confirmou os dados obtidos *in vitro*, tendo em vista que não foram observadas diferenças na intensidade da fluorescência entre os tratamentos. Estes resultados sugerem que as altas concentrações de NO gasoso empregadas não se refletem em maior produção de NO endógeno nos tecidos entre 12 e 72 horas de embebição. Em *P. virgatum*, o sinal fluorescente atribuído ao NO endógeno foi mais intenso em sementes germinadas em água do que nas germinadas na presença de SNP (Sarath *et al.* 2006). Diferentemente do observado no presente trabalho, o tratamento com concentrações crescentes de solução doadora de NO (50 a 250 μM de SNP), induziu um aumento bastante significativo nos teores de NO endógeno em raízes de *E. purpurea* (Wu *et al.* 2007). Esta manutenção do teor de NO endógeno em *S. virgata* sugere que esta não tenha sofrido estresse nitrosativo. Esta ausência de efeito pode ser computada às diversas barreiras que impedem o avanço de RNS para dentro dos tecidos, começando pela presença de grandes quantidades de catequina no exsudato, capazes de sequestrar parte do NO fornecido *via* fumigação. Além disso, a presença de um tegumento impermeável e os altos teores de galactomanano no endosperma podem contribuir como barreiras físicas à entrada do NO, conforme discutido por Zerlin (2011).

A atividade da enzima S-nitrosoglutathion redutase (GSNOR) permite controlar o nível intracelular de GSNO e, conseqüentemente, os efeitos do NO nas células (Wang *et al.* 2006, Leterrier *et al.* 2011). Em raízes de *S. virgata* a atividade GSNOR aumentou ao longo do período germinativo e pode estar relacionada com o aumento do conteúdo de NO endógeno observado neste tecido em 72 horas. Esse aumento de NO pode levar a um acúmulo de GSNO, promovendo um aumento da enzima GSNOR. O tratamento com NO não alterou a atividade da enzima GSNOR, o que embasa a hipótese de que o NO não tenha promovido um estresse nitrosativo, tendo em vista que a GSNOR é a enzima mais eficiente na eliminação de RNS.

A produção de ROS por sementes germinantes tem sido muitas vezes considerada como causa de estresse que pode afetar o sucesso da germinação (Bailly 2004). Visando mitigar o acúmulo de ROS, as sementes geralmente ativam o seu sistema antioxidante imediatamente após a reidratação (De Gara *et al.* 1997, Tommasi *et al.* 2001, Müller *et al.* 2010). Em sementes de *S. virgata*, o maior conteúdo de H_2O_2 foi observado nas primeiras 12 horas de embebição em raízes e nas 24 horas iniciais em cotilédones. Gniazdowska *et al.* (2010) sugerem que a produção de ROS durante a fase inicial da germinação de embriões de maçã possa ativar o sistema antioxidante celular, possibilitando o sucesso germinativo e o desenvolvimento de plântulas vigorosas. Desta forma, o aumento no conteúdo de H_2O_2

induzido por NO em cotilédones (24 horas) e raízes (48 horas) de *S. virgata* estaria relacionado à maior atividade antioxidante das enzimas responsáveis pela detoxificação do H₂O₂.

A SOD é uma enzima chave na defesa antioxidante de plantas devido à sua capacidade em dismutar o ânion superóxido em H₂O₂ e O₂ (Alscher *et al.* 2002). No entanto, diversas isoenzimas de SOD estão presentes em plantas, sendo ao menos uma MnSOD mitocondrial, uma CuZnSOD plastidial e uma CuZnSOD citosólica (Rubio 2011). Em *S. virgata* foram detectadas três isoenzimas nos dois tecidos analisados, sendo uma MnSOD e duas CuZnSOD, de acordo com o observado para outras leguminosas. Já em *Sesbania rostrata*, uma isoforma de FeSOD foi identificada, além de uma MnSOD e duas CuZnSOD (Rubio *et al.* 2009). De acordo com Asensio *et al.* (2012), a presença de uma isoforma de FeSOD citosólica em *Glycine max* e *Vigna unguiculata* está associada à maturidade e senescência dos tecidos, sendo que essa isoforma não foi detectada em raízes jovens das duas espécies. Este fato sugere que outras isoformas de SOD, sobretudo as FeSOD, poderiam ser detectadas em *S. virgata* em outros estágios de desenvolvimento.

Apesar das alterações observadas na atividade das isoenzimas de SOD em raízes e cotilédones de *S. virgata*, o aumento de atividade de uma isoforma parece ser compensado pela diminuição da atividade de outra isoforma, resultando em atividade total da SOD similar para os tratamentos controle e NO. Em raízes de *Cassia tora* foi detectada a presença de cinco isoformas da SOD que não foram alteradas pelo tratamento com doador de NO em relação ao número e intensidade das bandas correspondentes às diferentes isoformas (Wang & Yang 2005). Da mesma forma, em raízes de *Panax ginseng* o tratamento com SNP não alterou o número de isoformas da SOD em relação ao controle, no entanto o NO foi capaz de promover um aumento na intensidade das isoformas Cu/ZnSOD e FeSOD (Tewari *et al.* 2008).

O H₂O₂ produzido pela SOD e outras reações enzimáticas e não enzimáticas é convertido à H₂O e O₂ pela ação das enzimas catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX). Em *S. virgata*, o tratamento com NO estimulou a atividade da enzima APX em raízes (48 e 72 horas) e cotilédones (48 horas) e da enzima CAT (48 e 72 horas) em cotilédones, períodos imediatamente posteriores ao aumento de H₂O₂ induzido por NO nestes tecidos. A baixa atividade de APx em 12 horas se deve ao fato de sementes ortodoxas quiescentes não apresentarem atividade dessa enzima, sendo que apenas durante a embebição sua atividade é detectada e aumenta gradualmente (Tommasi *et al.* 2001). Portanto, os resultados sugerem que o acúmulo de H₂O₂ provocado pelo NO tenha induzido a atividade de CAT e APx em raízes e cotilédones, de forma a sequestrar eficientemente esse radical. No entanto, apesar da

indução dos mecanismos de detoxificação, houve um aumento de peroxidação lipídica induzido por NO em cotilédones logo no início da embebição, quando a atividade de CAT e APx ainda era baixa e após 48 horas de embebição, período posterior ao acúmulo de H₂O₂ nos dois tecidos.

A enzima GR catalisa a redução da glutatona oxidada (GSSG) para a sua forma reduzida (GSH), produzindo substrato (GSH) para a enzima DHAR sendo, deste modo, extremamente importante para a manutenção do ciclo ASC-GSH (Noctor & Foyer 1998). O aumento concomitante da atividade de GR e APx em cotilédones, induzido por NO em 48 horas, poderia estar relacionado com a necessidade da GR regenerar o ASC utilizado pela enzima APx no processo de detoxificação de H₂O₂, que apresentou maior acúmulo neste tecido.

Diversos autores têm demonstrado que o NO pode modular os teores de ROS e a atividade de enzimas antioxidantes em situações de estresse abiótico. Em sementes de *Vigna radiata*, o NO exógeno teve um papel protetor contra a toxicidade do arsênio, através da diminuição no conteúdo de H₂O₂ e MDA devido ao aumento da atividade de CAT em cotilédones (Ismail 2012). Em sementes de trigo e *Cicer arietinum*, o NO exógeno diminuiu os efeitos deletérios do estresse salino, reduzindo o conteúdo de H₂O₂ e MDA através da indução da atividade das enzimas SOD, CAT e APx (Sheokand *et al.* 2008, Zheng *et al.* 2009). A fumigação de sementes de *Antiaris toxicaria* com 100 ppm de NO gasoso reverte os efeitos da dessecação sendo que o NO atua em duas frentes: na ativação das enzimas do ciclo Asc-GSH (APx, GR, DHAR) via S-nitrosilação e na redução da inativação do ciclo Asc-GSH ao reprimir a carbonilação de proteínas induzida pela dessecação (Bai *et al.* 2011).

Análises proteômicas demonstraram que a APx é um dos alvos potenciais de S-nitrosilação em plântulas de *Arabidopsis* (Fares *et al.* 2011). A S-nitrosilação do resíduo de cisteína Cys32 levou a um aumento da atividade de APx e preveniu sua inativação pelo H₂O₂ (Begara-Morales *et al.* 2014). Dentre as enzimas que sofreram aumento de atividade induzida por S-nitrosilação em estresse por frio estão a SOD, a APx e a peroxiredoxina (Abat & Deswal 2009, Sehrawat *et al.* 2013). Estas modificações pós-traducionais reversíveis são comumente detectadas em situação de estresse oxidativo e nitrosativo e podem estar relacionadas ao aumento de atividade das enzimas antioxidantes em sementes de *S. virgata* fumigadas com NO.

É importante ressaltar que *S. virgata* é uma espécie de ambientes alagados, podendo se desenvolver, durante parte de seu ciclo de vida, em situação de hipóxia. Plantas adaptadas a crescer sob condições de alagamento possuem mecanismos para lidar com esse estresse, como

a formação de aerênquima, o aumento da disponibilidade de açúcares solúveis, entre outros. O estresse por alagamento também resulta na produção de etileno, ROS e NO e indução de enzimas de defesa antioxidante (Sairam *et al.* 2009). Tem sido sugerido recentemente que o NO pode atuar como um sinal que desencadeia a aclimação ao estresse por hipóxia. A aplicação de NO exógeno em plântulas de pepino sob situação de alagamento minimizou a limitação do crescimento imposta pelo estresse, induziu a atividade de enzimas antioxidantes, como SOD, POD, CAT e APx e reduziu os níveis de peroxidação lipídica (Fan *et al.* 2014). Alves e colaboradores (2013) verificaram que plantas de *S. virgata* expostas ao alagamento desenvolvem uma eficiente capacidade sequestradora de ROS nas raízes, principalmente do H₂O₂ gerado durante o estresse. Estes autores atribuíram esta capacidade à ação coordenada de vias não-enzimáticas do ascorbato (ASC) e dehidroascorbato (DHA), e enzimáticas da SOD, APX, GR e dehidroascorbato redutase (DHAR), além de adaptações morfo-anatômicas, como o aumento de raízes adventícias, lenticelas e formação de aerênquima. Esse mecanismo constitutivo de defesa antioxidante também foi ativado pela aplicação de NO gasoso em sementes germinantes de *S. virgata*, mesmo sem a indução por alagamento.

Os resultados aqui apresentados descrevem mecanismos adicionais de defesa presentes em sementes de *S. virgata* que contribuem para o sucesso de seu estabelecimento inicial. *S. virgata* é uma espécie pioneira que possui uma grande capacidade invasora e é capaz de crescer na presença de sombra e em solos alagados. Suas sementes possuem dormência por impermeabilidade do tegumento, o que proporciona grande longevidade e a capacidade de formar banco de sementes no solo (de Araújo *et al.* 2004). O tegumento, além de proporcionar proteção física, sintetiza grandes quantidades de ABA, que regula o processo de mobilização de reservas da semente (Potomati & Buckerige 2002, Tonini *et al.* 2006) e, quando exsudado, pode afetar a germinação de espécies competidoras. A presença de um endosperma composto por galactomanano de reserva, além de fornecer grandes quantidades de açúcar que asseguram o desenvolvimento da plântula em condições adversas, também atua no controle da embebição da semente e minimiza o efeito de estresses potenciais que possam ocorrer durante o estabelecimento da plântula. A exsudação de compostos com atividade antifúngica e alelopática já havia sido descrita para *S. virgata* (Simões 2008, Simões *et al.* 2008). No entanto, o presente trabalho demonstra que além de atuar como potente aleloquímico, a catequina exsudada em grandes quantidades sequestra RNS, comumente geradas em situação de estresse por alagamento/hipóxia. Embora o potencial de sequestro de ROS não tenha sido testado, já se sabe que as catequinas são capazes de sequestrar oxigênio singlete e ânion superóxido. Além desse mecanismo externo de sequestro de espécies reativas, *S. virgata*

apresenta um eficiente sistema antioxidante enzimático, importante para a detoxificação de ROS geradas no processo de germinação. Este sistema pode ser induzido em situação de estresses oxidativo e nitrosativo, sendo capaz de minimizar eventuais injúrias de membranas e danos aos tecidos.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro trabalho a avaliar o efeito do NO exógeno sobre a composição e atividade biológica de exsudatos de sementes. Além disso, esta também é a primeira avaliação do sistema antioxidante enzimático de *Sesbania virgata* durante o processo germinativo, apesar de diversos autores já terem descrito o mecanismo de degradação de reservas durante a germinação destas sementes (Buckeridge & Dietrich 1996, Potomati & Buckeridge 2002, Lisboa *et al.* 2006, Tonini *et al.* 2006, 2007, 2010a, 2010b, Zerlin 2011).

Embora os resultados de composição dos exsudatos de sementes de *S. virgata* tenham sido similares aos obtidos por Simões (2008), a principal diferença entre estes dois trabalhos refere-se ao tipo de exsudato analisado. No estudo realizado por Simões (2008), foram coletados exsudatos acumulados em um período de 48 horas e 72 horas, enquanto neste trabalho analisou-se exsudatos não cumulativos, coletados a cada 24 horas. Desta forma, este trabalho possibilitou a identificação do período de exsudação dos diferentes compostos e pode auxiliar no entendimento do comportamento de exsudação dessas sementes, durante as diferentes fases do período germinativo.

A maioria dos estudos que avaliam os efeitos do NO exógeno em sementes utiliza soluções doadoras de NO, que normalmente geram produtos de decomposição e também podem ter efeitos nas células (Feelisch 1998), necessitando a utilização de diversos controles. Além disso, o tempo de liberação de NO varia de acordo com o doador utilizado e com as condições de luminosidade, pois estas soluções costumam ser fotossensíveis (Ederli *et al.* 2009). Tendo em vista que neste trabalho foi avaliada a composição dos exsudatos de sementes de *S. virgata*, a utilização do NO gasoso, além de possibilitar a análise do efeito direto do NO, sem a presença de interferentes, apresentou-se ainda mais vantajosa por evitar a presença de contaminantes nos exsudatos.

Os trabalhos com localização de NO *in situ* normalmente analisam amostras intactas, sem a necessidade de corte para análise no microscópio, como observado para os tecidos de *Arabidopsis thaliana*. No entanto, a necessidade de efetuar cortes à mão foi um fator que dificultou as análises de NO *in situ* de cotilédones e raízes de *S. virgata*. O corte induz a geração de NO e, por essa razão, torna-se indispensável a utilização de alguns controles, como o cPTIO, capaz de sequestrar o NO. Desse modo, são necessárias análises adicionais para confirmar os dados obtidos em relação à localização do NO em *S. virgata*. Uma alternativa para evitar a geração de NO durante o corte seria a utilização do método empregado por Corpas *et al.* (2004), no qual segmentos de tecido são incubados com o marcador DAF-2DA

(ou similares), embebidos em uma solução de acrilamida-bisacrilamida, com posterior polimerização e corte em micrótomo. Este método foi testado em raízes e cotilédones de *S. virgata*, no entanto testes adicionais ainda são necessários, tendo em vista a dificuldade de penetração dos marcadores de NO em todo o segmento de raízes e cotilédones.

As altas concentrações de NO gasoso aplicadas em sementes de *S. virgata*, visando induzir um estresse nitrosativo, não promoveram esse efeito, provavelmente devido à presença de grandes quantidades de catequina nos exsudatos dessas sementes, capazes de sequestrar RNS e possivelmente ROS, minimizando os danos causados pelo excesso de espécies reativas. Além disso, o aumento da atividade das enzimas antioxidantes no tratamento com NO pode estar relacionado a uma estratégia adicional de redução do conteúdo de ROS, para evitar que estas reajam com o NO e produzam outras RNS, como o peroxinitrito, ainda mais reativas do que o NO. Em trabalho realizado por Vitor e colaboradores (2013), a fumigação com 60 ppm de NO em plantas de *A. thaliana* também não induziu um estresse nitrosativo nas folhas, tendo em vista a manutenção dos níveis de nitrato e nitrito nas plantas tratadas com NO, apesar deste tratamento ter promovido um aumento no conteúdo de nitrosotióis. Desta forma, outras análises seriam importantes para determinar a ausência de estresse nitrosativo, como a avaliação da nitração de proteínas, que costuma ser um marcador desse tipo de estresse (Valderrama *et al.* 2007, Corpas *et al.* 2008, Chaki *et al.* 2011) e a análise do conteúdo de nitrosotióis. Além disso, a análise de antioxidantes não enzimáticos como o ASC e a GSH seria importante para uma melhor compreensão da modulação da atividade de GR e da GSNOR pelo NO.

Os dados indicam que o NO exógeno não modula a exsudação de compostos em sementes germinantes de *S. virgata*, e deste modo não altera o potencial antifúngico e fitotóxico. Diferentemente do observado para diversas espécies modelo e cultivadas, altas concentrações de NO exógeno fornecido na forma de soluções doadoras de NO ou de NO gasoso, tem pouco ou nenhum efeito na germinação de sementes e no desenvolvimento de plântulas de *S. virgata*. Isto pode ser devido à ação conjunta de mecanismos de defesa que contribuem para o sucesso do estabelecimento de *S. virgata* em ambientes considerados inóspitos para as demais espécies de plantas. Dentre estes mecanismos, que vem sendo estudados por nosso grupo de pesquisa ao longo dos anos e que este trabalho permitiu complementar (Figura 35), é possível listar:

- A síntese e exsudação de catequina, que atua como fitotóxico e sequestra espécies reativas de nitrogênio e oxigênio;

- A síntese e exsudação de outros compostos com atividade biológica, como a sesbanimida, que apresenta atividade antimicrobiana e o ABA, que atua na regulação da degradação de reservas de *S. virgata* e pode inibir a germinação de sementes de espécies competidoras;

- O acúmulo de altos teores de carboidratos de reserva, que permite à semente germinar e se desenvolver, mesmo em condições adversas;

- A liberação de manose, açúcar considerado tóxico para muitas espécies;

- O acúmulo de galactomanano, polissacarídeo de reserva de parede celular que, além de fornecer energia para o processo pós-germinativo, controla o processo de embebição da semente;

- A presença de um eficiente sistema antioxidante enzimático;

- A presença de um tegumento impermeável, que atua como proteção física e sintetiza diversos compostos com atividade biológica.

Novos mecanismos certamente ainda serão descobertos. *S. virgata*, por apresentar respostas que a diferenciam das demais espécies, é um modelo de estudo interessante, mas infelizmente informações genômicas ainda não estão disponíveis para essa espécie. O sequenciamento do genoma expresso em situação de alagamento/hipóxia poderia contribuir para o entendimento da sinalização por NO, presente no ambiente natural de ocorrência da espécie.

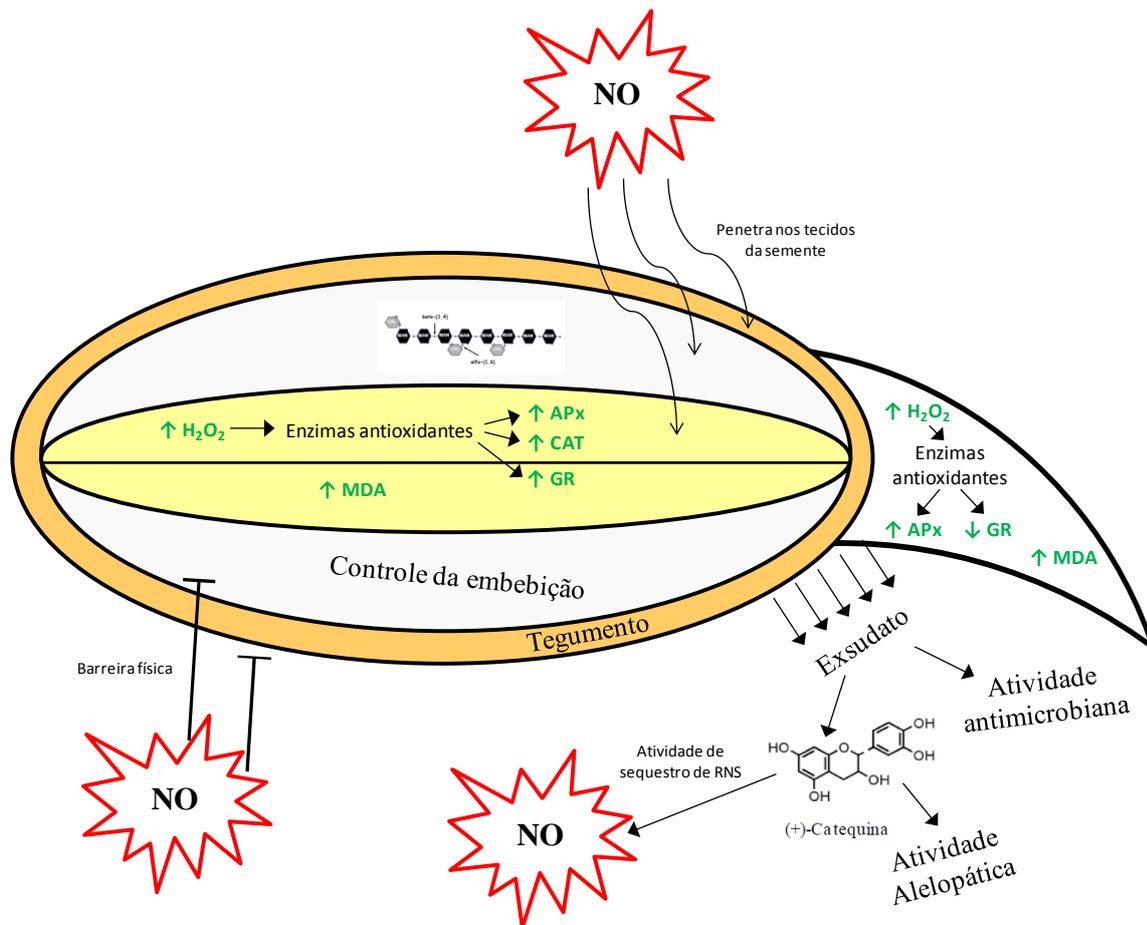


Figura 35. Esquema representando os mecanismos de resposta de *S. virgata* atuantes durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, em condições normais e em situação de estresse abiótico. As sementes de *S. virgata* possuem tegumento que atua como uma barreira física para a entrada de NO e o endosperma composto por galactomanano que controla a entrada de água e NO. Estas sementes também exsudam compostos com atividade antimicrobiana e alelopática, como a catequina, que é capaz de sequestrar o NO exógeno. Apesar dos mecanismos de defesa, parte do NO penetra na semente e atua nos processos de sinalização promovendo o aumento no conteúdo de H₂O₂ em raízes e cotilédones. Este aumento de H₂O₂ promove alterações nas enzimas antioxidantes: ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e glutiona redutase (GR) que atuam na detoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS) para evitar que ocorram danos celulares, como a peroxidação lipídica (malondialdeído - MDA).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abat, J.K. & Deswal, R.** 2009. Differential modulation of S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation of rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* 9: 4368–4380.
- Abello, N., Kerstjens, H.A.M., Postma, D.S. & Bischoff, R.** 2009. Protein tyrosine nitration: selectivity, physicochemical and biological consequences, denitration, and proteomics methods for the identification of tyrosine-nitrated proteins. *Journal of Proteome Research* 8: 3222-3238.
- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R.M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J.B., Del Río, L.A., Palma, J.M. & Corpas, F.J.** 2012. Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant, Cell and Environment* 35: 281–295.
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E.** 2001. The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell and Environment* 24: 1337-1344.
- Alscher, R.G., Erturk, N. & Heath, L.S.** 2002. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *Journal of Experimental Botany* 53: 1331-1341.
- Alves, J.D., Zanandrea, I., Deuner, S., Goulart, P.F.P., de Souza, K.R.D. & Santos, M.O.** 2013. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to waterlogging in *Sesbania virgata*. *Trees* 27: 717–728.
- Annstrong, J.S. & Whiteman, M.** 2007. Measurement of reactive oxygen species in cells and mitochondria. *Methods in Cell Biology* 80: 355-377.
- Anusuya, S. & Sathiyabama, M.** 2014. Identification of defence proteins from the seed exudates of *Cicer arietinum* L. and its effect on the growth of *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceri. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 47: 1611–1620.
- Apel, K. & Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Arasimowicz, M. & Floryszak-Wieczorek, J.** 2007. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Science* 172: 876-887.
- Asensio, A.C., Gil-Monreal, M., Pires, L., Gogorcena, Y., Aparicio-Tejo, P.M. & Moran, J.F.** 2012. Two Fe-superoxide dismutase families respond differently to stress and senescence in legumes. *Journal of Plant Physiology* 169: 1253-1260.

- Astier, J., Rasul, S., Koen, E., Manzoor, H., Benson-Bard, A., Lamotte, O., Jeandroz, S., Durner, J., Lindermayr, C. & Wendehenne, D.** 2011. S-nitrosylation: an emerging post-translational protein modification in plants. *Plant Science* 181: 527-533.
- Badri, D.V., Loyola-Vargas, V.M., Broeckling, C.D., De-la-Peña, C., Jasinski, M., Santelia, D., Martinoia, E., Sumner, L.W., Banta, L.M., Stermitz, F. & Vivanco, J. M.** 2008. Altered profile of secondary metabolites in the root exudates of *Arabidopsis* ATP-binding cassette transporter mutants. *Plant Physiology* 146: 762-771.
- Bai, X., Yang, L., Tian, M., Chen, J., Shi, J., Yang, Y. & Hu, X.** 2011. Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. *PLoS One* 6: e20714.
- Bailly, C.** 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research* 14: 93-107.
- Bailly, C., El-Maarouf-Bouteau, H. & Corbineau, F.** 2008. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus Biologies* 331: 806-814.
- Bais, H.P. & Kaushik, S.** 2010. Catechin secretion and phytotoxicity: fact not fiction. *Communicative and Integrative Biology* 3: 468-470.
- Bais, H.P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R.M. & Vivanco, J.M.** 2003. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.
- Bais, H.P., Walker, T.S., Stermitz, F.R., Hufbauer, R.A. & Vivanco, J.M.** 2002. Enantiomeric-dependent phytotoxic and antimicrobial activity of (+)-catechin. A rhizosecreted racemic mixture from spotted knapweed. *Plant Physiology* 128: 1173-1179.
- Barba-Espin, G., Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Albacete, A., Faize, L., Faize, M., Pérez-Alfocea, F. & Hernández, J.A.** 2010. Interaction between hydrogen peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings. *Plant, Cell and Environment* 33: 981-994.
- Barbour, W.M., Hattermann, D.R. & Stacey, G.** 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Applied and Environmental Microbiology* 57: 2635-2639.
- Bastianetto, S., Zheng, W.H. & Quirion, R.** 2000. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *British Journal of Pharmacology* 131: 711-720.

- Beauchamp, C. & Fridovich, I.** 1971. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 44: 276-287.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., López-Jaramillo, J., Padilla, M.N., Carreras, A., Corpas, F.J. & Barroso, J.B.** 2014. Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by tyrosine nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 65: 527–538.
- Bekkara, F., Jay, M., Viricel, M.R. & Rome, S.** 1998. Distribution of phenolic compounds within seed and seedlings of two *Vicia faba* cvs differing in their seed tannin content, and study of their seed and root phenolic exudations. *Plant and Soil* 203: 27–36.
- Beligni, M.V. & Lamattina, 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.
- Benamar, A., Rolletschek, H., Borisjuk, L., Avelange-Macherel, M.H., Curien, G., Mostefai, H.A., Andriantsitohaina, R. & Macherel, D.** 2008. Nitrite-nitric oxide control of mitochondrial respiration at the frontier of anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 1268-1275.
- Bethke, P.C., Gluber, F., Jacobsen, J.V. & Jones, R.L.** 2004. Dormancy of Arabidopsis seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 219: 847-855.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G., Aoyama, N., Chung, Y.Y., Still, D.W., & Jones, R.L.** 2007. The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiology* 143: 1173-1188.
- 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. New York: Plenum Press, 445p.
- Bewley, J.D.** 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell* 9: 1055-1066.
- Bhattacharjee, S.** 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science* 89: 1113-1121.

- Boaretto, L.F., Carvalho, G., Borgo, L., Creste, S., Landell, M.G.A., Mazzafera, P. & Azevedo, R.A.** 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology and Biochemistry* 74: 165-175.
- Bolaños-Vásquez, M.C. & Werner, D.** 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. phaseoli on nod gene-inducing flavonoids in root exudate of *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 339–346.
- Borisjuk, L., Macherel, D., Benamar, A., Wobus, U. & Rolletschek, H.** 2007. Low oxygen sensing and balancing in plant seeds: a role for nitric oxide. *New Phytologist* 176: 813-823.
- Boscolo, P.R.S., Menossi, M. & Jorge, R.A.** 2003. Aluminum-induced oxidative stress in maize. *Phytochemistry* 62: 181-189.
- Bowler, C., Van Montagu, M. & Inzé, D.** 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 43: 83-116.
- 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.
- 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. *The Plant Journal* 45: 113-122.
- Broadhurst, R. & Jones, W.** 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 29: 788-794.
- Broekaert, W.F., Cammue, B.P.A., De Bolle, M.F.C., Thevissen, K., De Samblanx, G.W. & Osborn, R.W.** 1997. Antimicrobial peptides from plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 16: 297–323.
- Broillet, M.C., Randin, O. & Chatton, J.Y.** 2001. Photoactivation and calcium sensitivity of the fluorescent NO indicator 4,5-diaminofluorescein (DAF-2): implications for cellular NO imaging. *FEBS Letters* 491: 227-232.
- Buckeridge, M.S. & Dietrich, S.M.C.** 1996. Mobilisation of the raffinose family oligosaccharides 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., Tiné, M.A.S., Lima, D.U. & Santos, H.P.** 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. *Plant Physiology and Biochemistry* 38: 141-156.

- Buta, J.G. & Lusby, W.R.** 1986. Catechins as germination and growth inhibitors in *Lespedeza* seeds. *Phytochemistry* 25: 93-95.
- Cai, T., Cai, W., Zhang, J., Zheng, H., Tsou, A.M., Xiao, L., Zhong, Z. & Zhu, J.** 2009. Host legume-exuded antimetabolites optimize the symbiotic rhizosphere. *Molecular Microbiology* 73: 507–517.
- Cammue, B. P., De Bolle, M. F., Terras, F. R., Proost, P., Van Damme, J., Rees, S.B., Vanderleyden, J. & Broekaert, W.F.** 1992. Isolation and characterization of a novel class of plant antimicrobial peptides from *Mirabilis jalapa* L. seeds. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 2228-2233.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4ed. Jaboticabal: FUNEP, 588p.
- Ceballos, L., Hossaert-Mckey, M., Mckey, D. & Andary, C.** 1998. Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of *Sesbania* (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of polyphenolic compounds in anti-pathogen defense of seedlings. *Chemoecology* 8: 141-151.
- Chaki, M., Valderrama, R., Fernández-Ocaña, A., Carreras, A., Gómez-Rodríguez, M.V., Pedrajas, J.R., Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Luque, F., Leterrier, M., Corpas, F.J. & Barroso, J.B.** 2011. Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of Experimental Botany* 62: 1803–1813.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. & Chern, J.C.** 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis* 10: 178–182.
- Chen Z., Silva H. & Klessing D.F.** 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883–1886.
- Chiu K.Y., Chen C.L. & Sung J.M.** 2002. Effect of priming temperature on storability of primed *sh-2* sweet corn seed. *Crop Science* 42: 1996–2003.
- Chobot, V., Huber, C., Trettenhahn, G. & Hadacek, F.** 2009. Catechin: chemical weapon, antioxidant, or stress regulator? *Journal of Chemical Ecology* 35: 980-996.
- Clark, D., Durner, J., Navarre, D.A. & Klessig, D.F.** 2000. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 13: 1380-1384.
- Colville, L., & Kranner, I.** 2010. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regulation* 62: 241-255.

- Corpas, F.J. & Barroso, J.B.** 2013. Nitro-oxidative stress vs oxidative or nitrosative stress in higher plants. *New Phytologist* 199: 633-635.
- Corpas, F.J., Barroso, J.B., Carreras, A., Quirós, M., León, A.M., Romero-Puertas, M.C., Esteban, F.J., Valderrama, R., Palma, J.M., Sandalio, L.M., Gómez, M. & Del Río, L.A.** 2004. Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* 136: 2722-2733.
- Corpas, F.J., Carreras, A., Valderrama, R., Chaki, M., Palma, J.M., Del Río, L.A. & Barroso, J.B.** 2007. Reactive nitrogen species and nitrosative stress in plants. *Plant Stress* 1: 37-41.
- Corpas, F.J., Chaki, M., Fernandez-Ocana, A., Valderrama, R., Palma, J.M., Carreras, A., Begara-Morales, J.C., Airaki, M. & Del Río, L.A.** 2008. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology* 49: 1711-1722.
- Corpas, F.J., Leterrier, M., Valderrama, R., Airaki, M., Chaki, M., Palma, J.M. & Barroso, J.B.** 2011. Nitric oxide imbalance provokes a nitrosative response in plants under abiotic stress. *Plant Science* 181: 604-611.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Del Río, L.A. & Barroso, J.B.** 2009. Evidence supporting the existence of l-arginine-dependent nitric oxide synthase activity in plants. *New Phytologist* 184: 9-14.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Luis, A. & Barroso, J.B.** 2013. Protein tyrosine nitration in higher plants grown under natural and stress conditions. *Frontiers in Plant Science* 4:29.
- 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.
- Coutinho, M.P., Carneiro, J.G.A., Barroso, D.G., Rodrigues, L.A., Figueiredo, F.A.M. M.A., Mendonça, A.V.R. & Novaes, A.B.** 2005. Crescimento de mudas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. plantadas em uma área degradada por extração de argila. *Floresta* 35: 231-239.
- Crawford, N.M., Galli, M., Tischner, R. Heimer, Y.M., Okamoto, M. & Mack, A.** 2006. Response to Zemojtel et al: plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends in Plant Science* 11: 526-527.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. & Lewis, N.G.** 2000. Natural products (secondary metabolites). In: B.B. Buchanan, W. Gruissem & R.L. Jones (eds.). *Biochemistry and molecular biology of plants*. Wiley. pp. 1250-1319.

- Cruz-Ortega, R., Ayala-Cordero, G. & Anaya, A.L.** 2002. Allelochemical stress produced by the aqueous leachate of *Callicarpa acuminata*: effects on roots of bean, maize, and tomato. *Physiologia Plantarum* 116: 20–27.
- Cruz-Ortega, R., Lara-Nunez, A. & Anaya, A.L.** 2007. Allelochemical stress can trigger oxidative damage in receptor plants. *Plant Signaling and Behavior* 2: 269–270.
- Davies, B.J.** 1971. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum protein. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404-427.
- De Araújo, E.D., Mendonça, A.V.R., Barroso, D.G., Lamônica, K.R. & Silva, R.F.D.** 2004. Caracterização morfológica de frutos, sementes e plântulas de *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Revista Brasileira de Sementes* 26: 104-109.
- De Gara, L., de Pinto, M.C. & Arrigoni, O.** 1997. Ascorbate synthesis and ascorbate peroxidase activity during the early stage of wheat germination. *Physiologia Plantarum* 100: 894–900.
- De Pinto, M.C., Tommasi, F. & De Gara, L.** 2002. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco bright-yellow 2 cells. *Plant Physiology* 130: 698-708.
- 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.
- Del Río, L.A., Corpas, F.J. & Barroso, J.B.** 2004. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. *Phytochemistry* 65: 783–792.
- Del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M. & Barroso, J.B.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141: 330-335.
- Delledonne, M.** 2005. NO news is good news for plants. *Currunt 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.
- Delledonne, M., Zeier, J., Marocco, A. & Lamb, C.** 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 13454-13459.

- Derakhshan, B., Hao, G. & Gross, S.S.** 2007. Balancing reactivity against selectivity: the evolution of protein S-nitrosylation as an effector of cell signaling by nitric oxide. *Cardiovascular Research* 75: 210–219.
- 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* 99: 16314–16318.
- Diz, M.S.S., Carvalho, A.O. & Gomes, V.M.** 2003. Purification and molecular mass determination of a lipid transfer protein exuded from *Vigna unguiculata* seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 15:171-175.
- Dong, J., Zhang, M., Lu, L., Sun, L. & Xu, M.** 2012. Nitric oxide fumigation stimulates flavonoid and phenolic accumulation and enhances antioxidant activity of mushroom. *Food chemistry* 135: 1220-1225.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-355.
- Duke, S.O., Blair, A.C., Dayan, F.E., Johnson, R.D., Meepagala, K.M., Cook, D. & Bajsa, J.** 2009. Is (-) catechin a “novel weapon” of spotted knapweed (*Centaurea stoebe*)? *Journal of Chemical Ecology* 35: 141-153.
- Durner, J. & Klessig, D.F.** 1999. Nitric oxide as a signal in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 369–374.
- Durzan, D.J. & Pedroso, M.C.** 2002. Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 19: 293–337.
- 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.
- El Id, V.L., da Costa, B.V., Mignoni, D.S.B., Veronesi, M.B., Simões, K., Braga, M.R., & dos Santos Junior, N.A.** 2015. Phytotoxic effect of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. on seeds of agronomic and forestry species. *Journal of Forestry Research* 26: 339-346.
- 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.

- Fan, H.F., Du, C.X., Ding, L. & Xu, Y.L.** 2014. Exogenous nitric oxide promotes waterlogging tolerance as related to the activities of antioxidant enzymes in cucumber seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* 61: 366-373.
- Fares, A., Rossignol, M. & Peltier, J.B.** 2011. Proteomics investigation of endogenous S-nitrosylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 416: 331-336.
- Feelisch, M.** 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358: 113-122.
- Ferreira, R.R., Fornazier, R.F., Vitória, A.P., Lea, P.J. & Azevedo, R.A.** 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* 25: 327-342.
- Foyer, C.H. & Halliwell, B.** 1976. The presence of glutathione and glutathione reductase in chloroplasts: a proposed role in ascorbic acid metabolism. *Planta* 133: 21-25.
- Foyer, C.H. & Noctor, G.** 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Friedman, J. & Waller, G.R.** 1983. Seeds as allelopathic agents. *Journal of Chemical Ecology* 9: 1107-1117.
- Frunghillo, L., de Oliveira, J.F.P., Saviani, E.E., Oliveira, H.C., Martínez, M.C., & Salgado, I.** 2013. Modulation of mitochondrial activity by S-nitrosoglutathione reductase in *Arabidopsis thaliana* transgenic cell lines. *Biochimica et Biophysica Acta* 1827: 239-247.
- Gallardo, K., Job, C., Groot, S.P.C., Puype, M., Demol, H., Vandekerckhove, J. & Job, D.** 2001. Proteomic analysis of *Arabidopsis* seed germination and priming. *Plant Physiology* 126: 835-848.
- Garcês, H., Durzan, D. & Pedroso, M. C.** 2001. Mechanical stress elicits nitric oxide formation and DNA fragmentation in *Arabidopsis thaliana*. *Annals of Botany* 87: 567-574.
- 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.
- Gill, S.S. & Tuteja, N.** 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48: 909-930.

- Gniazdowska, A. & Bogatek, R.** 2005. Allelopathic interaction between plants. Multi site action of allelochemicals. *Acta Physiologiae Plantarum* 27: 395–408.
- Gniazdowska, A., Babańczyk, T. & Krasuska, U.** 2012. Nitric oxide as germination controlling factor in seeds of various plant species. *Phyton-Annales Rei Botanicae* 52: 219-226.
- Gniazdowska, A., Krasuska, U., Andrzejczak, O. & Soltys, D.** 2015. Allelopathic compounds as oxidative stress agents: yes or no. In: K.J. Gupta & A.U. Igamberdiev (eds.). *Reactive oxygen and nitrogen species signaling and communication in plants*. Springer International Publishing. pp. 155-176.
- Gniazdowska, A., Krasuska, U., Czajkowska, K. & Bogatek, R.** 2010. Nitric oxide, hydrogen cyanide and ethylene are required in the control of germination and undisturbed development of young apple seedlings. *Plant Growth Regulation* 61: 75-84.
- Gorst-Allman, C.P., Steyn, P.S., Vlegaar, R. & Grobbelaar, N.** 1984. Structure elucidation of sesbanimide using highfield NMR spectroscopy. *Journal of the Chemical Society* 1: 1311–1314.
- Graham, T.L.** 1991. Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiology* 95: 594-603.
- Guo, F., Okamoto, M. & Crawford, N.M.** 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100–103.
- Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J. & Xin, W.** 1999. ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1427: 13-23.
- Hagerman, A.E. & Butler, L.G.** 1989. Choosing appropriate methods and standards for assaying tannin. *Journal of Chemical Ecology* 15: 1795-1810.
- Hahlbrock, K., Bednarek, P., Ciolkowski, I., Hamberger, B., Heise, A., Liedgens, H., Logemann, E., Nürnberger, T., Schmelzer, E., Somssich, I.E. & Tan, J.** 2003. Non-self recognition, transcriptional reprogramming, and secondary metabolite accumulation during plant/pathogen interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 14569-14576.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, Oxford.
- Harborne, J.B. & Williams, C.A.** 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481–504.

- Hartwig, U.A., Joseph, C.M. & Phillips, D.A.** 1991. Flavonoids released naturally from alfalfa seeds enhance growth rate of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiology* 95: 797-803.
- Hasegawa, K., Mizutani, J., Kosemura, S. & Yamamura, S.** 1992. Isolation and identification of lepidimoide, a new allelopathic substance from mucilage of germinated cress seeds. *Plant Physiology* 100: 1059-1061.
- 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.
- Henry, Y.A., Ducastel, B. & Guissani, A.** 1997. Basic chemistry of nitric oxide and related nitrogen oxides. In: Y.A. Henry, B. Ducastel & A. Guissani (eds.). *Nitric oxide research from chemistry to biology: EPR spectroscopy of nitrosylated compounds* R.G. Landes Company, Austin, USA. pp. 15-46.
- Homans, A.L. & Fuchs, A.** 1970. Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography A* 51: 327-329.
- Hu, K.D., Hu, L.Y., Li, Y.H., Zhang, F.Q. & Zhang, H.** 2007. Protective roles of nitric oxide on germination and antioxidant metabolism in wheat seeds under copper stress. *Plant Growth Regulation* 53: 173-183.
- Hu, X., Neill, S. & Cai, W.** 2003. Nitric oxide mediates elicitor-induced saponin synthesis in cell cultures of *Panax ginseng*. *Functional Plant Biology* 30: 901-907.
- 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.
- Hungria, M., Joseph, C.M. & Phillips, D.A.** 1991. Anthocyanidins and flavonols, major nod gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiology* 97: 751-758.
- Inderjit, Pollock, J.L., Callaway, R.M. & Holben, W.** 2008. Phytotoxic effects of (±)-catechin *in vitro*, in soil, and in the field. *PLoS One* 3: 1-11.
- Iqbal, A. & Fry, S.C.** 2012. Potent endogenous allelopathic compounds in *Lepidium sativum* seed exudate: effects on epidermal cell growth in *Amaranthus caudatus* seedlings. *Journal of Experimental Botany* 63: 2595-2604.
- Iqbal, Z., Hiradate, S., Noda, A., Isojima, S. & Fujii, Y.** 2003. Allelopathic activity of buckwheat: isolation and characterization of phenolics. *Weed Science* 51: 657-662.
- Ismail, G.S.M.** 2012. Protective role of nitric oxide against arsenic-induced damages in germinating mung bean seeds. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 1303-1311.

- 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.
- Kagan, I.A., Rimando, A.M. & Dayan, F.E.** 2003. Chromatographic separation and in vitro activity of sorgoleone congeners from the roots of *Sorghum bicolor*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 7589-7595.
- Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N. & Lugtenberg, B.** 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 250-256.
- Kanematsu, S. & Asada, K.** 1990. Characteristic amino acid sequences of chloroplast and cytosol isozymes of CuZn-superoxide dismutase in spinach, rice and horsetail. *Plant and Cell Physiology* 31: 99-112.
- Karpinska, B., Karlsson, M., Schinkel, H., Streller, S., Süß, K.H., Melzer, M. & Wingsle, G.** 2001. A novel superoxide dismutase with a high isoelectric point in higher plants. Expression, regulation, and protein localization. *Plant Physiology* 126: 1668-1677.
- Kato, K. & Arima, Y.** 2006. Potential of seed and root exudates of the common bean *Phaseolus vulgaris* L. for immediate induction of rhizobial chemotaxis and nod genes. *Soil Science and Plant Nutrition* 52: 432-437.
- Kissmann, K.G. & Groth, D.** 1999. *Plantas infestantes e nocivas*. Tomo II. BASF, São Paulo. pp. 947-950.
- Kobayashi, L., Adoriam, A.I., de Paiva Neto, V.B., Alves, C.Z. & Zuffo, M.C.R.** 2011. Incidência de fungos em sementes de pinhão-mansão. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 41: 385-390.
- Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y. & Nagano, T.** 1998. Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Analytical Chemistry* 70: 2446–2453.
- Kolesnik, B., Palten, K., Schrammel, A., Stessel, H., Schmidt, K., Mayer, B. & Gorren, A.C.** 2013. Efficient nitrosation of glutathione by nitric oxide. *Free Radical Biology and Medicine* 63: 51-64.
- 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.

- Korkina, L.G. & Afanas'ev, I.B.** 1997. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Advances in Pharmacology* 38: 151–166.
- Korystov Y.N. & Narimanov A.A.** 1997. Low doses of ionizing radiation and hydrogen peroxide stimulate plant growth. *Biologia (Bratislava)* 52: 121–124.
- Krasuska, U. & Gniazdowska, A.** 2012. Nitric oxide and hydrogen cyanide as regulating factors of enzymatic antioxidant system in germinating apple embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* 34: 683-692.
- Lara-Nuñez, A., Romero-Romero, T., Ventura, J.L., Blancas, V., Anaya A.L. & Cruz-Ortega R.** 2006. Allelochemical stress causes inhibition of growth and oxidative damage in *Lycopersicon esculentum* Mill. *Plant, Cell and Environment* 29: 2009-2016.
- Laspina, N.V., Groppa, M.D., Tomaro, M.L. & Benavides, M.P.** 2005. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. *Plant Science* 169: 323–330.
- 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.
- Leitner, M., Vandelle, E., Gaupels, F., Bellin, D. & Delledonne, M.** 2009. NO signals in the haze: Nitric oxide signaling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 451-458.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J. M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. & Caboche, M.** 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annual Review of Plant Biology* 57: 405-430.
- Leterrier, M., Barroso, J.B., Valderrama, R., Palma, J.M. & Corpas, F.J.** 2012. NADP-dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis* roots contributes in the mechanism of defence against the nitro-oxidative stress induced by salinity. *The Scientific World Journal* 2012: 694740.
- Leterrier, M., Chaki, M., Airaki, M., Valderrama, R., Palma, J.M., Barroso, J.B. & Corpas, F.J.** 2011. Function of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 6: 789-793.
- Leung, E.H.W., Wong, J.H. & Ng, T.B.** 2008. Concurrent purification of two defense proteins from French bean seeds: a defensin-like antifungal peptide and a hemagglutinin. *Journal of Peptide Science* 14: 349-353.
- Lima Neto, J.S., Gramosa, N.V. & Silveira, E.R.** 2008. Constituintes químicos de frutos de *Copaifera langsdorfii* Desf. *Química Nova* 31: 1078-1080.

- Lindermayr, C., Saalbach, G. & Durner, J.** 2005. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. *Plant Physiology* 137: 921-930.
- 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.
- Liu, L.M., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J. & Stamler, J.S.** 2001. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410: 490–494.
- Liu, Y.G., Ye, N.H., Liu, R., Chen, M.X. & Zhang, J.H.** 2010. H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination. *Journal of Experimental Botany* 61: 2979–2990.
- 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.
- Lugtenberg, B.** 2015. Life of Microbes in the Rhizosphere. In: B. Lugtenberg (ed.). *Principles of Plant-Microbe Interactions*. Springer International Publishing. pp. 7-15.
- Marino, S.M. & Gladyshev, V.N.** 2010. Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. *Journal of Molecular Biology* 395: 844–859.
- Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M.** 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40: 255-260.
- Mayer, A.M. & Poljakoff-Mayber, A.** 1982. *The germination of seeds*: Pergamon International Library of Science, Technology, Engineering and Social Studies. Elsevier.
- Mayer, A.M. & Shain, Y.** 1974. Control of seed germination. *Annual Review of Plant Physiology* 25: 167-193.
- Mendes, M.A.S. & Urban, A.F.** 2014. Fungos relatados em plantas no Brasil, Laboratório de Quarentena Vegetal. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Disponível em: <http://pragawall.cenargen.embrapa.br/aiqweb/michtml/fgbanco01.asp>. Acesso em: 10/03/2015.

- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. & Van Breusegem, F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Mittler, R. & Poulos, T.L.** 2005. Ascorbate peroxidase. In: Smirnoff N, editor. *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Oxford: Blackwell Publishing p. 87-100.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M.G., 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 Letters* 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.
- Modolo, L.V., Cunha, F.Q., Braga, M.R. & Salgado, I.** 2002. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorumf. Sp. meridionalis* elicitor. *Plant Physiology* 130: 1288-1297.
- Molassiotis, A. & Fotopoulos, V.** 2011. Oxidative and nitrosative signaling in plants: two branches in the same tree? *Plant Signaling and Behavior* 6: 210-214.
- Morrow, J.D.** 2003. Is oxidant stress a connection between obesity and atherosclerosis? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 23: 368-370.
- Müller, K., Job, C., Belghazi, M., Job, D. & Leubner-Metzger, G.** 2010. Proteomics reveal tissue-specific features of the cress (*Lepidium sativum* L.) endosperm cap proteome and its hormone-induced changes during seed germination. *Proteomics* 10: 406-416.
- Mur, L. A., Mandon, J., Persijn, S., Cristescu, S.M., Moshkov, I.E., Novikova, G.V., Hall, M.A., Harren, F.J.M., Hebelstrup, K.H. & Gupta, K. J.** 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB Plants* 5: pls052.
- Murashige, T. & Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Nakagawa, T. & Yokozawa, T.** 2002. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. *Food and Chemical Toxicology* 40: 1745-1750.
- Nakano, Y. & Asada, K.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867–880.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E. & Jacquot, J.P.** 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129: 185-195.

- Ndakidemi, P.A. & Dakora, F.D.** 2003. Legume seed flavonoids and nitrogenous metabolites as signals and protectants in early seedling development. *Functional Plant Biology* 30: 729-745.
- Neill, S.J., Desikan, R. & Hancock, J.T.** 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* 159: 11–35.
- Nelson, E.B.** 2004. Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annual Review of Phytopathology* 42: 271-309.
- Ng, E.S.M. & Kubes, P.** 2003. The physiology of S-nitrosothiols: carrier molecules for nitric oxide. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 81: 759–764.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K. & van Leeuwen, P.A.M.** 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition* 74: 418–25.
- Nóbrega, F.M., Santos, I.S., Da Cunha, M., Carvalho, A.O. & Gomes, V.M.** 2005. Antimicrobial proteins from cowpea root exudates: inhibitory activity against *Fusarium oxysporum* and purification of a chitinase-like protein. *Plant and Soil* 272: 223–232.
- Noctor, G. & Foyer, C.H.** 1998. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Biology* 49: 249-279.
- Ogawa K. & Iwabuchi M.** 2001. A mechanism for promoting the germination of *Zinnia elegans* seeds by hydrogen peroxide. *Plant and Cell Physiology* 42: 286–291.
- Oliveira, H.C., Salgado, I. & Sodek, L.** 2013. Involvement of nitrite in the nitrate-mediated modulation of fermentative metabolism and nitric oxide production of soybean roots during hypoxia. *Planta* 237: 255-264.
- Oracz, K., Bailly, C., Gniazdowska, A., Come, D., Corbineau, F. & Bogatek, R.** 2007. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *Journal of Chemical Ecology* 33: 251–264.
- Oracz, K., El-Maarouf-Bouteau, H., Kranner, I., Bogatek, R., Corbineau, F. & Bailly, C.** 2009. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination. *Plant Physiology* 150: 494-505.
- 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.

- Pang, Y., Peel, G.J., Wright, E., Wang, Z. & Dixon, R.A.** 2007. Early steps in proanthocyanidins biosynthesis in the model legume *Medicago truncatula*. *Plant Physiology* 145: 601-615.
- Paquay, J.B.G., Haenen, G.R.M.M., Stender, G., Wiseman, S.A., Tijburg, L.B.M. & Bast, A.** 2000. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 5768-5772.
- Parani, M.R., Myers, R., Weirich, H., Smith, B., Leaman, D.W. & Goldman, S.L.** 2004. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology Journal* 2: 359–366.
- Pastori, G.M. & Del Río, L.A.** 1997. Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function of peroxisomes. *Plant Physiology* 113: 411–418.
- Pelegrini, P.B., Noronha, E.F., Muniz, M.A.R., Vasconceos, I.M., Chiarello, M.D. Oliveira, J.T.A. & Franco, O.L.** 2006. An antifungal peptide from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 174: 1141-1146.
- Peters, N.K. & Long, S.R.** 1988. Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiology* 88: 96–400.
- Planchet, E., Gupta, K.J., Sonoda, M. & Kaiser, W.M.** 2005. Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *The Plant Journal* 41: 732-743.
- Pollock, J.L., Kogan, L.A., Thorpe, A.S. & Holben, W.E.** 2011. (±)-Catechin, a root exudate of the invasive *Centaurea stoebe* Lam. (spotted knapweed) exhibits bacteriostatic activity against multiple soil bacterial populations. *Journal of Chemical Ecology* 37: 1044–1053.
- Posmyk M.M., Corbineau F., Vinel D., Bailly C. & Côme D.** 2001. Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage induced by chilling in soybean seeds. *Physiologia Plantarum* 111: 473–482.
- 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.
- Pott, A. & Pott, V.J.** 1994. *Plantas do Pantanal*. EMPRAPA/CPAP/SPI, Corumbá, 320p.
- Powell, R.G., Plattner, R.D. & Suffness, M.** 1990. Occurrence of sesbanimide in seeds of toxic *Sesbania* species. *Weed Science* 38: 148-152.

- Praxedes, P.G., Zerlin, J.K., Dias, L.O. & Pessoni, R.A.B.** 2011. A novel antifungal protein from seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae-Faboideae). Brazilian Journal of Biology 71: 687-692.
- Pritchard, S.L., Charlton, W.L., Baker, A. & Graham, I.A.** 2002. Germination and storage reserve mobilization are regulated independently in Arabidopsis. The Plant Journal 31: 639-647.
- Puntarulo, S., Galleano, M., Sanchez, R.A. & Boveris, A.** 1991. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. Biochemical and Biophysical Acta 1074: 277-283.
- Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., Brouquisse, R.** 2013. Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-Rhizobium and mycorrhizal symbioses. Antioxidants & Redox Signaling 18: 2202-2219.
- Ramirez, L., Simontacchi, M., Murgia, I., Zabaleta, E. & Lamattina, L.** 2011. Nitric oxide, nitrosyl iron complexes, ferritin and frataxin: a well equipped team to preserve plant iron homeostasis. Plant Science 181: 582-592.
- Rice, E.L.** 1984. Allelopathy. Academic Press, Orlando.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J. & Kaiser, W.M.** 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. 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. The Plant Cell 13: 11-29.
- Romero-Puertas, M.C., Camprostrini, N., Mattè, A., Righetti, P.G., Perazzolli, M., Zolla, L., Roepstorff, P. & Delledonne, M.** 2008. Proteomic analysis of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis thaliana undergoing hypersensitive response. Proteomics 8: 1459-1469.
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gomez, M.D., Del Río, L.A. & Sandalio, L.M.** 2004. Cadmium-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. Plant, Cell and Environment 27: 1122-1134.
- Rubbo, H., Batthyany, C. & Radi, R.** 2000. Nitric oxide-oxygen radical interactions in atherosclerosis. Biological Research 33: 167-175.
- Rubio, M.C.** 2011. Superóxido dimustasas de nodulos de leguminosas. Tese de doutorado, Universidad Zaragoza, Zaragoza, España. Disponível em: <http://digital.csic.es/handle/10261/9641>.

- Rubio, M.C., Becana, M., Kanematsu, S., Ushimaru, T. & James, E.K.** 2009. Immunolocalization of antioxidant enzymes in high-pressure frozen root and stem nodules of *Sesbania rostrata*. *New Phytologist* 183: 395-407.
- Sairam, R.K., Kumutha, D. & Ezhilmathi, K.** 2009. Waterlogging tolerance: nonsymbiotic haemoglobin–nitric oxide homeostasis and antioxidants. *Current Science* 96: 674-682.
- Salgado, I., Oliveira, H.C. & Gaspar, M.** 2015. Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. In: G.K. Pandey (ed.). *Mechanism of plant hormone signaling under stress*. Wiley. In press.
- Sandalio, L.M., Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M. C. & Luis, A.** 2008. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide in vivo in plant tissues. *Methods in Enzymology* 440: 397-409.
- Sarath, G., Bethke, P.C., Jones, R., Baird, L.M., Hou, G. & Mitchell, R.B.** 2006. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-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.
- Sarkar, A. & Bhaduri, A.** 2001. Black tea is a powerful chemopreventor of reactive oxygen and nitrogen species: comparison with its individual catechin constituents and green tea. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284: 173-178.
- Schaedler, M. & Bassham, J.A.** 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology* 59: 1011-1012.
- Sehrawat, A., Gupta, R. & Deswal, R.** 2013. Nitric oxide-cold stress signalling cross-talk, evolution of a novel regulatory mechanism. *Proteomics* 13: 1816–1835.
- 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.
- Shaw, L.J., Morris, P. & Hooker, J.E.** 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environmental Microbiology* 8: 1867-1880.
- Sheokand, S., Kumari, A. & Sawhney, V.** 2008. Effect of nitric oxide and putrescine on antioxidative responses under NaCl stress in chickpea plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 14: 355-362.
- Shirley, B.W.** 1998. Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Science Research* 8: 415-422.

- Signorelli, S., Corpas, F.J., Borsani, O., Barroso, J.B. & Monza, J.** 2013. Water stress induces a differential and spatially distributed nitro-oxidative stress response in roots and leaves of *Lotus japonicus*. *Plant Science* 201: 137-146.
- Silva, L.B., Sales, M.P., Oliveira, A.E.A., Machado, O.L.T., Fernandes, K.V.S. & Xavier-Filho, J.** 2004. The seed coat of *Phaseolus vulgaris* interferes with the development of the cowpea weevil [*Callosobruchus maculatus* (F.)(Coleoptera: Bruchidae)]. *Anais da Acadêmica Brasileira de Ciências* 76: 57-65.
- 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, Campinas, SP.
- Simões, K., Du, J., Pessoni, R.A., Cardoso-Lopes, E.M., Vivanco, J.M., Stermitz, F.R. & Braga, M.R.** 2009. Ipomopsin and hymenain, two biscoumarins from seeds of *Hymenaea courbaril*. *Phytochemistry Letters* 2: 59-62.
- Simões, K., Du, J., Kretschmar, F.S., Broekling, C.D., Stermitz, F.S., Vivanco, J.M. & Braga, M.R.** 2008. Phytotoxic catechin leached by seeds of the tropical weed *Sesbania virgata*. *Journal of Chemical Ecology* 34: 681-687.
- Simontacchi, M., Jasid, S. & Puntarulo, S.** 2004. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Science* 167: 839-847.
- Singh, P.J. & Mehrotra, R.S.** 1980. Relation between seed exudate and host susceptibility in gram (*Cicer arietinum* L.) to *Rhizoctonia bataticola*. *Plant and Soil* 56: 265-271.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661 – 669.
- Somers, E., Vanderleyden, J. & Srinivasan, M.** 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology* 30: 205-240.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61-68.
- Souza, V.C., Andrade, L.A., Bezerra, F.T.C., Fabricante, J.R. & Feitosa, R.C.** 2011. Evaluation population of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Fabaceae Lindl.), on the banks of Paraíba river. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 6: 314–320.
- Stamler, J.S., Lamas, S. & Fang, F.C.** 2001. Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675–683.
- Steele, H.L., Werner, D. & Cooper, J.E.** 1999. Flavonoids in seed and root exudates of *Lotus pedunculatus* and their biotransformation by *Mesorhizobium loti*. *Physiologia Plantarum* 107: 251–258.

- Stewart, R.R.C. & Bewley, J.D.** 1980. Lipid peroxidation associated aging of soybean axes. *Plant Physiology* 65: 245-248.
- Stohr, C., Strube, F., Marx, G., Ullrich, W.R. & Rockel, P.** 2001. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 212: 835–841.
- Stör, C. & Stremlau, S.** 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plants roots. *Journal of Experimental Botany* 57: 463-470.
- Sudha, G. & Ravishankar, G.A.** 2002. Involvement and interaction of various signaling compounds on the plant metabolic events during defense response, resistance to stress factors, formation of secondary metabolites and their molecular aspects. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71: 181-212.
- Taiz, L. & Zeiger, E.** 2004. *Fisiologia Vegetal*. Tradução: Santarém, E.R.; Mariath, J.E.A.; Astarita, L.V.; Dillenburg, L.R.; Rosa, L.M.G. & Oliveira, P.L. 3ed. Artmed, Porto Alegre. 719p.
- Takahashi, L., Sert, M. A., Kelmer-Bracht, A. M., Bracht, A., & Ishii-Iwamoto, E. L.** 1998. Effects of rutin and quercetin on mitochondrial metabolism and on ATP levels in germinating tissues of *Glycine max*. *Plant Physiology and Biochemistry* 36: 495-501.
- Tanou, G., Filippou, P., Belghazi, M., Job, D., Diamantidis, G., Fotopoulos, V. & Molassiotis, A.** 2012. Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *The Plant Journal* 72: 585–599.
- Teasdale, J.R., Rice, C.P., Cai, G. & Mangum, R.W.** 2012. Expression of allelopathy in the soil environment: soil concentration and activity of benzoxazinoid compounds released by rye cover crop residue. *Plant Ecology* 213: 1893–1905.
- Terras, F.R., Goderis, I.J., Van Leuven, F., Vanderleyden, J., Cammue, B.P., & Broekaert, W.F.** 1992. In vitro antifungal activity of a radish (*Raphanus sativus* L.) seed protein homologous to nonspecific lipid transfer proteins. *Plant Physiology* 100: 1055-1058.
- Tewari, R.K., Kim, S., 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.
- Tewari, R.K., Lee, S.Y., Hahn, E.J., & Paek, K.Y.** 2007. Temporal changes in the growth, saponin content and antioxidant defense in the adventitious roots of *Panax ginseng* subjected to nitric oxide elicitation. *Plant Biotechnology Reports* 1: 227-235.

- Tommasi, F., Paciolla, C., de Pinto, M.C. & De Gara, L.** 2001. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 52: 1647-1654.
- 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.
- Torsethaugen, G., Pitcher, L.H., Zilinskas, B.A. & Pell, E.J.** 1997. Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone. *Plant Physiology* 114: 529–537.
- Tun, N.N., Santa-Catarina, C., Begum, T., Silveira, V., Handro, W., Floh, E.I.S. & Scherer, G.F.E.** 2006. Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant and Cell Physiology* 47: 346–354.
- Valderrama, R., Corpas, F.J., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M.V., Colmenero-Varea, P., Del Río, L.A. & Barroso, J.B.** 2007. Nitrosative stress in plants. *FEBS Letters* 581: 453–461.
- Van Staden, J. & Grobbelaar, N.** 1995. The effect of sesbanimide and *Sesbania* seed extracts on germination and seedling growth of a number of plant species. *Environmental and Experimental Botany* 35: 321–329.
- Van Staden, J., Manning, J.C. & Dickens, C.W.S.** 1987. A phylogenetic analysis of the role of plant hormones in the development and germination of legume seeds. *In*: STIRTON, C.H. *Advances in legume systematics*. Parte 3. Royal Botanic Gardens, Kew. p. 387-432.
- Veiga Junior, V., Andrade Junior, M.A., Ferraz, I.D.K, Christo, H.B. & Pinto, A.C.** 2007. Constituinte das sementes de *Copaifera officinalis* L. *Acta Amazônica* 37: 123-126.

- Veluri, R., Weir, T.L., Bais, H.P., Stermitz, F.R. & Vivanco, J.M.** 2004. Phytotoxic and antimicrobial activities of catechin derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 1077-1082.
- Vitor, S.C., Duarte, G.T., Saviani, E.E., Vincentz, M.G.A., Oliveira, H.C. & Salgado, I.** 2013. Nitrate reductase is required for the transcriptional modulation and bactericidal activity of nitric oxide during the defense response of *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae*. *Planta* 238: 475-486.
- Wang, C.M., Li, T.C., Jhan, Y.L., Weng, J.H. & Chou, C.H.** 2013. The impact of microbial biotransformation of catechin in enhancing the allelopathic effects of *Rhododendron formosanum*. *PLoS ONE* 8:12.
- Wang, H., Provan, G.J. & Helliwell, K.** 2003. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chemistry* 81: 307–312.
- Wang, H.X. & Ng, T.B.** 2003. Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate and glycine residues from black pumpkin seeds. *Peptides* 24: 969–972.
- Wang, J., Zhu, J., Liu, S., Liu, B., Gao, Y. & Wu, Z.** 2011. Generation of reactive oxygen species in cyanobacteria and green algae induced by allelochemicals of submerged macrophytes. *Chemosphere* 85: 977-982.
- Wang, J.W. & Wu, J.Y.** 2005. Nitric oxide is involved in methyl jasmonate-induced defense responses and secondary metabolism activities of *Taxus* cells. *Plant and Cell Physiology* 46: 923-930.
- Wang, Y., Yun, B.W., Kwon, E.J., Hong, J.K., Yoon, J. & Loake, G.J.** 2006. S-nitrosylation: an emerging redox-based post-translational modification in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 1777–1784.
- Wang, Y.S. & Yang, Z.M.** 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* 46: 1915-1923.
- Weir, T.L., Bais, H.P., Stull, V.J., Callaway, R.M., Thelen, G.C., Ridenour, W.M., Bhamidi, S., Stermitz, F.R. & Vivanco, J.M.** 2006. Oxalate contributes to the resistance of *Gaillardia grandiflora* and *Lupinus sericeus* to a phytotoxin produced by *Centaurea maculosa*. *Planta* 223: 785-795.
- Weir, T.L., Park, S-W. & Vivanco, J.M.** 2004. Biochemical and physiological mechanisms mediated by allelochemicals. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 472- 479.
- Wilson, I.D., Neill, S.J. & Hancock, J.T.** 2008. Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant Cell and Environment* 31: 622–631.

- Wojtaszek, P.** 2000. Nitric oxide in plants – To NO or not to NO. *Phytochemistry* 54: 1–4.
- Wu, C.H., Tewari, R.K., Hahn, E.J. & Paek, K.Y.** 2007. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Journal of Plant Biology* 50: 636-643.
- Wu, S.J., Qi, J.L., Zhang, W.J., Liu, S.H., Xiao, F.H., Zhang, M.S., Xu, G.H., Zhao, W.G., Shi, M.W., Pang, Y.J., Shen, H.G. & Yang, Y.H.** 2009. Nitric oxide regulates shikonin formation in suspension-cultured *Onosma paniculatum* cells. *Plant and Cell Physiology* 50: 118-128.
- Xu, M. & Dong, J.** 2005. Elicitor-induced nitric oxide burst is essential for triggering catharanthine synthesis in *Catharanthus roseus* suspension cells. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67: 40-44.
- Xu, M., Dong, J. & Zhang, G.** 2005b. Enhancement of hypericin production and cell growth of *Hypericum perforatum* L. suspension culture by nitric oxide. *Chinese Journal of Biotechnology* 21: 66–70.
- Xu, M., Dong, J. & Zhu, M.** 2005a. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of *Hypericum perforatum* cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. *Plant Physiology* 139: 991-998.
- Xu, M., Dong, J. & Zhu, M.** 2006. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced puerarin biosynthesis in *Pueraria thomsonii* Benth. suspension cells through a salicylic acid (SA)-dependent and a jasmonic acid (JA)-dependent signal pathway. *Science in China Series C: Life Sciences* 49: 379-389.
- Ye, X., Kim, W.S., Rubakhin, S.S. & Sweedler, J.V.** 2004. Measurement of nitric oxide by 4,5-diaminofluorescein without interferences. *Analyst* 129: 1200-1205.
- Yilmaz, Y. & Toledo, R.T.** 2004. Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 255-260.
- Yu, C.C., Hung, K.T. & Kao, C.H.** 2005. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH₄⁺ accumulation in rice leaves. *Journal of Plant Physiology* 162: 1319-1330.
- Zago, E., Morsa, S., Dat, J.F., Alard, P., Ferrarini, A., Inze, D., Delledonne, M. & Van Breusegem, F.** 2006. Nitric oxide- and hydrogen peroxide responsive gene regulation during cell death induction in tobacco. *Plant Physiology* 141: 404-411.
- Zanandrea, I., Alves, J.D., Deuner, S., Goulart, P.F.P., Henrique, P.C. & Silveira, N.M.** 2010. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. *Australian Journal of Botany* 57: 661–669.

- Zayat, A.G.** 1996. Termibiologia da germinação de sementes de *Sesbania virgata* (Fabaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.
- Zemojtel, T., Fröchlich, A., Palmieri, M.C., Kolanczyk, M., Mikula, I., Wyrwicz, L.S., Wanker, E.E., Mundlos, S., Vingron, M., Martasek, P. & Durner, J.** 2006. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends in Plant Science* 11: 524–525.
- Zerlin, J.K.** 2011. 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 de mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo, SP.
- Zheng, C., Jiang, D., Liu, F., Dai, T., Liu, W., Jing, Q. & Cao, W.** 2009. Exogenous nitric oxide improves seed germination in wheat against mitochondrial oxidative damage induced by high salinity. *Environmental and Experimental Botany* 67: 222-227.
- Zheng, L.P., Guo, Y.T., Wang, J.W., & Tan, R.X.** 2008. Nitric oxide potentiates oligosaccharide-induced artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *Journal of Integrative Plant Biology* 50: 49-55.
- Zhu, Q.Y., Holt, R.R., Lazarus, S.A., Ensunsa, J.L., Hammerstone, J.F., Schmitz, H.H. & Keen, C.L.** 2002. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 1700–1705.
- Zhu, Q.Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y. & Chen, Z.Y.** 1997. Stability of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 4624–462.