

ATHOS POLI RIGUI DA SILVA

**Sinalização do óxido nítrico no metabolismo de  
frutanos e nas respostas antioxidantes em  
*Lolium perenne* L.**

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

2019

ATHOS POLI RIGUI DA SILVA

**Sinalização do óxido nítrico no metabolismo de  
frutanos e nas respostas antioxidantes em  
*Lolium perenne* L.**

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  
CO-ORIENTADORA: DRA. MARIA ANGELA MACHADO DE  
CARVALHO

SÃO PAULO  
2019

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

Silva, Athos Poli Riqui da

S586s Sinalização do óxido nítrico no metabolismo de frutanos e nas respostas antioxidantes em *Lolium perene* L. / Athos Poli Riqui da Silva -- São Paulo, 2019. 104p. il.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, 2019.  
Bibliografia.

1. Déficit hídrico. 2. Metabolismo de carboidratos. 3. S-nitrosilação. I. Título.

CDU: 547.455.65

*“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”*

**Dalai Lama**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por me apoiarem nas escolhas feitas e nos momentos difíceis, por me estimularem a buscar sempre o meu melhor e pelas facilidades que me deram durante o doutorado e por toda vida. Pela criação, educação e principalmente pelo amor e carinho.

Às minhas orientadoras Dra. Marília Gaspar e Dra. Maria Angela Machado de Carvalho por me orientarem durante toda a jornada de pós-graduação, pelo acompanhamento, conselhos e todas as demais qualidades a mim direcionadas. Tenho muito orgulho de ter sido orientado por vocês!

Às minhas colaboradoras Dra. Marie-Pascale Prud'homme e Dra. Annette Morvan-Bertrand e todos os funcionários e alunos do laboratório de Écophysiologie Végétale, Agronomie & nutritions NCS (UMR INRA-UCN 950) da Université de Caen, França por terem disponibilizado sementes de *Lolium perenne*, pela excelente e gentil recepção durante o Programa de Doutorado Sanduíche e a maravilhosa convivência durante os quatro meses de programa.

Ao Dr. Eduardo Purgatto, do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo nitrogênio líquido e dextran blue disponibilizados gentilmente durante todo o doutorado.

A Dra. Ione Salgado, do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, pela disponibilização das primeiras caixas de hidroponia utilizadas neste trabalho, pelos reagentes doados para a realização de uma série de análises e pela orientação e auxílio durante a quantificação do teor de *S*-nitrosotióis.

Ao Dr. André Luis Wendt dos Santos e ao mestrando Alexandre Junio Borges Araújo, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da USP, pela disponibilidade e gentileza em nos ajudar com as análises de detecção de proteínas *S*-nitrosiladas.

Ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade em realizar este trabalho. À Coordenadoria de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas de doutorado e bolsa de doutorado sanduíche concedidas, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Projeto 2016/04919-7) pelo auxílio financeiro.

Ao Rubens Cherubini Alves, engenheiro agrônomo da PGW Sementes pelo envio de sementes de *Lolium multiflorum* para a realização de testes durante o período inicial do doutorado.

Aos funcionários do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, Ana Alice, Amanda e todos os pesquisadores por todas as facilidades fornecidas ao longo do período, em particular, ao Pedro Bige Wasinger por todo o apoio e ajuda nas tarefas diárias, consultorias químicas e boa vontade.

Aos maravilhosos e incríveis amigos que a vida me trouxe, por me apoiarem incondicionalmente, me incentivarem e me proporcionarem as melhores lembranças e os futuros melhores momentos que ainda virão: Bianca Buono, Capucine Bêche, Carolina Pinho, Diana Hernandez, Isabelle Cantão, Jéssica Piccoli, Lara Kenny, Marina Ortelan, Natalia Miranda, Thamyris Ubertini. Vocês só trazem o melhor de mim!

Aos meus amados Bruno Paluan e Luiza Bagarollo, pelo apoio constante, incondicional e por todo o amor dedicado a mim. Por me ajudarem nas coletas de finais de semana e feriados, por aliviarem meu estresse e por estarem comigo o tempo inteiro, nos melhores e piores momentos, sempre me fazendo uma pessoa melhor e completa.

À amiga-irmã, Emanuela Joaquim por todos os anos de parceria, as ajudas em coletas, análises, pelos momentos memoráveis, risadas infinitas, pelo amor e carinho recíproco que levaremos pra vida e por todos os lugares que passarmos juntos!

Às minhas companheiras Alessandra Harumi e Karina Delmondes, por compartilharem as aflições, por me ajudarem em todas as tarefas diárias, especialmente nas coletas e transferências de plantas, por me apoiarem e darem doses de ânimo com as risadas e os momentos divertidos.

Aos amigos do Instituto de Botânica, Ingrid Cristina, Lucas Cadinelli, Simone Franco, Cynthia Murakami e Rodrigo Sanches por todos os momentos agradáveis, risadas, ajudas nos experimentos e incentivos.

Aos alunos de iniciação científica: Victória Alves, por toda ajuda, disponibilidade, companheirismo e pela oportunidade de compartilhar meus aprendizados e Vinício Rodrigues por todo o suporte na realização dos experimentos.

À Juliana Zerlin e Victória de Carvalho pela disposição e ajuda com as análises das enzimas antioxidantes.

Aos amigos que a estadia na França me trouxe e que espero levar para a vida Nicolas Leprince, Wilfried Vaultier, Isabelle Desvoye e todos os outros. Só tenho a agradecer a recepção, o carinho e as melhores lembranças desta experiência!

À Vilma e Luiz Paluan, o meu muito obrigado por todo apoio e bons momentos!

Ao Colégio Singular e todos os funcionários, pela oportunidade de afastamento para realização de Doutorado Sanduíche, pelo suporte moral, pelas eventuais ajudas, pelo apoio na realização do doutorado e a rotina deliciosa de convivência!

E a todos os demais que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>1.1. Óxido Nítrico como sinalizador em plantas</b> .....	11
1.1.1. <i>Óxido nítrico e funções biológicas em plantas</i> .....	11
1.1.2. <i>Modificações pós-traducionais: Nitrosilação e Nitração</i> .....	12
1.1.3. <i>Síntese e degradação do NO</i> .....	14
1.1.4. <i>O tratamento com NO exógeno</i> .....	16
<b>1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e a interação com RNS</b> .....	17
<b>1.3. Frutanos</b> .....	20
<b>1.4. <i>Lolium perenne</i></b> .....	25
<b>1.5. Hipótese</b> .....	27
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	29
<b>3.1. Material vegetal e desenho experimental</b> .....	29
3.1.1. <i>Efeito de duas concentrações de solução doadora de NO (GSNO) no metabolismo de frutanos de <i>Lolium perenne</i> cultivado em hidroponia</i> .....	29
3.1.2. <i>Aplicação de GSNO em <i>Lolium perenne</i> cultivado em hidroponia e submetido a estresse hídrico induzido por manitol: conteúdo de S-nitrosotióis e atividade de enzimas do metabolismo antioxidante</i> .....	32
3.1.3. <i>Aplicação de GSNO por aspersão foliar em plantas de <i>Lolium perenne</i> crescidas em tubetes e submetidas ao déficit hídrico por suspensão de rega</i> .....	33
<b>3.2. Análises</b> .....	35
3.2.1. <i>Determinação do potencial hídrico das plantas e do substrato</i> .....	35
3.2.2. <i>Quantificação de S-nitrosotióis</i> .....	35
3.2.3. <i>Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH•</i> .....	36
3.2.4. <i>Peroxidação lipídica</i> .....	36
3.2.5. <i>Quantificação de ASC e GSH</i> .....	37
3.2.6. <i>Atividade das enzimas do metabolismo antioxidante</i> .....	38
3.2.7. <i>Açúcares solúveis</i> .....	39
3.2.8. <i>Atividade de enzimas do metabolismo de frutanos</i> .....	39

3.2.9. Ensaio de atividade de enzimas do metabolismo de frutanos com aplicação direta de GSNO no extrato enzimático <i>in vitro</i> .....	42
3.2.10. Análise da expressão de genes do metabolismo de frutanos e antioxidante por qRT-PCR .....	42
3.2.11. Análise dos dados .....	44
3.2.12. Análise por ferramentas preditivas de sítios de S-nitrosilação e nitração nas sequências das enzimas dos metabolismos de frutanos e antioxidante .....	45
3.2.13. Detecção de proteínas S-nitrosiladas .....	45
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
4.1. Efeito de duas concentrações de solução doadora de NO (GSNO) no metabolismo de frutanos de <i>Lolium perenne</i> cultivado em hidroponia .....	48
4.2. Efeito do pré-tratamento com GSNO em plantas de <i>Lolium perenne</i> cultivadas em hidroponia e submetidas ao déficit hídrico induzido por manitol .....	52
4.3. Efeito do pré-tratamento com GSNO em plantas de <i>Lolium perenne</i> crescidas em tubetes e submetidas à suspensão de rega .....	57
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>74</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>87</b>
<b>8. ANEXOS</b> .....	<b>1044</b>
8.1. Anexo 1 .....	1044

## RESUMO

O óxido nítrico (NO), uma das espécies reativas de nitrogênio, é uma molécula sinalizadora no desenvolvimento de plantas, bem como em respostas a estresses bióticos e abióticos. Essas condições desencadeiam um estresse oxidativo, que pode ser minimizado pela aplicação de baixas concentrações de NO exógeno, que modula a atividade de enzimas antioxidantes por meio da S-nitrosilação ou e a expressão de genes relacionados. Os frutanos são carboidratos de reserva com um papel importante na tolerância ao frio e à seca, através da conversão de frutanos de alto grau de polimerização em oligossacarídeos que atuam como osmorreguladores, protetores de membrana e compostos antioxidantes. A interação entre o NO e o metabolismo de frutanos é pouco discutida considerando o papel desses carboidratos na tolerância a diferentes estresses ambientais e o papel do NO como modulador da atividade de enzimas relacionadas às condições de estresse. Este trabalho teve por objetivo avaliar as respostas de plantas de *Lolium perenne*, espécie acumuladora de frutanos, tratadas com solução doadora de NO (S-nitrosoglutationa, GSNO) em condições fisiológicas e sob déficit hídrico, visando identificar qual a via preferencial de resposta ao estresse: o metabolismo de frutanos ou o sistema antioxidante enzimático. Foram analisados parâmetros de crescimento, atividade e expressão das enzimas do metabolismo de frutanos e antioxidante. O crescimento não foi afetado por nenhum tratamento. As enzimas do metabolismo de frutanos, bem como os genes relacionados, parecem ser regulados em condição de estresse hídrico e também pelo tratamento com GSNO e com a glutatona reduzida (GSH), utilizada como controle, embora estas regulações possam ocorrer por outras vias previamente reguladas por tais tratamentos. Em contrapartida, em geral, as respostas de aumento da atividade e expressão dos genes do metabolismo antioxidante são condizentes com o descrito para outras gramíneas sob déficit hídrico, bem como a regulação da expressão e da atividade por NO. Portanto, plantas jovens de *L. perenne* var AberAvon se mostraram resistentes ao estresse hídrico diminuindo o teor de ROS graças ao aumento da síntese e acúmulo de frutanos e GSH.

## ABSTRACT

Nitric oxide (NO), a reactive nitrogen species, is a signaling molecule in plant development, as well as in responses to biotic and abiotic stresses. These conditions trigger an oxidative stress, which can be minimized by applying low concentrations of exogenous NO, that modulates the activity of antioxidant enzymes through *S*-nitrosylation. Fructans are reserve carbohydrates with an important role in cold and drought tolerance by converting high polymerization fructans into oligosaccharides that act as osmoregulators, membrane protectors and antioxidant compounds. The interaction among NO and fructan metabolism there is a lack of discussion considering the role of these carbohydrates in tolerance to different environmental stresses and the role of NO as modulator of the activity of stress related enzymes. This work aimed to evaluate the responses of *Lolium perenne*, a fructan accumulator, to treatment with an NO donor solution (*S*-nitrosoglutathione, GSNO) under physiological conditions and under water deficit, in order to identify the predominant antioxidant route used by the plant: fructan metabolism or the enzymatic antioxidant system. We evaluated growth parameters and the activities and expressions of antioxidant and fructan metabolism enzymes. Plant growth was not affected by any of the applied treatments. Fructan metabolism enzymes, as well as the related genes, seemed to be regulated by water deficit treatment as well as GSNO and the reduced glutathione (GSH), used as control treatment, although these adjustments may occur by other routes previously regulated by such treatments. In contrast, generally responses of increased activities and the expression of genes related to the antioxidant metabolism are consistent with that has been described for other grasses under water deficit, as well as the regulation of NO expression and activity. Therefore, in response to water deficit, young plants of *L. perenne* were tolerant to water stress, reducing the ROS content, due to the increase in synthesis and accumulation of fructan and GSH.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Óxido Nítrico como sinalizador em plantas

#### 1.1.1. Óxido nítrico e funções biológicas em plantas

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, de estrutura simples e com alta difusividade. É considerado um radical livre e, portanto, uma molécula com alta reatividade. Apresentando elétrons desemparelhados, é capaz de iniciar reações em cadeia ao capturar elétrons de outras moléculas para completar seu orbital (Khan *et al.*, 2014; Nelson & Cox, 2014).

O NO é considerado um poluente atmosférico advindo de fontes naturais (descargas elétricas, vulcanismos e atividades bacterianas) e antropogênicas (resultante da atividade de veículos automotores e usinas de energia), apresenta importantes propriedades toxicológicas e participa da formação do *smog* fotoquímico, relacionando-se ao aumento da temperatura na superfície terrestre (Delledonne, 2005).

Na célula, em baixas concentrações, o NO pode reagir com diversos grupos de compostos, como tióis, proteínas, cofatores enzimáticos, lipídeos e nucleotídeos. Juntamente de seus compostos derivados, como o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), o radical dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>), o cátion nitrosil (NO<sup>+</sup>), o trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), a *S*-nitrosoglutathiona (GSNO), e outros, os óxidos de nitrogênio são chamados de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Durzan & Pedroso 2002, Corpas *et al.* 2007, Halliwell & Gutteridge 2007).

Descrito como importante sinalizador celular em plantas em baixas concentrações (Ignarro *et al.* 1987, Palmer *et al.* 1987, Culotta & Koshland 1992, Delledonne *et al.* 1998, Pagnussat *et al.* 2003, Prado *et al.* 2004, Modolo *et al.* 2005, Modolo *et al.* 2006), os efeitos do NO foram amplamente estudados, sendo comprovado seu papel na regulação do metabolismo, na fisiologia, no desenvolvimento e na reprodução vegetal. Exemplos disso são seu envolvimento na sinalização hormonal (Guo *et al.* 2003; Freschi, 2013), no crescimento e

desenvolvimento da planta (Beligni & Lamattina 2000), no desenvolvimento do tubo polínico (Prado *et al.*, 2004), na indução floral (He *et al.*, 2004) e seu papel como regulador negativo da senescência foliar (Mishina *et al.* 2007).

O NO também é conhecido por desempenhar um importante papel na proteção contra patógenos e outros estresses bióticos (Delledone, 2005; Floryszak-Wieczorek *et al.*, 2007; Asai & Yoshioka, 2009) e diferentes estresses abióticos, como ozônio (Velikova *et al.* 2005, Ederli *et al.* 2006), toxicidade do alumínio (Wang & Yang 2005), salinidade (Zhao *et al.* 2007) e a seca (García-Mata & Lamattina 2001). Quando aplicado na forma gasosa em pequenas concentrações ( $200 \text{ nL L}^{-1}$ ), o NO foi capaz de aumentar as taxas fotossintéticas e o acúmulo de biomassa em plântulas de espinafre e aumentou a produção de proteínas, açúcares e antioxidantes como vitamina C, glutathiona e flavonoides (Jin *et al.* 2009).

A sinalização do NO e seus derivados, ocorre por meio de interações complexas com hormônios, espécies reativas de oxigênio (ROS) e a ativação de sistemas antioxidantes (Salgado *et al.* 2017), resultando em modificações pós-traducionais de proteínas por mecanismos de *S*-nitrosilação, nitração e ligação a centros metálicos (Besson-Bard *et al.* 2008).

### *1.1.2. Modificações pós-traducionais: Nitrosilação e Nitração*

As reações que envolvem no NO, em grande parte, são mediadas principalmente pela formação de RNS. O ONOO<sup>-</sup> ligado a unidades de tirosinas livres ou de proteínas pode formar o Tyr-NO<sub>2</sub>, numa reação conhecida por nitração, que em proteínas, de maneira geral, leva a alterações irreversíveis na atividade enzimática, atividade proteolítica e nível de fosforilação. Sendo este processo mediado pelo ONOO<sup>-</sup> (originado a partir da interação de RNS e espécies reativas de oxigênio (ROS) e, portanto, formado em condições de desequilíbrio homeostático), o aumento da nitração em proteínas pode ser um indicativo de condições de estresse nitrosativo, desencadeado e associado a um estresse oxidativo devido à formação do

ONOO<sup>-</sup>, numa reação entre o NO e a espécie reativa de oxigênio O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (Corpas *et al.* 2007, Abello *et al.*, 2009; Zaffagnini *et al.* 2016).

Alternativamente, o ONOO<sup>-</sup> pode reagir com o NO e dar origem ao NO<sub>2</sub> ou o NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e por sua vez o NO<sub>2</sub>, numa reação com o NO, pode formar outro radical, o N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que por sua vez pode transferir NO<sup>+</sup> para outra molécula e gerar um nitrosotiol (Zaffagnini *et al.* 2016). Os principais alvos do NO<sup>+</sup> são os grupos tióis em resíduos de cisteína (Cys-SH), os lipídeos e o DNA e, desta forma pode alterar a expressão de genes e as funções metabólicas, como resposta ao estresse ou no controle dos processos fisiológicos (Kan *et al.* 2014; Begara-Morales *et al.* 2015).

O NO também pode nitrosilar metais, como por exemplo o ferro, muitas vezes presente em centros de unidades proteicas, formando complexos irreversíveis, quando reage com o íon ferroso (Fe<sup>+2</sup>) ou reversíveis, quando a reação é com o íon férrico (Fe<sup>+3</sup>). O complexo nitrosil férrico, por ser reversível, pode transferir o NO para outra molécula, através de uma nitroação, formando outro nitrosotiol (Zaffagnini *et al.* 2016).

Em síntese, portanto, a *S*-nitrosilação de uma proteína pode ocorrer de forma direta nas unidades de cisteína da molécula, pela liberação de NO através do N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou de forma indireta mediada por metais, como o ferro, ou ainda outras moléculas de *S*-nitrosotióis previamente formadas (como a *S*-nitroglutationa, uma *S*-nitrosocisteína (CySNO) ou outras proteínas de baixo peso molecular) que fazem a transferência de seu NO para a cisteína de uma unidade proteica, numa reação denominada *trans*-nitrosilação. Esta modificação pós-traducional é revertida na presença de moléculas redutoras como tiroxinas e a glutatona reduzida (GSH) (Zaffagnini *et al.* 2016).

A *S*-nitrosilação depende muito do microambiente ao qual a unidade de cisteína de uma proteína está submetida. A proximidade de resíduos básicos ou ácidos na molécula pode favorecer a reação, desde que o grupo tiol tenha sido previamente reduzido, contudo, a proximidade destes resíduos na sequência de aminoácidos pode não ocorrer quando a

molécula atinge a sua forma tridimensional. Assim, a previsão de *S*-nitrosilação como uma modificação pós-traducional é difícil e pouco precisa (Zaffagnini *et al.* 2016).

Moro *et al.* (2016) mostraram que a presença de NO é capaz de alterar o transcriptoma e remodelar a parede celular durante a formação de pelos radiculares em *Arabidopsis thaliana* através da modulação na expressão de diversos genes relacionados à organização da parede celular, a processos de desenvolvimento celular e diferenciação celular epidérmica das raízes. Hussain *et al.* (2016), utilizando plantas da mesma espécie, mostraram uma alteração no transcriptoma após a infiltração de solução de CySNO nas folhas, revelando uma complexa regulação da expressão de diversos genes, muitos deles relacionados à resposta a estresses, como o estresse oxidativo, a seca, a salinidade, altas e baixas temperaturas e estresses bióticos, como o ataque de patógenos.

### 1.1.3. Síntese e degradação do NO

A concentração de NO celular é mantida basicamente por um balanço de síntese e degradação da molécula. Para a síntese de NO em plantas, várias vias já foram propostas, como a síntese a partir de poliaminas e hidroxilaminas, a oxidação da L-arginina e a redução do nitrito (Salgado *et al.* 2017) (Figura 1).

Em animais, sabe-se que a enzima NO sintase (NOS) oxida a L-arginina utilizando o oxigênio molecular e o NADPH como co-substratos para produzir NO e L-citrulina. Em plantas, atividade semelhante já foi descrita, acreditando-se que a reação seja catalisada por uma enzima do tipo NOS, que ainda não foi isolada e o gene não foi detectado (Alderton *et al.* 2001; del Río *et al.* 2004, Corpas *et al.* 2004).

Embora muitas espécies vegetais apresentem o seu genoma sequenciado, o gene para esta enzima nunca foi encontrado. O gene *AtNOS1* de *A. thaliana*, possível responsável pela atividade semelhante a NOS, mostrou-se responsável por codificar uma cGTPase sem atividade de NOS dependente de L-arginina (Guo *et al.* 2003, Zemojtel *et al.* 2006) e foi

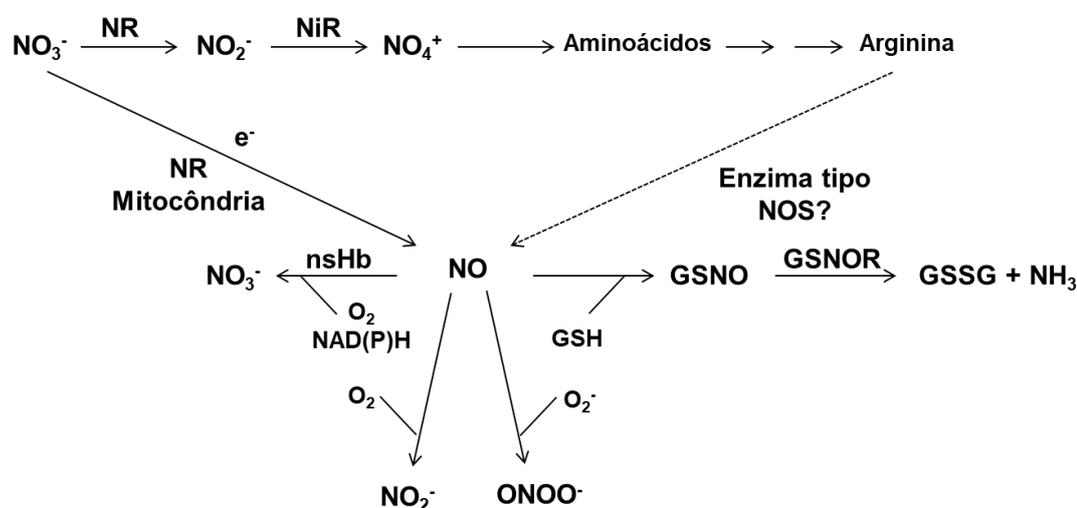
renomeado para *AtNOAI*. Posteriormente, em mutantes *Atnoa1*, foi verificado que a baixa emissão de NO e as alterações nas respostas fisiológicas mediadas por NO eram consequência indireta da alteração da síntese proteica nos cloroplastos (Crawford *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2010).

Como um mecanismo alternativo para a síntese de NO em plantas, a enzima nitrato redutase (NR), que catalisa a redução do nitrato a nitrito, pode reduzir o nitrito novamente, produzindo NO (Yamasaki & Sakihama 2000). Em plantas mutantes de *A. thaliana*, foi comprovado que o NO responsável pela indução do fechamento estomático é oriundo da atividade da NR (Bright *et al.* 2006). Plantas de *A. thaliana* sob estresse por frio apresentaram maior nível endógeno de NO relacionado a um aumento da atividade da NR e da expressão dos genes estruturais, sobretudo do gene *NIA1* (Zhao *et al.* 2009). Além destes, outros processos foram relacionados à regulação pelo NO oriundo da atividade da NR, como a indução floral, o desenvolvimento de raízes, as respostas ao estresse osmótico e a defesa contra patógenos (Wang *et al.* 2010, Gupta *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2011, Salgado *et al.* 2017).

Acredita-se que a produção de NO pela NR seja, prioritariamente, para a produção de nitrito, já que plantas mutantes de *A. thaliana* defeituosas nos genes *NIA1* e *NIA2* são capazes de produzir NO na presença de nitrito (Modolo *et al.* 2005). Esta reação não ocorre quando a atividade de respiração mitocondrial é inibida, sugerindo que os elétrons utilizados para a síntese de NO sejam oriundos da cadeia respiratória (Modolo *et al.* 2005, Salgado *et al.* 2017).

A redução do nitrito a NO por uma via não enzimática também já foi descrita no apoplasto de plantas. Essa síntese não enzimática requer um pH baixo para ocorrer e pode ser acelerada na presença de agentes redutores, como compostos fenólicos (Bethke *et al.* 2004). A síntese não enzimática de NO no apoplasto foi observada na presença de giberelinas e ABA, dois hormônios capazes de acidificar rapidamente o meio apoplástico (Wendehenne *et al.* 2004)

Já a degradação de NO pode ocorrer naturalmente através de uma reação com o oxigênio, formando nitrito ou nitrato (Kharitonov *et al.* 1994). Além disso, o NO também pode reagir com espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, resultando no agente de nitração peroxinitrito (Salgado *et al.* 2017). Por sua vez, o NO presente nas células ainda pode reagir com a glutathiona reduzida (GSH), formando GSNO, um S-nitrosotiol capaz, portanto, de ocasionar eventos de S-nitrosilação (Salgado *et al.* 2017). Os níveis de GSNO, por sua vez, são controlados pela enzima GSNO redutase (GSNOR), que reduz esta molécula em glutathiona oxidada (GSSG) e amônia (NH<sub>3</sub>) (Jensen *et al.* 1998, Liu *et al.* 2001, Feechan *et al.* 2005) (Figura 1).



**Figura 1.** Modelo de biossíntese e degradação do óxido nítrico (NO). Adaptado de Salgado *et al.* (2017).

#### 1.1.4. O tratamento com NO exógeno

Para fins de estudos de efeitos do NO, o tratamento exógeno de NO em plantas pode ser realizado de diferentes formas: a fumigação direta do gás no interior de câmaras conforme realizado por Frugillo *et al.* (2014) ou pelo uso de soluções doadoras de NO.

A exposição das plantas às soluções doadoras pode ser feita por aspersão direta nas folhas (Silveira *et al.*, 2016), aplicação da solução no solo ou em solução de hidroponia

(Simaei *et al.* 2012), ou ainda por enriquecimento atmosférico pela evaporação da solução no interior de câmaras onde se encontram as plantas (Bethke *et al.* 2004).

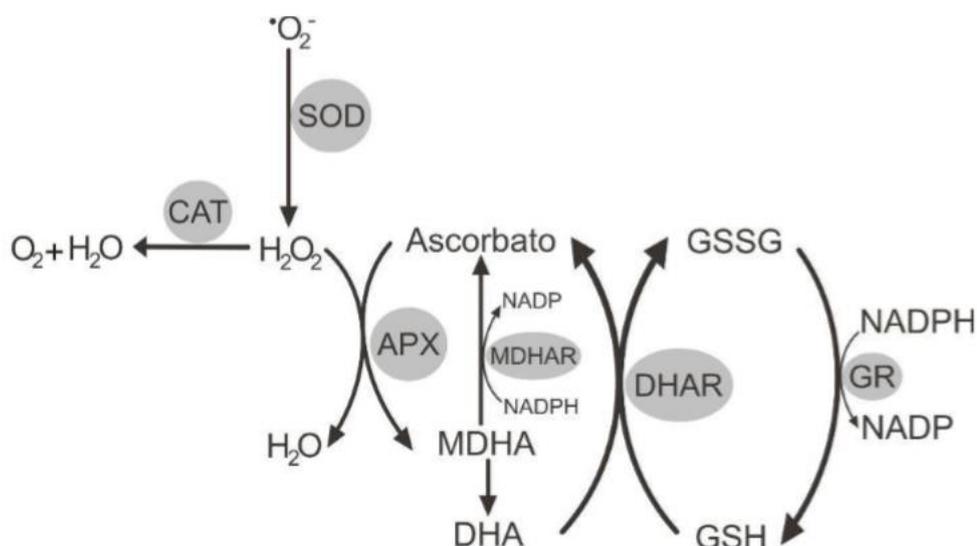
Um dos doadores de NO mais comumente utilizado é o nitroprussiato de sódio (SNP), um complexo inorgânico composto por íon ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) ligado a cinco ânions de cianeto ( $\text{CN}^-$ ) e um íon nitrosila ( $\text{NO}^+$ ) (Yamamoto & Bing, 2000). Em solução, o SNP é extremamente fotossensível, sendo a luz fundamental para a quebra da molécula e liberação de NO e cianeto, que tem seu pico de liberação após 3h (Feelisch 1998; Ederli *et al.* 2009).

Outro doador de NO comumente utilizado em experimentos com plantas é a GSNO, um composto naturalmente existente nas células, formado através da nitrosilação do resíduo de cisteína a partir do tripeptídeo GSH, por óxidos de nitrogênio e peroxinitrito (Moro *et al.* 1995). A reação de liberação de NO é rápida e transitória (cerca de 30 a 60 minutos), resultando também na liberação de glutatona, ocorre no escuro, mas a luz é fundamental para iniciar este processo (Floryszak-Wieczorek *et al.* 2006; Ederli *et al.* 2009).

## **1.2. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e a interação com RNS**

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são moléculas altamente reativas e tóxicas e compreendem o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), o radical peridroxil ( $\text{HO}_2^{\cdot}$ ) e o radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) (Halliwell & Gutteridge 2007, Gill & Tuteja 2010). Podem ser produzidas como subprodutos de diversas reações metabólicas em diferentes compartimentos celulares como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, especialmente pela cadeia de transporte de elétrons presente nos processos de respiração celular e fotossíntese (Del Río *et al.* 2006, Navrot *et al.* 2007, Buchanan *et al.* 2015) e sua toxicidade se dá por sua capacidade de oxidar proteínas, ocasionar a peroxidação lipídica, gerar danos às moléculas de DNA e por fim, causar a morte celular (Foyer & Noctor 2005, Gill & Tuteja 2010).

As plantas eliminam o excesso de ROS no interior de suas células através do sistema de defesa antioxidante, que pode ser enzimático ou não-enzimático. Os antioxidantes não-enzimáticos são representados pelo ascorbato (ASC), GSH,  $\alpha$ -tocoferol, carotenoides, flavonoides e carboidratos do tipo frutanos (Peshev *et al.* 2013). Por sua vez, o metabolismo antioxidante enzimático é composto, principalmente, pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona redutase (GR), dentre outras enzimas (Mittler *et al.* 2004, Gill & Tuteja 2010) (Figura 2).



**Figura 2.** Espécies reativas de oxigênio (ROS) e principais componentes do mecanismo de defesa antioxidante do ciclo ascorbato-glutationa. Adaptado de Buchanan *et al.* (2015).

A SOD é a primeira enzima de detoxificação de ROS, dismutando o  $O_2^{\bullet -}$  em  $H_2O_2$ , que é menos reativo. A detoxificação do  $H_2O_2$  é essencial para proteção e sinalização celular (Apel & Hirt 2004), podendo ocorrer pela atuação das enzimas APX e CAT, que convertem o peróxido em  $H_2O$  e oxigênio na presença dos co-substratos ASC e GSH (Gupta *et al.* 2016). O ASC em sua forma oxidada, o monodehidroascorbato (MDHA), perde sua função antioxidante, mas pode ser regenerado por dois mecanismos: através da redução enzimática pela MDHAR ou pode ser dismutado espontaneamente a deidroascorbato (DHA), que

posteriormente é reduzido pela DHAR (Gill & Tuteja 2010). A 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 GSSG em GSH, utilizando 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 destas enzimas é de extrema importância para prevenir a formação de  $OH^\bullet$ , que é altamente reativo e pode desencadear a peroxidação lipídica, reagindo com ácidos graxos insaturados das membranas causando danos e alterando a permeabilidade celular (Gill & Tuteja 2010).

ROS atuam como mensageiros secundários e podem regular a expressão de um grande número de genes, controlando processos como crescimento, ciclo celular, resposta a estresses bióticos e abióticos, entre outros (Foyer & Noctor 2005, Gill & Tuteja 2010).

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. O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS pode ser perturbado por vários estresses bióticos e abióticos, tais como salinidade, seca, metais pesados, temperaturas extremas, deficiência de nutrientes, poluentes do ar, herbicidas e ataques de patógenos (Gill & Tuteja 2010).

Conforme mencionado anteriormente, ROS podem interagir com RNS através da formação do  $ONOO^\bullet$ , um poderoso oxidante celular e também uma importante via direta de nitração e indireta, de *S*-nitrosilação (Corpas & Barroso 2013).

### 1.3. Frutanos

Frutanos são carboidratos de reserva originados da sacarose que estão presentes em 15% das Angiospermas. Plantas capazes de sintetizar frutanos ocorrem em famílias não relacionadas filogeneticamente, sugerindo uma origem polifilética deste metabolismo (Hendry & Wallace 1993).

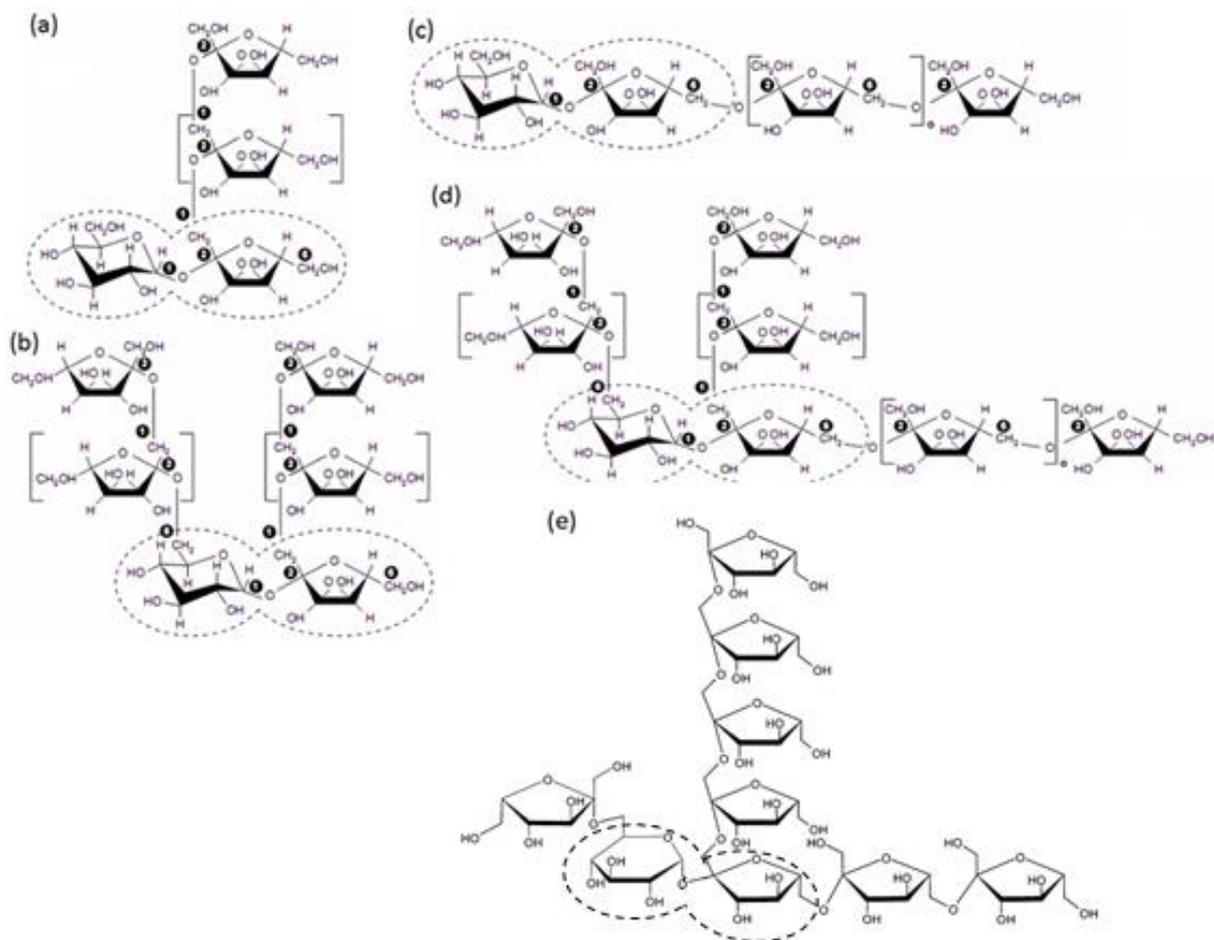
A diversidade da distribuição filogenética e geográfica e a ocorrência destes compostos em famílias mais derivadas indicam que os genes necessários ao metabolismo de frutanos podem ter surgido em resposta a uma ou várias pressões de seleção em um passado relativamente recente. A disponibilidade de água pode ter sido um desses fatores de seleção que direcionou a evolução do metabolismo de frutanos nas plantas, uma vez que o surgimento da flora produtora de frutanos, ocorrido entre 30 e 15 milhões de anos atrás, coincidiu com o aparecimento da seca estacional. Além disso, a distribuição da flora atual que apresenta o metabolismo de frutanos corresponde a regiões onde ocorre uma sazonalidade marcada de precipitação e temperatura (Hendry & Wallace, 1993).

Os frutanos são acumulados na forma de oligo- e polissacarídeos de frutose, principalmente em órgãos subterrâneos de reserva como raízes tuberosas, rizomas, tubérculos e bulbos, podendo ser também armazenados em quantidades inferiores em caules, folhas, inflorescências e sementes, especialmente de Poaceae (Pollock *et al.* 1996). Sua complexidade estrutural pode variar de acordo com o tipo de ligação glicosídica entre as unidades de frutose,  $\beta$  (2,1) ou  $\beta$  (2,6), presença ou não de ramificação nas cadeias e com a posição da molécula de sacarose terminal ou interna à cadeia (Van den Ende 2013).

Dependendo do carbono em que a primeira unidade de frutose se liga à sacarose, podem ser formados três trissacarídeos: 1-cestotriose (1-cestose), com ligação do tipo  $\beta$  (2,1) entre as unidades de frutose; 6-cestotriose (6-cestose), com ligação do tipo  $\beta$  (2,6) entre as

unidades de frutose; e 6G-cestotriose (neocestose), na qual a frutose se liga à glicose da molécula de sacarose inicial, tornando a glicose interna na molécula (Verspreet *et al.* 2015).

Estes três isômeros são os precursores de 6 tipos diferentes de frutanos: frutanos do tipo inulina que consistem de cadeias lineares, baseadas na 1-cestotriose e portanto formados exclusivamente de ligações do tipo  $\beta$  (2,1) entre as unidades de frutose, ocorrendo predominantemente em dicotiledôneas, principalmente em Asterales; fleanos ou levanos, também de cadeias lineares, são formados a partir da 6-cestotriose e possuem as unidades de frutose unidas por ligações  $\beta$  (2,6), são encontrados em monocotiledôneas, como na ordem Poales, nos gêneros *Dactylis* e *Poa*; os graminanos, constituídos de cadeias mistas, formadas a partir da bifurcose, tetrassacarídeo ramificado com ligações  $\beta$  (2,1) e  $\beta$  (2,6), são encontrados, por exemplo, em trigo e cevada, pertencentes à ordem Poales; as neoséries de frutanos, baseadas na 6G-cestotriose, podem ser formadas por ligações do tipo  $\beta$  (2,1) (neosérie de inulina) ou  $\beta$  (2,6) (neosérie de levano) e estão presentes em Liliaceae (como a cebola e o aspargo) e Poales (como na aveia e espécies do gênero *Lolium*); agavanos, também baseados na 6G-cestotriose, são encontrados em Agavaceae, apresentam cadeias muito ramificadas com ligações  $\beta$  (2,1) e  $\beta$  (2,6) (Figura 3) (Pollock *et al.* 1996, Ritsema & Smeekens 2003, Lopez *et al.* 2003, Van den Ende 2013).



**Figura 3.** Estrutura de diferentes tipos de frutanos encontrados em Angiospermas. Inulina (a), neosérie da inulina (b), levano/fleano (c), frutano ramificado de cadeia mista (d) e cadeia de frutano de *Agave* (e). A molécula de sacarose sobre a qual a molécula de frutano é sintetizada está circulada (adaptado de Ritsema & Smeekens 2003).

Os frutanos são sintetizados e armazenados no vacúolo por ação de duas principais frutossiltransferases (Vijn & Smeekens 1999). A sacarose:sacarose 1-frutossiltransferase (1-SST), inicia a síntese do frutano transferindo de forma irreversível uma unidade de frutose de uma molécula de sacarose doadora para outra sacarose receptora, formando o trissacarídeo 1-cestotriose e liberando uma molécula de glicose. Esta enzima já foi identificada em grande parte das espécies que acumulam frutanos, é responsável pela primeira etapa de síntese (Ritsema *et al.* 2003). A frutano:frutano 1-frutossiltransferase (1-FFT), transfere de forma reversível a unidade de frutose de uma molécula de frutano com um grau de polimerização

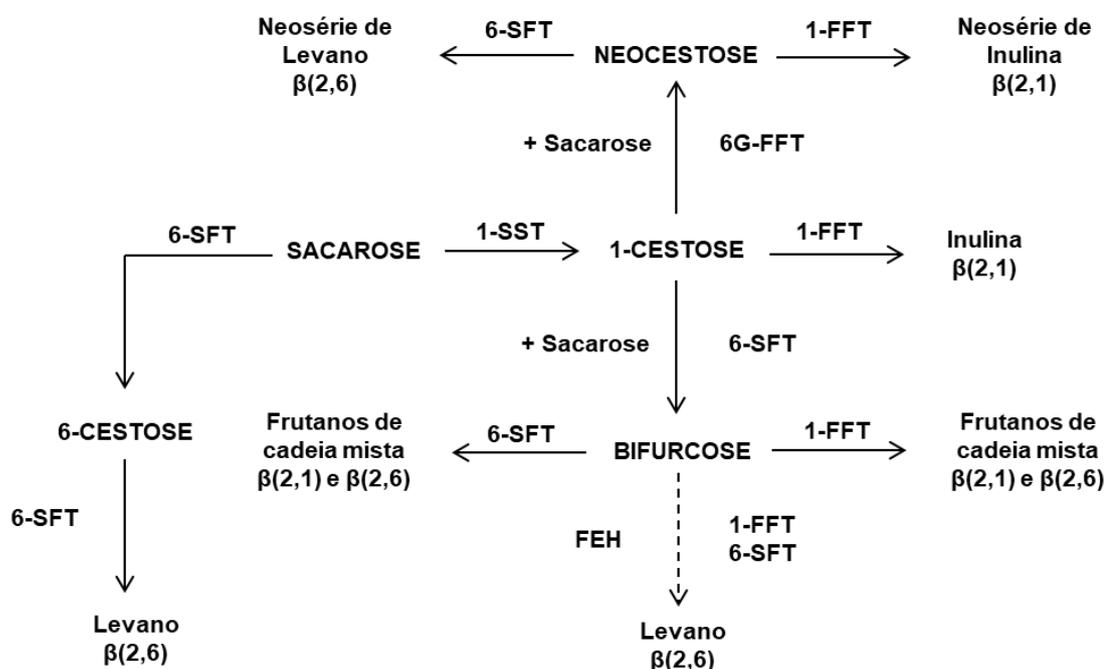
(GP) maior ou igual a três, previamente formada, para outra molécula de frutano existente ou uma molécula de sacarose podendo, portanto, atuar no alongamento e na diminuição do comprimento da cadeia (Edelman & Jefford 1968, Van den Ende 2013, Verspreet *et al.* 2015). Essas duas enzimas são as únicas frutossiltransferases que atuam na síntese da inulina, o frutano com estrutura mais simples encontrado na natureza.

Entretanto, as várias estruturas e perfis cromatográficos de frutanos encontrados em diferentes grupos de plantas resultam da ação de outras enzimas frutossiltransferases (Cairns & Pollock 1998; Gallagher *et al.* 2007). Em gramíneas e outras monocotiledôneas, por exemplo, a biossíntese é mais complexa, envolvendo a ação da sacarose:frutano 6-frutossiltransferase (6-SFT) como no caso do trigo, a qual atua em conjunto com a 1-SST e a 1-FFT. A 6-SFT transfere a unidade de frutose da molécula de sacarose, ou da molécula de frutano, para outra sacarose ou molécula de frutano, formando respectivamente 6-cestose, bifurcose ou frutanos maiores com ligações  $\beta$  (2,6) (Bancal *et al.* 1992; Wei & Chatterton, 2001, Tamura *et al.* 2009, Verspreet *et al.* 2015).

A frutano:frutano 6-glicose-frutossiltransferase (6G-FFT) também já foi identificada em diversas plantas, sendo descrita pela primeira vez em cebola (Henry & Darbyshire, 1980). A 6G-FFT transfere a unidade de frutose de uma molécula de frutano para a unidade de glicose de outra molécula de frutano ou de sacarose, formando as neoséries (Gallagher *et al.* 2007, Van den Ende 2013).

A despolimerização das moléculas de frutanos se dá pela ação das frutano exohidrolases (FEHs), que removem sequencialmente unidades de frutose terminais da molécula (Edelman & Jefford, 1968). As FEHs são classificadas de acordo com o tipo de ligação que hidrolisam, a frutano 1-exohidrolase (1-FEH) quebra as ligações  $\beta$  (2,1) presentes na inulina e a frutano 6-exohidrolase (6-FEH), as ligações  $\beta$  (2,6) dos fleanos ou levanos (Verspreet *et al.* 2015).

Outros tipos de exohidrolases já foram identificados, o grupo das enzimas cestotriose hidrolases (KEH) apresenta forte afinidade pelas cestotrioses (1-cestose, 6-cestose ou neocestose) (Verspreet *et al.* 2015, Van den Ende 2018), como é o caso da 6,1 frutano exohidrolase (6&1-FEH) em plantas de trigo (Kawakami *et al.*, 2005), que degrada preferencialmente frutanos do tipo graminano, como o tetrassacarídeo bifurcose. Ou ainda, a 6-cestose exohidrolase (6-KEH) que se localiza provavelmente no apoplasto e que pode estar envolvida na degradação da 6-cestose de origem bacteriana (Van den Ende *et al.*, 2005). A figura 4 resume a atividade das principais enzimas do metabolismo de frutanos.



**Figura 4.** Modelo de biossíntese de frutanos. Adaptado de Vijn & Smeekens (1999).

Além da sua função de reserva, os frutanos estão associados à tolerância à seca (Pilon-Smits *et al.* 1995, Pilon-Smits *et al.* 1999) e ao frio (Livingston & Henson 1998, Kawakami *et al.* 2008), por serem compostos osmoticamente ativos e favorecerem a retenção de água nos tecidos e também, por atuarem na estabilização de membranas durante a dessecação (Hincha *et al.* 2007). Alterações na concentração e composição de frutanos e na atividade das enzimas

do seu metabolismo foram relacionadas a variações sazonais de temperatura, disponibilidade de água e outros fatores ambientais para várias espécies do cerrado (Carvalho & Dietrich, 1993, Isejima & Figueiredo-Ribeiro, 1993, Vieira & Figueiredo-Ribeiro, 1993, Rigui *et al.*, 2015).

Além da função fisiológica dos frutanos em condições de seca e frio, recentemente os frutanos também foram descritos como agentes antioxidantes não enzimáticos. O acúmulo de peróxido de hidrogênio nas células promove o transporte desta molécula para o interior do vacúolo, por difusão ou através de aquaporinas. No interior do vacúolo, o peróxido sofre a ação de peroxidases liberando radicais hidroxila ( $\text{OH}^{\bullet}$ ), que por sua vez são sequestrados por frutanos presentes na região periférica do vacúolo. Este sequestro leva à formação de radicais de açúcares que serão quebrados e posteriormente reciclados através de reações com compostos fenólicos ou à formação de açúcares de elevado peso molecular no centro do vacúolo. Para que ocorra esse processo de reciclagem, compostos do metabolismo antioxidante não-enzimático, como a glutatona e o ascorbato, são fundamentais (Peshev *et al.* 2013).

Em relação a uma possível associação do metabolismo de frutanos com espécies reativas de nitrogênio, como o NO, ainda há poucos trabalhos que relacionem estes dois metabolismos. Li *et al.* (2013) mostraram que a aplicação de NO exógeno em trigo submetido ao estresse por frio induziu a atividade da 1-FFT e a expressão do gene 6-SFT, sobretudo na variedade resistente a este estresse, aumentando a proteção da planta contra os danos provocados pelo frio.

#### **1.4. *Lolium perenne***

*Lolium perenne* é uma Poaceae popularmente conhecida como azevém ou azevém-perene. É uma espécie nativa da bacia do mediterrâneo, com ampla distribuição em regiões de clima temperado, como Europa e Ásia, e também naturalizada na Oceania, Américas do Norte

e do Sul (Jardim Botânico da UTAD, Portugal), estando presente também no Sul do Brasil (Longhi-Wagner 2015). Esta espécie é predominante nas pastagens de clima temperado por seu rápido estabelecimento, alta produtividade e digestibilidade e tolerância à defoliação, sendo utilizada como forrageira, especialmente na Europa, pela sua capacidade de suprir a escassez de forragem durante períodos mais frios do ano (Terrel 1968, Yamada *et al.* 2005, Prud'homme *et al.* 2007, Lee *et al.* 2010, Meuriot *et al.* 2018).

Plantas desta espécie armazenam frutanos na base das folhas, sobretudo na região da bainha, mas também, em menor quantidade, nas lâminas foliares e raízes (Pavis *et al.* 2001). Os frutanos de *L. perenne* apresentam estrutura linear ou ramificada, com resíduos de frutose ligados entre si por ligações  $\beta$  (2,1) ou  $\beta$  (2,6). Três enzimas de síntese já foram clonadas e caracterizadas, a 1-SST (Chalmers *et al.* 2003), a 6G-FFT (Lasseur *et al.* 2006) e a 6-SFT (Lasseur *et al.* 2010). Em conjunto, estas três enzimas são capazes de produzir a 1-cestose, a 6-cestose e a neocestose a partir da sacarose e, portanto, nesta espécie podem ser encontrados frutanos de todos os tipos descritos anteriormente. As enzimas de hidrólise 1-FEH e a 6-FEH também foram isoladas e caracterizadas em *L. perenne* (Marx *et al.* 1997; Lothier *et al.* 2007).

Em condição de déficit hídrico, o acúmulo de frutanos foi correlacionado com maior tolerância ao estresse devido à sua participação no ajuste osmótico, na maior elasticidade da parede celular e estabilidade da membrana em *Lolium perenne* (Amiard *et al.* 2003; Bothe *et al.* 2018). Estudos realizados por Sandrin *et al.* (2008) e por Rey-Asensio & Carballeira (2007), mostraram o potencial de plantas do gênero *Lolium* como biodiadoras para análise de poluentes atmosféricos e metais pesados, tendo caracterizado inclusive o metabolismo de frutanos em resposta à esses poluentes.

No caso de espécies acumuladoras de frutanos, como *L. perenne*, o óxido nítrico poderia constituir um dos sinais passíveis de modular a atividade e expressão das enzimas de frutanos, auxiliando na resposta aos diferentes tipos de estresse.

Esta espécie se apresenta como bom modelo de estudo devido ao amplo conhecimento do metabolismo de frutanos, à disponibilidade de sequências de genes relacionados, facilitando desta forma as análises de expressão gênica e à grande disponibilidade de sementes.

### **1.5. Hipótese**

Tendo em vista que plantas acumuladoras de frutanos são conhecidas por apresentarem maior tolerância a estresses abióticos, como seca e frio e considerando que o NO pode atuar como componente da via de sinalização de resposta a estresses, a proposta neste trabalho foi responder às seguintes perguntas:

Plantas acumuladoras de frutanos apresentam-se menos sensíveis à sinalização por NO ou esta sinalização é capaz de regular, por modificações transcricionais e/ou pós-traducionais, a atividade das enzimas do metabolismo de frutanos e expressão dos genes relacionados?

Sob condições de estresse, o NO induz de maneira similar o sistema antioxidante enzimático e o não enzimático, considerando o papel dos frutanos como compostos antioxidantes?

## 2. OBJETIVOS

Avaliar o papel do óxido nítrico no controle do metabolismo de frutanos, determinando sua possível ação como regulador da atividade e expressão de enzimas de síntese e degradação (SST, FFT e FEH) e, também, nas respostas antioxidantes de *L. perenne*, em condição controle e sob estresse hídrico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material vegetal e desenho experimental

##### 3.1.1. Efeito de duas concentrações de solução doadora de NO (GSNO) no metabolismo de frutanos de *Lolium perenne* cultivado em hidroponia

As sementes de *Lolium perenne* var AberAvon utilizadas nesse trabalho foram gentilmente cedidas pelas Dras. Annette Morvan-Bertrand e Marie Pascale Prud'homme, do Laboratório Écophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions (UMR INRA-UCN 950) da Université de Caen, França. As sementes foram germinadas em caixas transparentes do tipo gerbox<sup>®</sup> por duas semanas em câmaras do tipo BOD sob fotoperíodo de 16h luz/8h escuro e alternância de temperatura de 23° C dia e 18° C noite (Gadegaard *et al.* 2008), com reposição de água destilada (5 mL) a cada 4 dias.

Quando as plântulas apresentaram 2 folhas com aproximadamente 6 cm de comprimento, foram transferidas para 12 caixas de cultivo em hidroponia (Araponics<sup>®</sup>), com capacidade para 70 plantas cada, e mantidas em solução nutritiva EVA meia força, com modificações: 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,2 mM NaFe EDTA e micronutrientes (14 μM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 5 μM MnSO<sub>4</sub>, 3 μM ZnSO<sub>4</sub>, 0,7 μM CuSO<sub>4</sub>, 0,7 μM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> e 0,1 μM CoCl<sub>2</sub>) (Prud'homme *et al.* 1992) e com período de aclimação de uma semana e troca do meio a cada dois dias. As caixas de hidroponia foram mantidas em sala de cultivo com fotoperíodo de 16h de luz, aproximadamente 100 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> de luminosidade e temperatura de 23 (± 2) °C (Figura 5), sendo o meio nutritivo aerado constantemente com o uso de uma bomba de ar com regulador de fluxo.



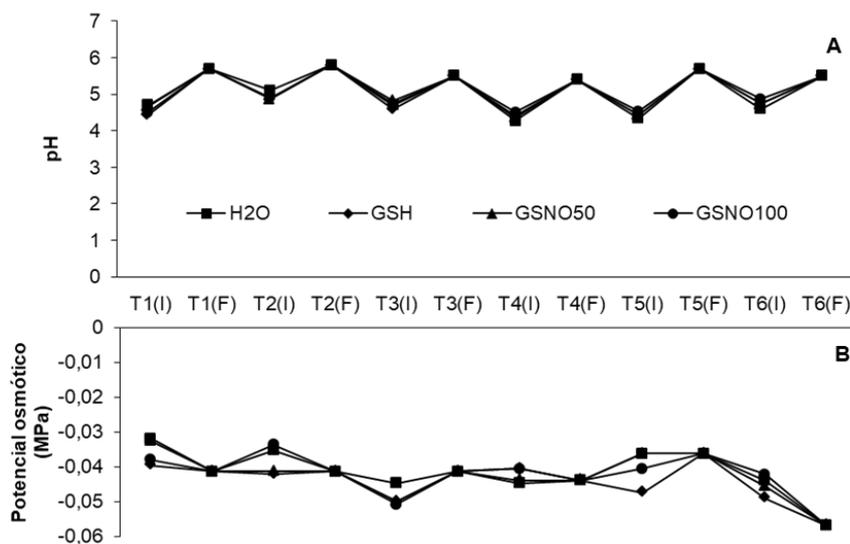
**Figura 5.** Plantas de *Lolium perenne* mantidas em caixas de hidroponia dentro de sala de cultivo no Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica.

Após uma semana de aclimatação, quando as plantas apresentaram 4 e 5 folhas com 12-15 cm de comprimento, foi iniciado o tratamento. As 12 caixas de hidroponia foram separadas em 4 lotes (cada lote com 3 caixas) para aplicação dos tratamentos: aspersão foliar de 15 mL de água destilada (controle) ou de solução 100  $\mu$ M GSH, 50  $\mu$ M GSNO ou 100  $\mu$ M GSNO nas folhas. A forma de aplicação das soluções foi definida em experimento prévio, onde a aplicação diretamente na solução de hidroponia ou a aspersão foliar foram comparadas e não foram observadas diferenças entre os tratamentos. A aplicação por aspersão foliar foi escolhida como forma de tratamento por uma questão de economia do reagente e facilidade de aplicação.

As trocas dos meios de cultivo, medidas de pH e potencial osmótico, bem como a aspersão das soluções foram realizadas a cada dois dias por 15 dias. Os valores de pH e potencial osmótico do meio são apresentadas na Figura 6.

No 16º dia, o material foi coletado, sendo realizadas medidas de crescimento e contagem do número de folhas (n=10), seguidas da separação das plantas em raízes, bainhas foliares e lâminas foliares, pesagem e congelamento em nitrogênio líquido para análises bioquímicas em quadruplicatas compostas.

O material vegetal congelado foi pulverizado e enviado congelado para o Laboratório de Écophysiologie Végétale, Agronomie & Nutritions NCS (UMR INRA-UCN 950) da Université de Caen, França, onde foram realizadas análises bioquímicas, por meio do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior/CAPES (PDSE/CAPES) e sob supervisão e orientação da Dra. Annette Morvan-Bertrand e da Dra. Marie-Pascale Prud'homme.



**Figura 6.** Valores de pH (A) e potencial osmótico (B) do meio de hidroponia para o cultivo de plantas de *Lolium perenne* submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, GSH 100 µM, GSNO 50 µM e GSNO 100 µM). (I) – inicial, dia da troca do meio; (F) – final, dois dias após a troca.

*3.1.2. Aplicação de GSNO em Lolium perenne cultivado em hidroponia e submetido a estresse hídrico induzido por manitol: conteúdo de S-nitrosotióis e atividade de enzimas do metabolismo antioxidante*

A obtenção do material vegetal foi realizada de acordo com o item acima e, após duas semanas de aclimação, quando as plantas apresentaram entre 5-6 folhas com aproximadamente 15-20 cm de comprimento, foi iniciado o pré-tratamento com solução doadora de NO por aspersão. As plantas provenientes das 12 caixas de hidroponia foram submetidas aos seguintes tratamentos: aspersão foliar com 15 mL de água destilada (4 caixas), com 100  $\mu$ M GSH (4 caixas) ou com 100  $\mu$ M GSNO (4 caixas) por uma semana. As trocas dos meios e a aspersão das soluções foram realizadas a cada 2 dias.

Após o período de uma semana com os tratamentos de aspersão, 6 caixas foram mantidas em meio tradicional de cultivo em hidroponia e à outras 6 caixas foi adicionado manitol ao meio para uma concentração final de 200 mM, visando induzir o déficit hídrico.

As plantas foram mantidas em déficit hídrico induzido por manitol por 4 dias, mantendo-se os tratamentos de aspersão a cada 2 dias, totalizando 6 tratamentos com 2 caixas cada um. Para verificação da condição de estresse foram feitas medidas de potencial osmótico, sendo os potenciais no primeiro dia de imposição de estresse de -0,23 MPa para o controle e -0,62 MPa para o meio acrescido de manitol. Ao final do experimento, no 4º dia de tratamento com manitol, não foram observadas alterações nos valores do potencial osmótico.

Após este período, as plantas foram coletadas, sendo realizadas medidas de crescimento e contagem do número de folhas (n=10) e, em seguida, separação das raízes, bainhas foliares e lâminas foliares.

Para determinação do peso fresco e seco, as raízes, bainhas e lâminas foliares provenientes de 4 plantas de cada tratamento (n=4) foram pesadas separadamente e mantidas em estufa a 70°C até atingirem peso constante. Pela diferença entre massa fresca e seca,

também foi determinado o teor de água para cada tecido, por meio da fórmula  $TA = [(MF/MS) \times 100]$ .

Para as análises bioquímicas, as demais plantas foram separadas conforme descrito acima, pesadas e congeladas em nitrogênio líquido em triplicatas compostas.

### *3.1.3. Aplicação de GSNO por aspersão foliar em plantas de *Lolium perenne* crescidas em tubetes e submetidas ao déficit hídrico por suspensão de rega*

Tubetes de 280 mL foram preenchidos com areia e vermiculita na proporção de 3:1. Em cada tubete, foram colocadas 12 sementes de *L. perenne*. Os tubetes foram regados sempre que necessário e a cada 7 dias foi aplicada solução nutritiva EVA meia força (com modificações, conforme citado no item 3.1.1.). Após dois meses de cultivo em casa de vegetação, as plantas foram separadas em lotes para o início do tratamento.

Os tubetes foram separados em 6 lotes com 15 tubetes cada um, que receberam os seguintes tratamentos: 1) aspersão foliar com 60 mL de água destilada, em plantas hidratadas (H<sub>2</sub>O); 2) aspersão foliar com 60 mL de água destilada, em plantas sob suspensão de rega (H<sub>2</sub>O (D)); 3) aspersão foliar com 60 mL de solução 100 µM GSH, em plantas hidratadas (GSH); 4) aspersão foliar com 60 mL de solução 100 µM GSH, em plantas sob suspensão de rega (GSH (D)); 5) aspersão de 60 mL de solução 100 µM GSNO, em plantas hidratadas (GSNO); 6) aspersão de 60 mL de solução 100 µM GSNO, em plantas sob suspensão de rega (GSNO (D)).

No início do experimento, todos os tubetes foram regados até sua capacidade de campo e pesados, para o acompanhamento da perda de água no solo. Os tubetes contendo as plantas foram inseridos em caixas organizadoras plásticas transparentes de 65 L cobertas por plástico poroso para permitir as trocas gasosas com o ambiente (Figura 7).

Cinco tubetes de cada tratamento foram pesados a cada 48h e as plantas mantidas sob hidratação receberam reposição de 15 mL de água após cada pesagem. Os tratamentos de

aspersão foram feitos a cada 48h. Após aspersão as caixas foram tampadas por 24h e abertas no dia seguinte para a evaporação da água excedente das soluções. Ao atingir cerca de 80% de teor de água no solo as plantas em déficit hídrico apresentaram fortes sinais de déficit hídrico e então, foram coletadas folhas inteiras, não sendo feita separação entre bainha foliar e lâmina foliar. As amostras foram congeladas e pulverizadas em nitrogênio líquido para as análises bioquímicas e moleculares.

Para determinação do peso fresco e seco, 4 plantas foram separadas em bainha foliar e lâmina foliar. Cada porção foliar foi pesada individualmente e mantida em estufa a 70°C até atingir peso constante. Pela diferença entre a massa fresca e seca, também foi determinado o teor de água para cada tecido, por meio da fórmula  $TA = [(MF/MS) \times 100]$ .



**Figura 7.** Plantas de *Lolium perenne* mantidas em caixas plásticas dentro da casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica.

## 3.2. Análises

### 3.2.1. Determinação do potencial hídrico das plantas e do substrato

O suco celular foi extraído a partir da pulverização do material congelado dentro de tubos eppendorff com o fundo perfurado, seguida de centrifugação, por meio da qual a seiva foi coletada em outro tubo eppendorff intacto. Medidas de osmolaridade (Osm) da seiva obtida de raízes e folhas foram feitas em osmômetro de pressão de vapor (modelo 5520 VAPRO, Wescor, Logan-UTAH) e então o potencial hídrico foi calculado a partir da conversão da osmolaridade em MPa, através da fórmula:  $MPa = - Osm \times 2,58 \times 10^{-3}$ . Para as análises de potencial hídrico do substrato, utilizou-se um psicrômetro de ponto de orvalho (Modelo Decagon WP4).

### 3.2.2. Quantificação de S-nitrosotióis

A estimativa do teor de S-nitrosotióis (SNO) foi realizada no material vegetal em triplicatas biológicas compostas, utilizando o método de Saville (1958). 100 ou 200 mg de material foram homogeneizados em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 (5:1, v:p) a aproximadamente 4° C na ausência de luz. Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 12000g a 4° C por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido e mantido a 4° C.

A quantificação do teor de SNO no extrato foi realizada em microplaca a partir de alíquotas de 50 µL de extrato em duas reações: (1) adição de 50 µL de sulfanilamida 1% em 0,5 M HCl e incubação em temperatura ambiente desta reação por 7 min. (2) adição de 50 µL de sulfanilamida 1% em 0,5 M HCl acrescida de 0,2% de cloreto de mercúrio e incubação em temperatura ambiente por 7 min. Finalizado o tempo de incubação, foi adicionado a todas as misturas 100 µL de reagente de Griess (N-(1-Naftil)etilenodiamina dihydrochlorido 0,2% em água deionizada) seguida de uma nova incubação de 7 minutos (Frunghillo *et al.* 2013).

A leitura das absorvâncias foi feita a 540 nm e o conteúdo de SNO foi determinado pela diferença entre as absorvâncias das reações (1) e (2), utilizando GSNO como padrão.

### 3.2.3. *Quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e OH•*

A extração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizada a partir de 100 mg de material vegetal, conforme descrito por Velikova *et al.* (2000). As reações foram realizadas em microplacas com 96 poços a partir da adição de 75 µL de extrato, 75 µL de solução 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0 e 150 µL de solução 1 M iodeto de potássio por poço. A microplaca foi incubada em gelo no escuro por 10 min e após a reação o produto obtido foi analisado em leitor de microplaca a 350 nm e o teor de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> estimado baseado em curva padrão (adaptado de Junglee *et al.* 2014).

Para a quantificação de OH•, 200 mg de material foram homogeneizados em 1,5 mL de solução contendo 6 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,4 e 15 mM 2-desoxi-D-ribose. Os homogeneizados foram centrifugados a 16 000 g a 4°C por 25 min e os sobrenadantes foram incubados a 37°C por 2 horas (adaptado de Beligni & Lamattina, 2002). A reação entre OH• presente no extrato com a 2-desoxi-D-ribose resultou em malondialdeído (MDA), que por sua vez foi quantificado por uma mistura em partes iguais do extrato, 1% (p:v) de ácido tiobarbitúrico em 50 mM NaOH e 2,8% (p:v) de ácido tiobarbitúrico. Estas reações foram incubadas a 100 °C por 20 min (Halliwell & Gutteridge, 1988) e as absorvâncias foram obtidas em leitura a 532 e 600 nm e o conteúdo de MDA foi calculado de acordo com Heath and Packer (1968).

### 3.2.4. *Peroxidação lipídica*

A peroxidação lipídica foi estimada pela quantificação do conteúdo de MDA. A extração foi realizada a partir de 100 mg de material homogeneizado em 1 mL de 0,1% de ácido tricloroacético. Os extratos foram centrifugados a 15 600 g por 10 min a 4 °C, como

descrito por Boaretto *et al.* (2014). A quantificação foi realizada pelas absorvâncias obtidas em leitura a 532 e 600 nm e o conteúdo de MDA foi calculado de acordo com Heath and Packer (1968).

### 3.2.5. Quantificação de ASC e GSH

Os conteúdos de ASC e DHA foram obtidos conforme descrito por Gillespe & Ainsworth (2007). A extração foi feita a partir de 100 mg de material em 2 mL de 6% de ácido tricloroacético. Neste homogeneizado, o conteúdo de ASC foi estimado pela redução do íon férrico pelo ascorbato em íon ferroso a 525 nm. A quantificação do ascorbato total (ASC+DHA) foi feita pela adição de DTT e *N*-etilmaleimida (para remover o excesso de DTT) para promover a redução do DHA em ASC. O DHA foi calculado pela subtração dos conteúdos de ASC do ascorbato total.

Já o conteúdo de GSH e GSSG foi quantificado conforme descrito por Israr *et al.* (2006), com modificações. O extrato foi obtido a partir da homogeneização de 100 mg de material em 2 mL de 0,1% de ácido sulfosalicílico. Os extratos foram centrifugados a 10 000 g por 20 min a 4 °C. Para determinar o conteúdo de GSH, 125 µL de extrato foram misturados com 875 µL de 0,5 mM EDTA e 50 µL 0,3 mM 5,5'-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzenico) (DTNB), ambos dissolvidos em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0. Após 5 minutos de incubação em temperatura ambiente, uma alíquota das misturas foi transferida para microplaca e analisadas a 412 nm. Para o conteúdo de glutatona total (GSH+GSSG), foram adicionados 50 µL de 0,5 mM NADPH diluído em 100 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0 e 2 µL da enzima GR. Após 20 min de incubação em temperatura ambiente, alíquotas de 150 µL foram transferidas para microplaca e analisadas sob mesma absorvância. O conteúdo de GSSG foi calculado pela subtração de GSH do conteúdo de glutatona total.

### 3.2.6. Atividade das enzimas do metabolismo antioxidante

#### a) Preparação do extrato enzimático

Amostras de 200 mg de material foram homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato 1 M, pH 7,5, acrescido de 1 mM EDTA, 50 mM NaCl e 2% PVPP, segundo protocolo de Souza *et al.* (2013), modificado. A extração foi realizada a 4 °C no escuro e, a seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 11000g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e mantido a -80° C até o momento de análise.

Os extratos foram incubados em diferentes reações para determinação das atividades das enzimas catalase, glutathione redutase e ascorbato peroxidase em até 24 horas após a extração.

#### b) Ensaio para determinação da atividade da Glutathione redutase

Para estimar a atividade da glutathione redutase foram acrescentados à mistura de incubação tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, 0,15 mM NADPH, 0,5 mM glutathione oxidada (GSSG), 3 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 µL de extrato enzimático. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 340 nm durante 2 minutos com 15 segundos de intervalo de leitura (Schaedle & Basham 1977) e expressa em µmol de substrato convertido em produto por minuto por g de massa fresca.

#### c) Ensaio para determinação da atividade da Ascorbato peroxidase

A mistura de incubação para determinação da ascorbato peroxidase incluiu tampão fosfato 50 mM, pH 7,0, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM ácido ascórbico, 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 50 µL de extrato enzimático. A leitura foi feita em espectrofotômetro a 290 nm durante 2 minutos com 15 segundos de intervalo de leitura (Weng *et al.* 2007) e expressa em µmol de substrato convertido em produto por minuto por g de massa fresca.

### 3.2.7. Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis foram extraídos a partir de 200 mg de material fresco de raízes, bainhas foliares e lâminas foliares, separadamente. O material foi homogeneizado em etanol 80% e mantido a 80° C por 15 minutos; em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 20000g e o sobrenadante foi recolhido. Este processo foi repetido mais duas vezes com o precipitado e os sobrenadantes foram reunidos (adaptado de Lothier *et al.* 2007).

Os extratos obtidos foram concentrados em SpeedVac para eliminação do etanol e em seguida congelados e liofilizados. Para o experimento descrito no item 3.1.1., o material liofilizado foi ressuscitado em 250 µL de água deionizada e purificado em colunas de troca iônica contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50W X8-400) e aniônica (Dowex 1 X8-400) e PVPP (Polivinil polipirrolidona) (Bachmann *et al.* 1994). Os extratos purificados foram analisados por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) em sistema Sugar-PAK, 30036.5 mm (Millipore Waters, Milford, MA) para quantificação de glicose, frutose, sacarose e frutanos com base na área dos picos, utilizando manitol como padrão interno (Lothier *et al.* 2007).

Para o experimento descrito no item 3.1.3., o material liofilizado foi ressuscitado em 250 µL de água deionizada e submetido à análise colorimétrica para quantificação dos açúcares redutores (Somogyi 1945) e do conteúdo total de frutanos pelo método de antrona modificado (Jermyn 1956).

### 3.2.8. Atividade de enzimas do metabolismo de frutanos

#### a) Preparação do extrato enzimático

Cerca de 1 g de material vegetal, previamente pulverizado em nitrogênio líquido, foi homogeneizado em 1 mL de tampão citrato-fosfato 80 mM, pH 5,5, acrescido de 5 mM de ditioneitol (DTT). O homogeneizado foi centrifugado a 20000g a 4° C por 10 minutos e o sobrenadante recolhido e ajustado para 3 mL. Uma alíquota de 2,5 mL de cada extrato foi

semi- purificada em coluna Sephadex G50 (previamente equilibrada com 25 mL de tampão) e então eluída com 3,5 mL de tampão, resultando no extrato final (Lasseur *et al.* 2006).

*b) Ensaio das atividades enzimáticas*

Os extratos foram incubados por 2 horas a 37° C com o respectivo substrato de cada enzima na proporção de 1:1 (v:v). As enzimas analisadas e os detalhes da mistura de incubação são apresentados na Tabela 1. Após o período de incubação foi realizada a inativação das enzimas a 100° C por 5 minutos (Lasseur *et al.* 2006).

**Tabela 1.** Substratos e métodos de detecção dos produtos utilizados para determinação das atividades das enzimas do metabolismo de frutanos.

Enzima	Substrato	Concentração inicial (Solução)	Concentração final (na mistura de incubação)	Produto analisado
1-SST	Sacarose	200 mM	100 mM	1-Cestose
INV	Sacarose	200 mM	100 mM	Frutose
1-FFT	1-Cestose	200 mM	100 mM	Nistose
6G-FFT	Sacarose + 1-Cestose	200 + 200 mM	100 + 100 mM	Neocestose
FEHs (total)	Frutanos de <i>Lolium perenne</i>	10%	5%	Frutose
1-FEH	Inulina de <i>Cichorium intybus</i>	10%	5%	Frutose
6-FEH	Levano de <i>Erwinia herbicola</i>	10%	5%	Frutose

Para o experimento descrito no item 3.1.1., os produtos de incubação das enzimas 1-SST e INV foram purificados em colunas de troca iônica contendo resinas nas formas catiônica (Dowex 50W X8-400) e aniônica (Dowex 1 X8-400) e PVPP (Polivinil polipirrolidona) (Bachmann *et al.* 1994) e analisados por HPLC, como descrito anteriormente (item 3.2.6.). A quantificação das atividades foi feita com base na área dos picos de 1-cestose (para a 1-SST) e de frutose (para a invertase) comparados ao pico de manitol, utilizado como padrão interno (Lasseur *et al.* 2006).

Os produtos de incubação da 1-FFT e 6G-FFT foram analisados por HPAEC/PAD Dionex modelo ICS-3000, em coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm). A eluição destes produtos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0-1 min, 0 mM; 1,01-7 min, 50 mM; 7-12 min, 100 mM; 12-18 min, 175 mM; 18-19 min, 250 mM; 19-30 min, 425 mM; 30-40 min, 450 mM; 40-60 min, 495 mM; 60-65 min, 25 mM. A quantificação dos produtos formados foi feita utilizando-se padrões externos e comparando-os às áreas dos picos da nistose e da neocestose para as atividades da 1-FFT e da 6G-FFT, respectivamente (Lasseur *et al.* 2006).

A frutose liberada como produto da incubação das enzimas FEHs total, 1-FEH e 6-FEH foi quantificada por método colorimétrico, utilizando o *kit* D-Fructose/D-Glucose Assay Kit (Código: K-FRUGL - Megazyme<sup>®</sup>) (Gasperl *et al.* 2015).

Para o experimento descrito no item 3.1.3., os produtos da incubação foram diluídos 20 vezes e analisados por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS-3000, em coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm). A eluição destes produtos foi feita utilizando-se um gradiente da mistura do eluente A (150 mM de hidróxido de sódio) e eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de hidróxido de sódio) com a seguinte programação: 0-2 min, 25 mM; 2,1-8,5 min, 50 mM; 8,6-10 min, 75 mM; 10,1-28 min, 100 mM; 28,1-30 min, 500 mM; 30,1-40 min, 25 mM (Asega *et al.* 2008). A quantificação dos produtos formados foi feita utilizando-se padrões externos e comparando-os às áreas dos picos do produto da atividade (Tabela 1).

### 3.2.9. Ensaio de atividade de enzimas do metabolismo de frutanos com aplicação direta de GSNO no extrato enzimático *in vitro*

Extratos enzimáticos obtidos da parte aérea de plantas controle (aspersão foliar com água e hidratadas) foram utilizados para testar o efeito direto do NO (*in vitro*) na atividade das enzimas de frutanos.

Para a incubação, alíquotas do extrato enzimático foram divididas em 7 lotes diferentes, mantendo a proporção de 1:1 (v:v; extrato:substrato) para cada enzima e seguindo o mesmo esquema de incubação apresentado na Tabela 1 do item 3.2.7.

Um dos extratos foi mantido sem tratamento e às demais misturas de incubação foram adicionados GSH ou GSNO nas concentrações de 10, 50 e 100  $\mu\text{M}$ .

Os produtos de incubação das enzimas 1-SST, 1-FFT, FEH total e INV foram analisados por cromatografia de troca aniônica de alta resolução e detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD) em sistema de cromatografia Dionex modelo ICS-3000, em coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm), conforme descrito no item anterior.

### 3.2.10. Análise da expressão de genes do metabolismo de frutanos e antioxidante por *qRT-PCR*

Para extração do RNA total, 100 mg de folhas coletadas de cada tratamento em duplicatas biológicas, previamente congeladas e pulverizadas em nitrogênio líquido, foram extraídas utilizando-se o kit *InviTrap® Spin Plant RNA Mini Kit* (Stratec molecular), com solução de lise RP, segundo instruções do fabricante. Os RNAs extraídos foram quantificados em nanofotômetro (Implen) e submetidos à análise de eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X para verificar a integridade do RNA obtido. Apenas amostras de RNA total íntegro e com valor da razão de absorbância  $\lambda_{260/280}$  entre 1,8 e 2,0 foram selecionadas para utilização.

Posteriormente, 1 µg de RNA total foi tratado com *DNase I Amplification grade* (Invitrogen), seguindo orientações do protocolo, visando eliminar a contaminação com DNA genômico. As amostras livres de DNA genômico, foram utilizadas para a síntese de cDNA com o kit *ImProm-II<sup>TM</sup> reverse transcriptase* (Promega), seguindo orientações do protocolo.

Os *primers* gene-específicos para a análise de expressão gênica foram selecionados com base na literatura e previamente desenhados para as sequências de *L. perenne*, conforme apresentado na Tabela 2. Para teste inicial da especificidade dos *primers* e qualidade do cDNA sintetizado, os diferentes cDNAs foram misturados em quantidades equimolares e utilizados como molde para uma PCR, visando verificar a presença de uma única banda e o seu tamanho. A PCR foi realizada a partir de 1 µL de cDNA, com o kit *5x FIREPol® Mistura Master* (Solis Biodyne). As condições de ciclo foram: 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 seg a 95°C, 45 seg a 60°C, 40 seg a 72°C e, extensão final por 5 min a 72°C.

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando-se o kit *Maxima SYBR Green qPCR Master mix* (Thermo Scientific) em termociclador Mastercycler® ep *realplex 2S* (Eppendorff), de acordo com as instruções do fabricante. O programa utilizado foi: 10 min a 95° C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95° C, 1 min a 60° C. Para gerar a curva de *melting*, a temperatura foi aumentada gradativamente por 20 min, de 60° C a 95° C.

Para as análises foram selecionadas duas amostras de cada tratamento. As reações de qPCR foram realizadas com triplicatas técnicas. A diluição do cDNA selecionada para as reações de qRT-PCR foi a de 1:20 para todos os genes.

Os dados de CT de cada amostra foram obtidos e os valores de expressão relativa foram determinados pelo método Delta-Delta CT (Livak & Schmittgen 2001), tendo por referência os valores do controle H<sub>2</sub>O e normalizados pelo gene constitutivo eEF-1α. A especificidade da reação foi avaliada por meio da curva de dissociação para verificar a qualidade do produto amplificado, sendo utilizados somente *primers* cujos produtos

amplificados mostraram um único pico, claro e bem definido (Anexo 1 – Figura 25). O software Realplex 2.2 (Eppendorf) foi utilizado para gerar a curva padrão de cada produto de amplificação, as curvas de dissociação e suas análises.

**Tabela 2.** Sequências dos *primers* utilizados em experimentos de qRT-PCR com *Lolium perenne*.

Gene	Sequências dos primers Forward/Reverse	Tamanho do fragmento (pb)	Anelamento (°C)	Referência
<i>LpCAT</i>	F – 5'-CACCTTCGACAAGAAGACGA-3'	~150	52	Zhang <i>et al.</i> 2016
	R – 5' CTCGAGCAGGTGGTAGTCCT-3'		55	
<i>LpAPX2</i>	F – 5'-CCCTCGTGGAGAAATATGCT-3'	76	51	Zhang <i>et al.</i> 2016
	R – 5'- TCAGATAGCCTGAGGTGTGC -3'		53	
<i>LpGR</i>	F – 5'-CAGCTGCTGTATTCTCCCAA-3'	~150	52	Zhang <i>et al.</i> 2016
	R – 5'- CCAGAAAGAGTGGCCCTAAG- 3'		52	
<i>Lp1-FEH</i>	F – 5'-CACATCAAAGCTACATGGTT-3'	210	48	Gasperl <i>et al.</i> 2016
	R – 5'- CCACTGGATAAACTCTGGAC -3'		49	
1-FFTα	F – 5'-ATTGGGCTGAGGTACGACTG-3'	182	54	Rigui 2019
	R – 5'- CGGGTCTTCTCGTCTAGTGC -3'		54	
<i>eEF-1α</i>	F – 5'-GGCTGATTGTGCTGTGCTTA-3'	114	53	Gasperl <i>et al.</i> 2016
	R – 5'- CTCACTCCAAGGTTGAAAGC -3'		53	

### 3.2.11. Análise dos dados

Para comparação dos dados quantitativos entre os diferentes tratamentos do experimento descrito no item 3.1.1., foi realizada uma análise de variância de um fator utilizando-se o programa SISVAR 4.2, e aplicando-se o teste de Tukey com 5% de significância.

Já para os experimentos descritos nos itens 3.1.2. e 3.1.3., foram realizados testes de normalidade e verificado que todos os valores numéricos obtidos são normais, foi realizada uma análise de variância de dois fatores comparando as médias dos tratamentos de aspersão foliar (H<sub>2</sub>O, GSH e GSNO) e as condições de hidratação controle e sob déficit hídrico com 5% de significância.

### 3.2.12. Análise por ferramentas preditivas de sítios de S-nitrosilação e nitração nas sequências das enzimas dos metabolismos de frutanos e antioxidante

Para identificação dos potenciais sítios de S-nitrosilação e nitração, foram utilizadas três ferramentas previamente testadas e selecionadas por Jimenez-Quesada *et al.* (2017): iSNO-AAPair e GPS-SNO 1.0, que identificam potenciais cisteínas alvo de S-nitrosilação e o GPS-YNO2, que identifica potenciais tirosinas alvo de nitração.

A iSNO-AAPair possui servidor web acessível (<http://app.aporc.org/iSNO-AAPair>) e suporta grandes arquivos de entrada. Já para o GPS-SNO 1.0, foi utilizada a versão software disponível para download (<http://sno.biocuckoo.org/down.php#>) e neste software é possível selecionar um “score” de probabilidade de S-nitrosilação (baixo, médio ou alto), dando maior confiabilidade nos resultados.

Para verificação da nitração, foi utilizado o software GPS-YNO2 também disponível para download (<http://yno2.biocuckoo.org>). Este software também apresenta “scores” de probabilidade.

Sequências de genes dos metabolismos de frutanos e antioxidante de *Lolium perenne* disponíveis no *GenBank* foram traduzidas para proteínas no próprio website e estas sequências proteicas traduzidas foram inseridas nas ferramentas em formato FASTA.

### 3.2.13. Detecção de proteínas S-nitrosiladas

Alíquotas de cada tratamento do experimento descrito no item 3.1.3. foram unidas formando seis amostras totais para a extração de proteínas e detecção de proteínas S-nitrosiladas

Aproximadamente 300 mg de material fresco previamente pulverizado em nitrogênio líquido foram homogeneizados em tampão HENS (100 mM HEPES, pH 7.8; 1 mM EDTA; 0,1 mM Neocuproine; 1% SDS) (Thermo Scientific), na proporção de 1:1. Após centrifugação a 10000 g por 15 minutos (4° C) o sobrenadante foi recolhido e as proteínas

totais foram quantificadas utilizando o *kit* 2-D Quant Kit Protein Assay (GE Healthcare Life Sciences).

Inicialmente, a partir de 100  $\mu$ g de proteínas foi realizado o bloqueio das cisteínas livres presentes nas proteínas do extrato adicionando 1M de metil metanotiosulfonato (MMTS) e incubando por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida, as proteínas foram precipitadas adicionando acetona a  $-20^{\circ}$  C para retirada do excesso do MMTS. Após 1 h de precipitação, as amostras foram centrifugadas a 10000 g por 10 min a  $4^{\circ}$ C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 100  $\mu$ L de tampão HENS.

Em seguida, foi adicionado às amostras 1M de ascorbato de sódio para redução das cisteínas que foram *S*-nitrosiladas e 0,5 M de iodoTMT (Thermo Scientific) que se liga ao grupo tiol previamente *S*-nitrosilado e reduzido pelo ascorbato. As amostras foram incubadas por 90 min a  $25^{\circ}$  C.

Após tratamento, as proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 12% (SDS-PAGE), com tempo de corrida de 1 h 30 min a 15  $\mu$ A e, em seguida transferidas para uma membrana de nitrocelulose por WesternBlot, com tempo de corrida de 1 h a 100 V. A membrana foi bloqueada com 5% de leite em pó desnatado solubilizado em tampão tris-salino (TBST) (BioRad) por 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação e, em seguida, lavada 5 vezes por 5 minutos em 1x TBST.

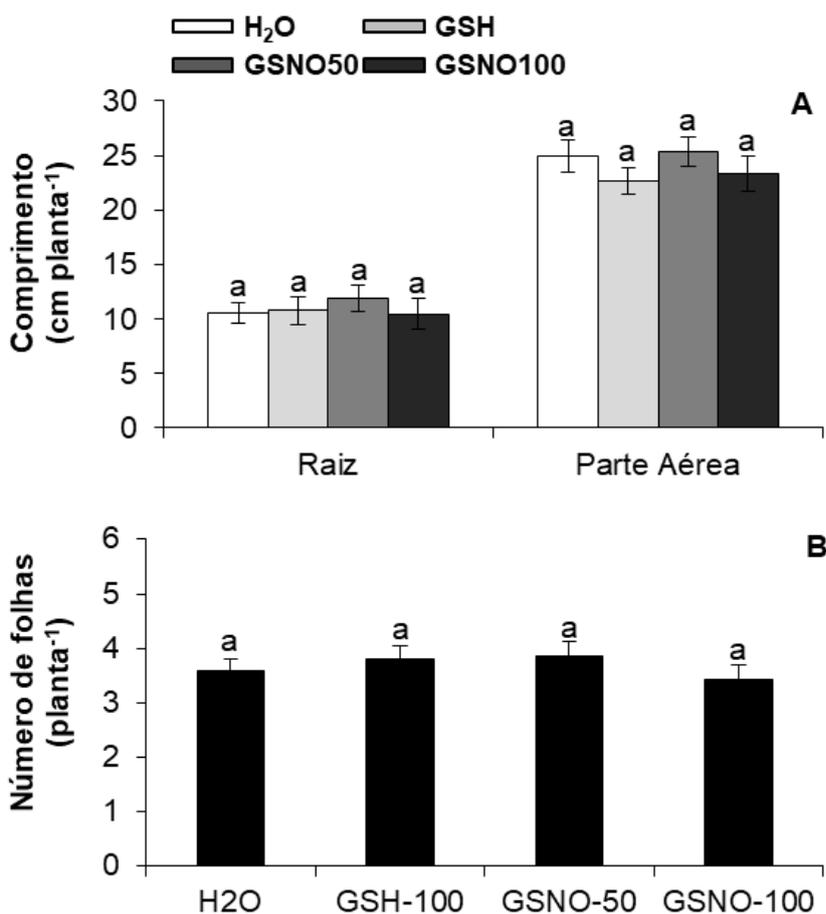
Após o bloqueio, a membrana foi primeiramente tratada por 1 hora, em temperatura ambiente sob agitação, com anticorpo Anti-TMT (Thermo Scientific) diluído na proporção de 1:1000 em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST e novamente lavada por 5 minutos, 5 vezes em 1x TBST. Em seguida foi feita uma nova incubação da membrana com um anticorpo secundário, IgG-HRP conjugado (Pierce Goat Anti-Mouse IgG-Horseradish Peroxidase Conjugate, Thermo Scientific) diluído na proporção 1:20000 em solução de 5% de leite em pó desnatado em TBST por 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação.

Finalizados os tratamentos, a membrana foi novamente lavada 5 vezes por 5 minutos em 1x TBST e finalmente incubada por 5 min com o reagente quimioluminescente SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific) por 5 minutos e imediatamente revelada em fotodocumentador ImageQuant LAS 400 (GE).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Efeito de duas concentrações de solução doadora de NO (GSNO) no metabolismo de frutanos de *Lolium perenne* cultivado em hidroponia

Os parâmetros de crescimento avaliados, comprimento da raiz e da parte aérea (Figura 8A) e número de folhas (Figura 8B), não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos.

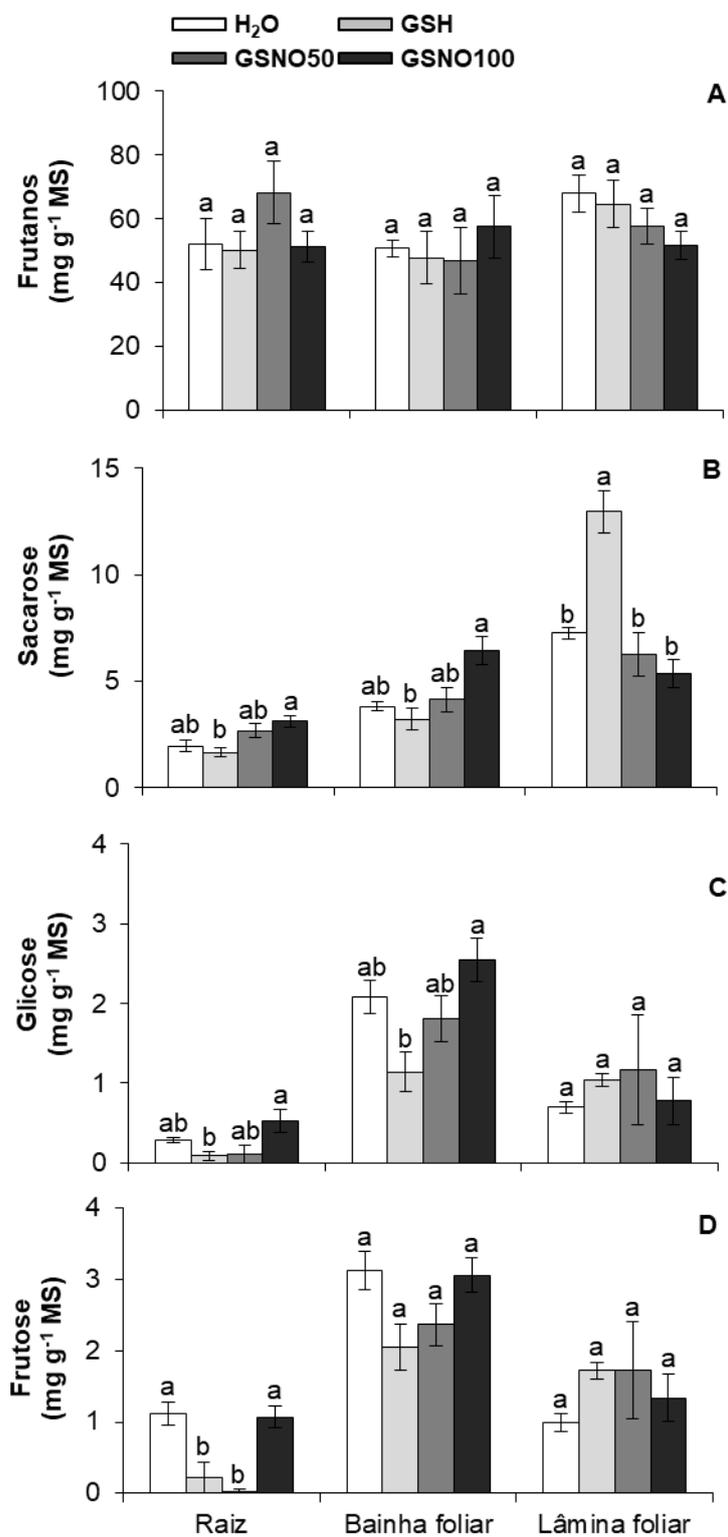


**Figura 8.** Comprimento das raízes e da parte aérea (A) e número de folhas (B) em plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 50  $\mu$ M GSNO e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=10). Letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos (teste tukey,  $p < 0,05$ ).

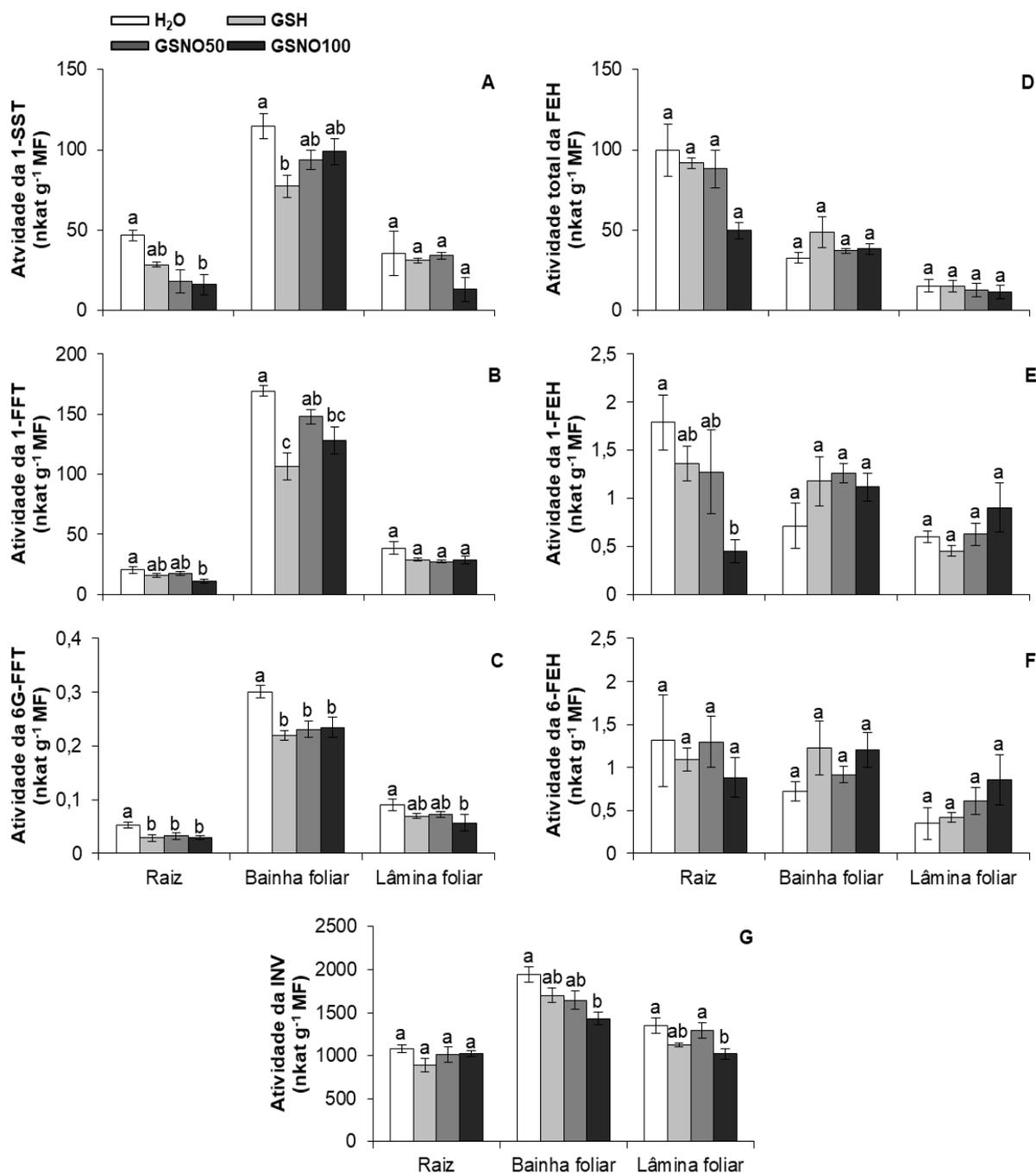
No teor de frutanos não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos em quaisquer das partes vegetais analisadas (Figura 9A). O tratamento com 100  $\mu\text{M}$  GSH resultou em aumento significativo de sacarose (Figura 9B) nas lâminas foliares e uma redução significativa de sacarose e glucose (Figura 9C) nas raízes e bainhas foliares. Com relação ao teor de frutose, os tratamentos com 100  $\mu\text{M}$  GSH e 50  $\mu\text{M}$  GSNO reduziram significativamente o conteúdo apenas nas raízes.

As enzimas de síntese, frutossiltransferases, apresentaram um padrão de inibição em todas as partes da planta, em especial nas bainhas foliares, nos tratamentos com GSH e GSNO. A 1-SST teve sua atividade significativamente inibida nas raízes tratadas com GSNO 50 e 100  $\mu\text{M}$  (Figura 10A); a 1-FFT apresentou inibição em raízes tratadas com 100  $\mu\text{M}$  GSNO e em bainhas foliares tratadas com 100  $\mu\text{M}$  GSH e 100  $\mu\text{M}$  GSNO (Figura 10B), enquanto a 6G-FFT apresentou inibição em raízes e bainhas em todos os tratamentos, quando comparados com o controle em água (Figura 10C).

Contrariamente, as enzimas de degradação de frutanos (as frutano exohidrolases) foram menos afetadas pelos diferentes tratamentos, sendo que a atividade total da FEH (Figura 10D) e a atividade da 6-FEH (Figura 10F) não apresentaram alterações significativas. A atividade da 1-FEH foi inibida em raízes tratadas com 100  $\mu\text{M}$  GSNO (Figura 10E). A atividade da INV foi significativamente inibida pelo tratamento com 100  $\mu\text{M}$  GSNO na bainha e nas lâminas foliares com relação ao controle em água (Figura 10G).



**Figura 9.** Conteúdo de frutanos (A), sacarose (B), glicose (C) e frutose (D) em plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH, 50  $\mu$ M GSNO e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=4). Letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos (teste tukey,  $p < 0,05$ ).



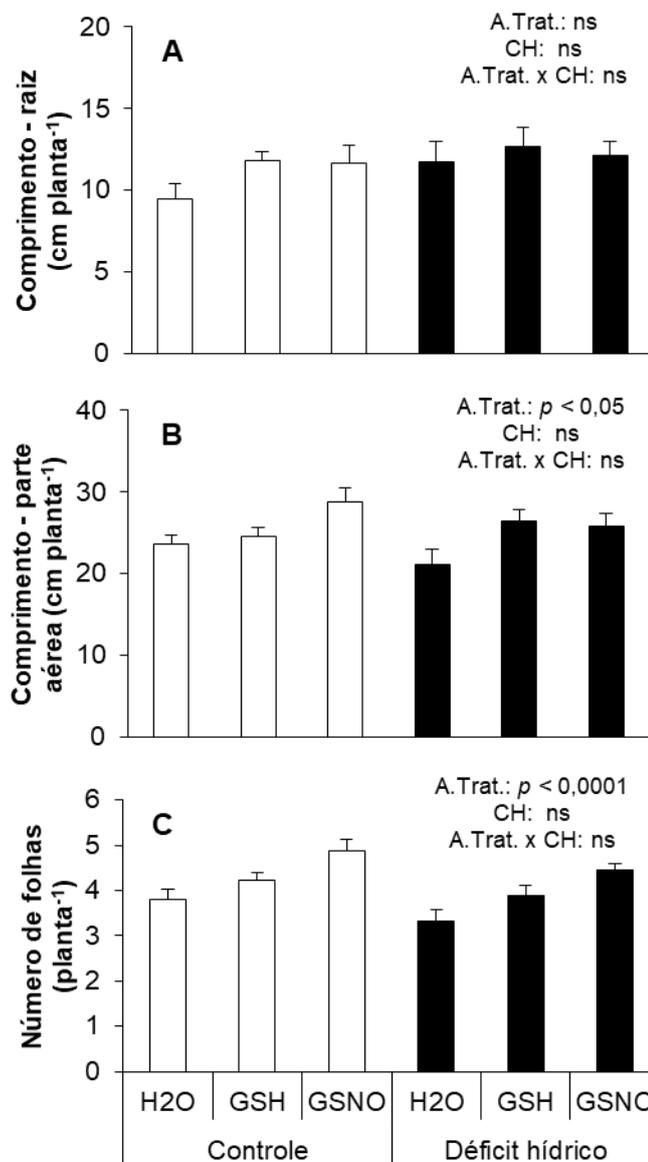
**Figura 10.** Atividade da 1-SST (A), 1-FFT (B), 6G-FFT (C), FEH total (D), 1-FEH (E), 6-FEH (F) e invertase (G) em plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH, 50  $\mu$ M GSNO e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=4). Letras minúsculas comparam os diferentes tratamentos (teste tukey, p<0,05).

#### **4.2. Efeito do pré-tratamento com GSNO em plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia e submetidas ao déficit hídrico induzido por manitol**

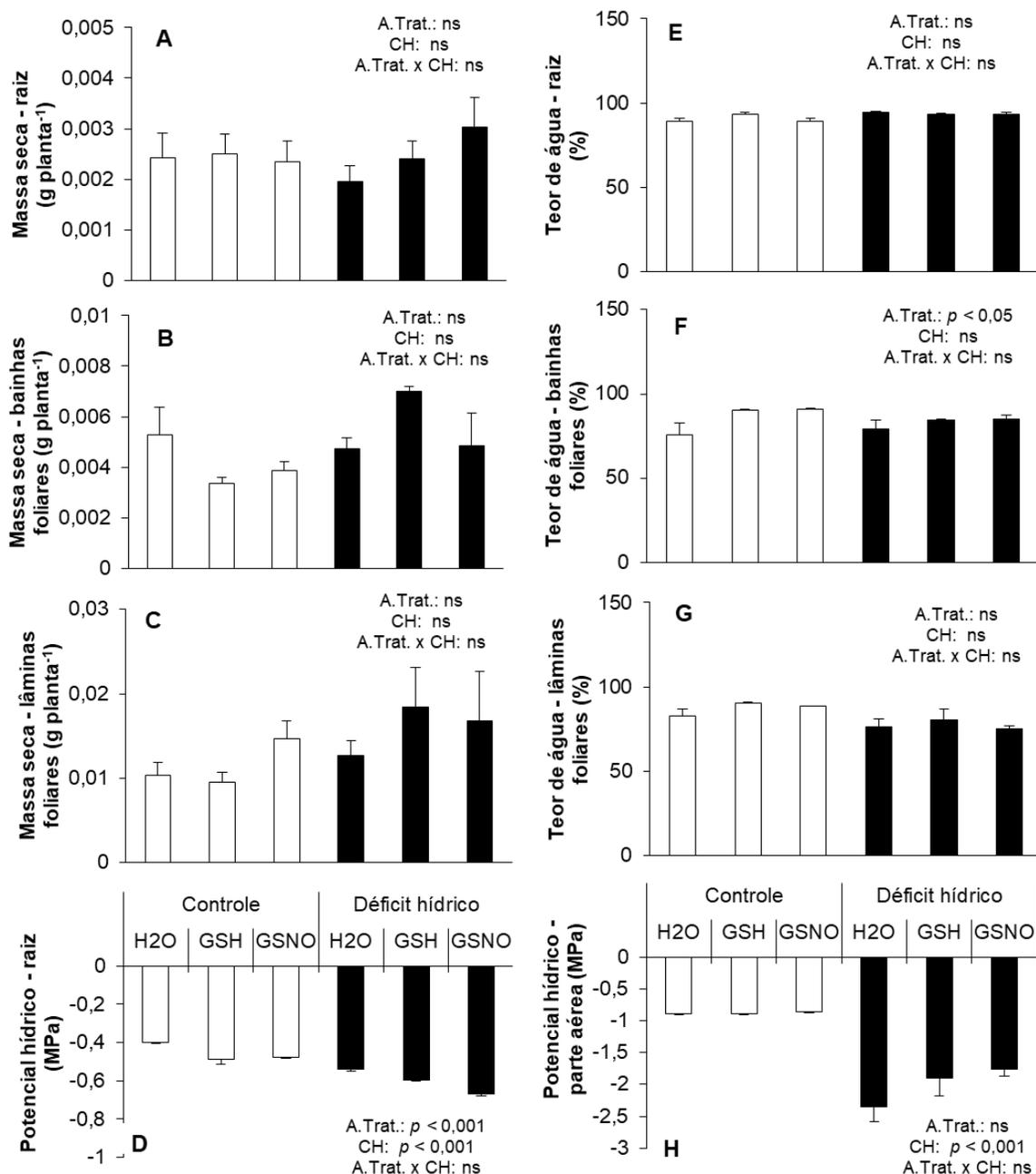
O comprimento da raiz não variou significativamente em resposta aos tratamentos com GSH ou GSNO (Figura 11A), assim como não variou em função da aplicação do estresse hídrico induzido por manitol. O comprimento da parte aérea mostrou aumento sob os tratamentos com GSH e GSNO (Figura 11B). Plantas tratadas com GSNO mostraram aumento significativo no número de folhas, tanto na condição controle quanto no déficit hídrico.

As plantas submetidas ao déficit hídrico por manitol não mostraram variações de massa seca nas diferentes partes da planta em relação às plantas controle (Figura 12A, 12B e 12C). O teor de água não variou significativamente entre os diferentes tratamentos (Figura 12E, 12F e 12G). O potencial hídrico amostrado nas raízes e na parte aérea (bainhas e lâminas foliares), foi mais negativo nas plantas sob déficit hídrico, com diferenças significativas induzidas por manitol, mas sem diferenças entre os tratamentos com GSH e GSNO, exceto pelas raízes de plantas tratadas com GSNO sob déficit hídrico (Figura 12D e 12H).

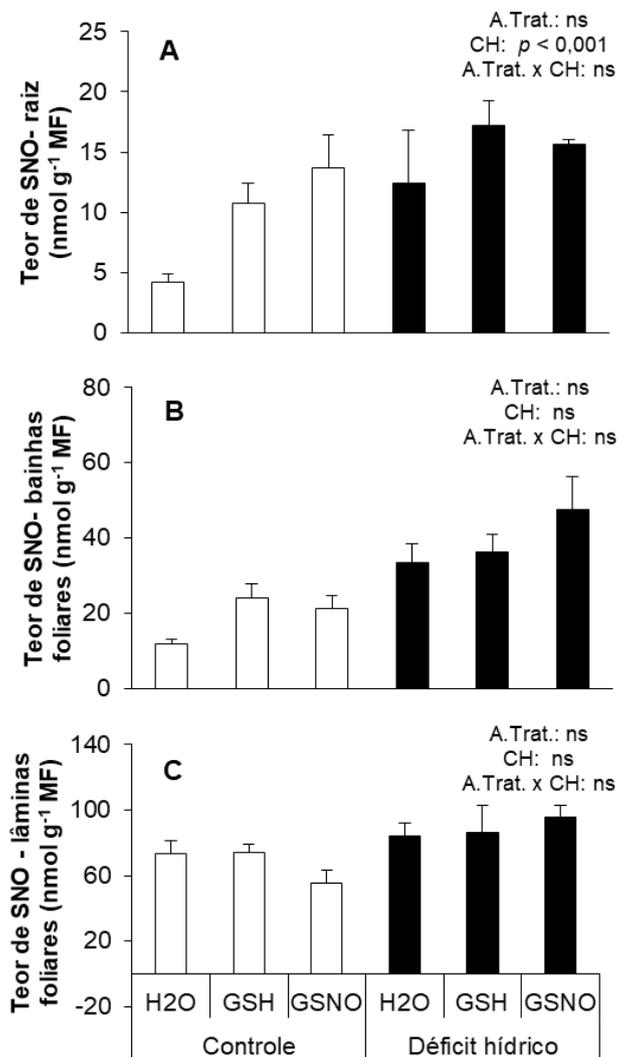
Em relação ao conteúdo de *S*-nitrosotióis (SNO), raízes de plantas sob déficit hídrico apresentaram aumento significativo nos teores de *S*-nitrosotióis em relação às plantas controle em meio hidropônico sem manitol (Figura 13A). Nas bainhas e lâminas foliares foi observada uma tendência de aumento de nitrosotióis induzida pelo déficit hídrico (Figura 13B e 13C).



**Figura 11.** Comprimento das raízes (A) e da parte aérea (B) e número de folhas (C) em plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia sob condição controle ou sob déficit hídrico induzido por manitol e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=10). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).



**Figura 12.** Massa seca das raízes (A), bainhas (B) e lâminas foliares (C) e teor de água das raízes (E), bainhas (F) e lâminas foliares (G) e potencial hídrico das raízes (D) e da parte aérea (H) de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia sob condição controle ou sob déficit hídrico induzido por manitol e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (Água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=6). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

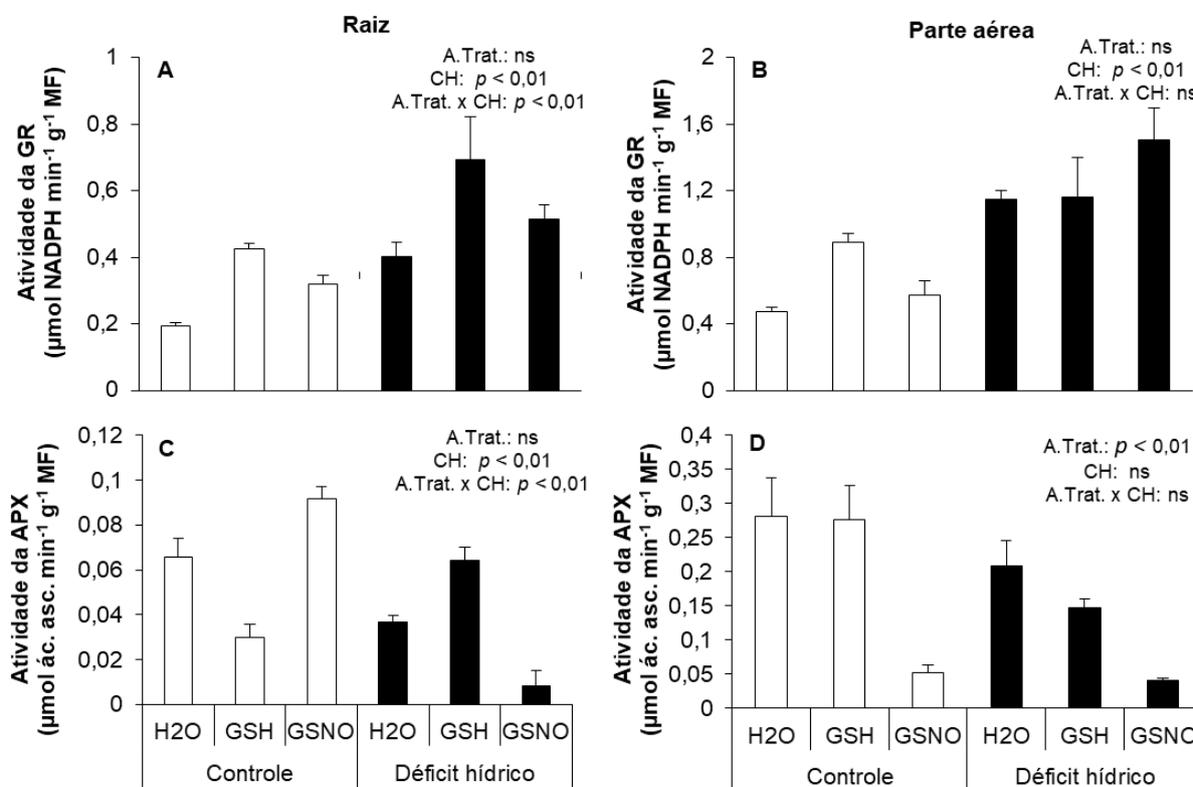


**Figura 13.** Conteúdo de *S*-nitrosotióis em raízes (A), bainhas (B) e lâminas foliares (C) de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia sob condição controle ou sob déficit hídrico induzido por manitol e em água e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (Água, 100 μM GSH e GSNO 100 μM). As barras representam o erro padrão (n=3). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

A atividade da GR foi induzida em condição de déficit hídrico em raízes e folhas (Figura 14A e 14B) e os tratamentos com GSH e GSNO, induziram significativamente a atividade nas raízes em condição de déficit hídrico (Figura 14A). Embora não significativa,

foi observada uma clara tendência de aumento da atividade de GR em folhas de plantas sob déficit hídrico tratadas com GSNO (Figura 14B).

A APX teve sua atividade reduzida significativamente (Figura 14C) no tratamento com GSNO, tanto em raízes sob déficit hídrico, quanto em folhas em condição controle e sob déficit a (Figura 14C e 14D).



**Figura 14.** Atividade enzimática da glutaciona redutase (GR) em raízes (A) e parte aérea (B) e da ascorbato peroxidase (APX) em raízes (C) e lâminas foliares (D) de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em hidroponia sob condição controle ou sob déficit hídrico induzido por manitol e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (Água, GSH 100  $\mu\text{M}$ , GSNO 50  $\mu\text{M}$  e GSNO 100  $\mu\text{M}$ ). As barras representam o erro padrão ( $n=3$ ). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

### **4.3. Efeito do pré-tratamento com GSNO em plantas de *Lolium perenne* crescidas em tubetes e submetidas à suspensão de rega**

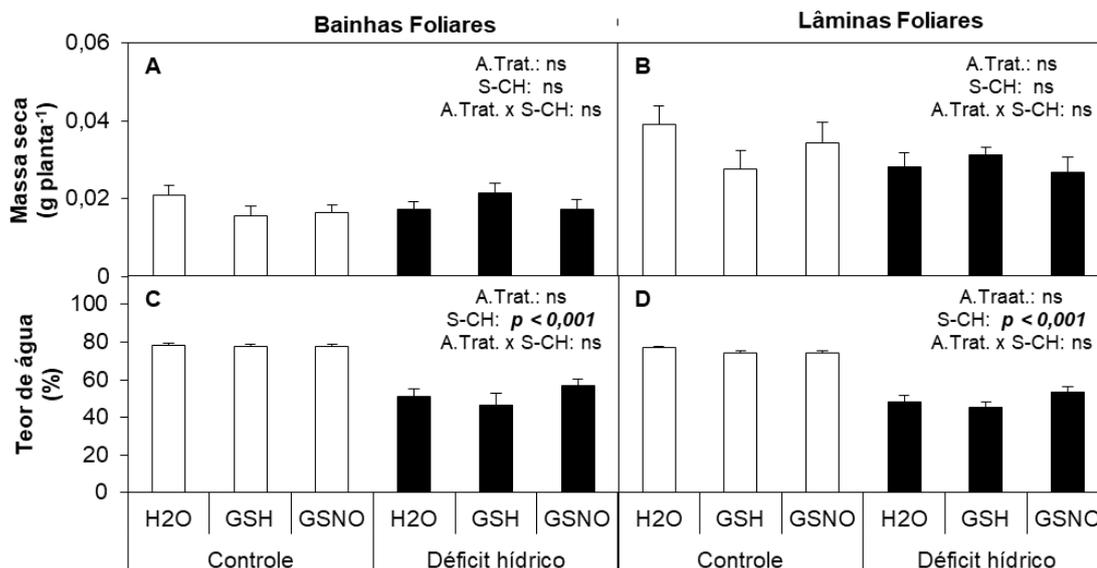
A massa seca das plantas não variou significativamente entre os diferentes tratamentos de aspersão em plantas submetidas ou não à suspensão de rega (Figura 15A e 15B). Bainhas e lâminas foliares de plantas submetidas ao déficit hídrico apresentaram teor de água significativamente mais baixo quando comparadas com as folhas de plantas controle (hidratadas) (Figura 15C e 15D).

A diminuição do teor de água condiz com as alterações do potencial hídrico da parte aérea das plantas (bainhas e lâminas foliares) (Figura 16A). Plantas sob déficit hídrico apresentaram potencial hídrico significativamente mais negativo quando comparadas às plantas hidratadas.

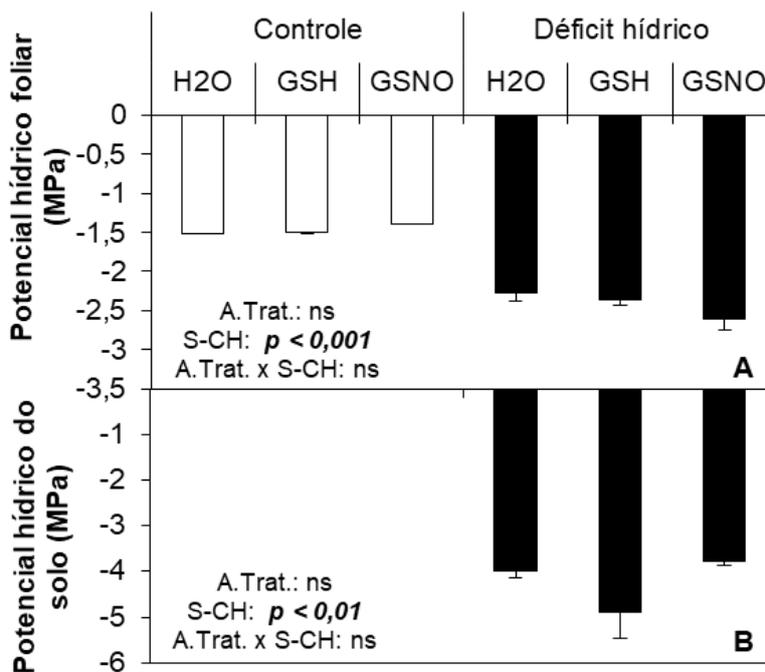
Quanto ao potencial hídrico do solo, o solo das plantas controle (hidratadas), apresentou valores iguais a zero, enquanto o solo das plantas submetidas à suspensão de rega apresentou valores entre -4 e -5 (Figura 16B).

O teor de SNO foi significativamente mais elevado nas plantas submetidas à suspensão de rega em comparação às plantas hidratadas (Figura 17A). Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas entre os tratamentos de aspersão, plantas sob déficit hídrico tratadas com GSH e GSNO apresentaram conteúdo de nitrosotióis 98% e 91,5% maior, respectivamente, do que plantas tratadas com água.

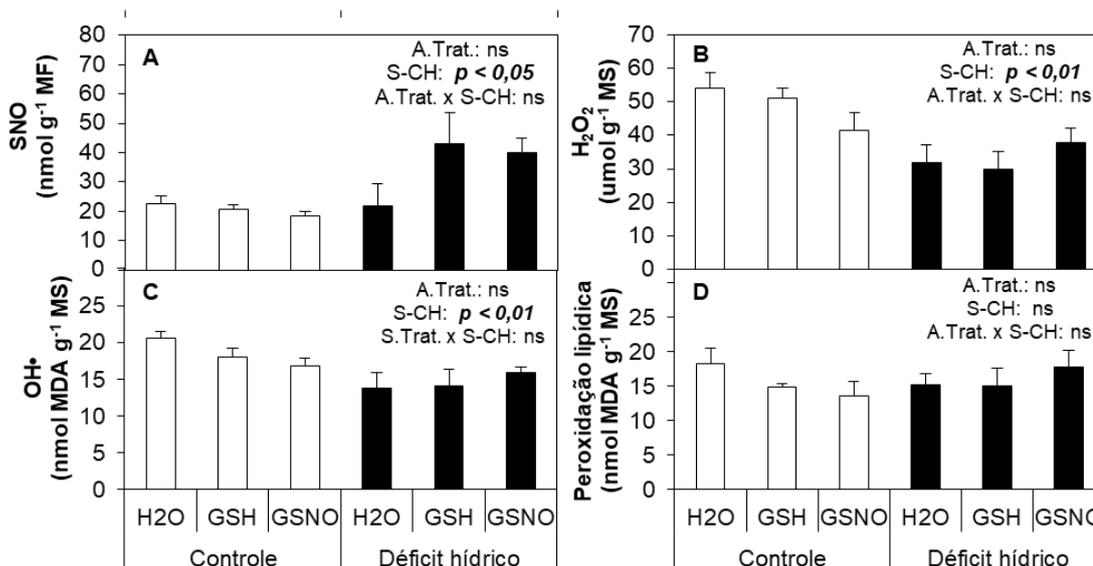
Os teores de  $H_2O_2$  e  $OH^\bullet$  foram significativamente mais baixos em plantas sob déficit hídrico, não havendo diferenças entre os tratamentos de aspersão (Figura 17B e 17C) e não foram observadas diferenças na peroxidação lipídica induzidas pelo déficit ou pelos tratamentos de aspersão foliar (Figura 17D).



**Figura 15.** Massa seca das bainhas (A) e lâminas (B) foliares e teor de água nas bainhas (C) e lâminas (D) foliares de plantas de *Lolium perenne* cultivadas sob condição controle e sob déficit hídrico por suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=6). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Treat (Tratamentos de Aspersão), S-CH (Condição de hidratação do solo) e A.Treat x S-CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).



**Figura 16.** Potencial hídrico da parte aérea (A) e do solo (B) de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob déficit hídrico por suspensão de rega (D) e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, GSH 100  $\mu$ M, GSNO 50  $\mu$ M e GSNO 100  $\mu$ M). As barras representam o erro padrão (n=4). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), S-CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x S-CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).



**Figura 17.** Teor de *S*-nitrosotios (A), de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B), de OH· (C) e peroxidação lipídica (D) na parte aérea de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob déficit hídrico por suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100 μM GSH e 100 μM GSNO). As barras representam o erro padrão (n=3). Teste ANOVA dois fatores com *p*<0,05 detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), S-CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x S-CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

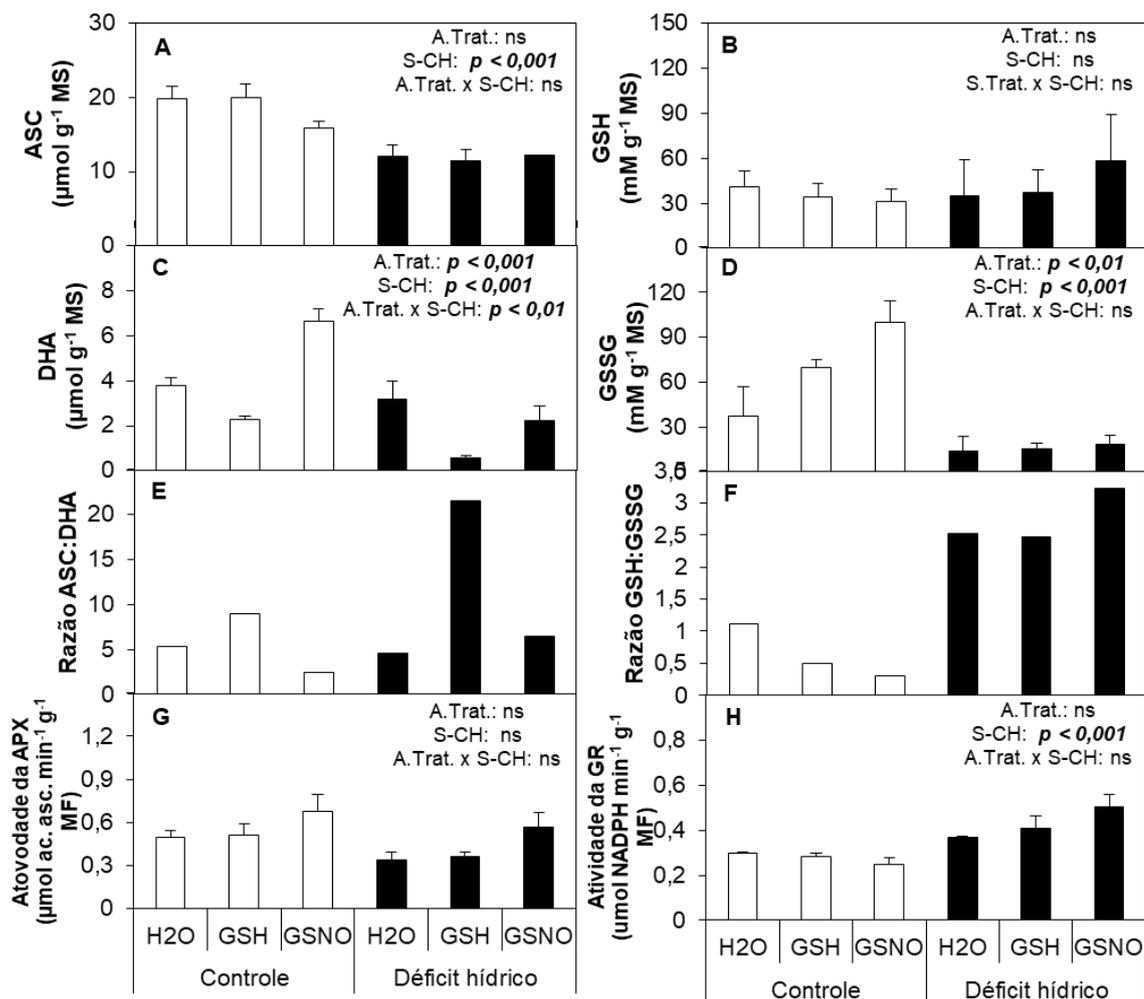
O teor de ASC na parte aérea das plantas foi significativamente inferior sob déficit hídrico, não havendo diferenças entre os tratamentos de aspersão (Figura 18A). Já sua forma oxidada, o DHA, foi significativamente reduzido pelo tratamento com GSH e GSNO em déficit hídrico (Figura 18C). A razão ASC:DHA não mostrou grandes variações, exceto pelo tratamento com GSH, em condição de déficit hídrico (Figura 18E).

O teor de GSH não foi significativamente afetado pela condição de hidratação do solo e pelos tratamentos de aspersão foliar (Figura 18B). Já o teor de GSSG foi significativamente menor em condição de déficit hídrico sob todos os tratamentos de aspersão foliar, mas em condição controle foi observado aumento significativo sob aspersão de GSNO (Figura 18D).

A razão GSH:GSSG, mostra o aumento da proporção da forma reduzida deste composto em condição de déficit hídrico (Figura 18F).

A atividade de APX não apresentou variações significativas entre os tratamentos, porém, plantas sob déficit hídrico apresentaram tendência de menor atividade dessa enzima e plantas tratadas com GSNO, independente da condição de hidratação do solo, apresentaram maior atividade quando comparadas às plantas tratadas por aspersão foliar de água ou GSH (Figura 18G).

Não foram observadas variações na atividade da GR entre os tratamentos de aspersão foliar. Contudo, plantas sob déficit hídrico apresentaram aumento significativo da atividade desta enzima em relação às plantas hidratadas. Há uma tendência de maior indução da atividade desta enzima no tratamento com GSNO sob déficit hídrico (Figura 18H).



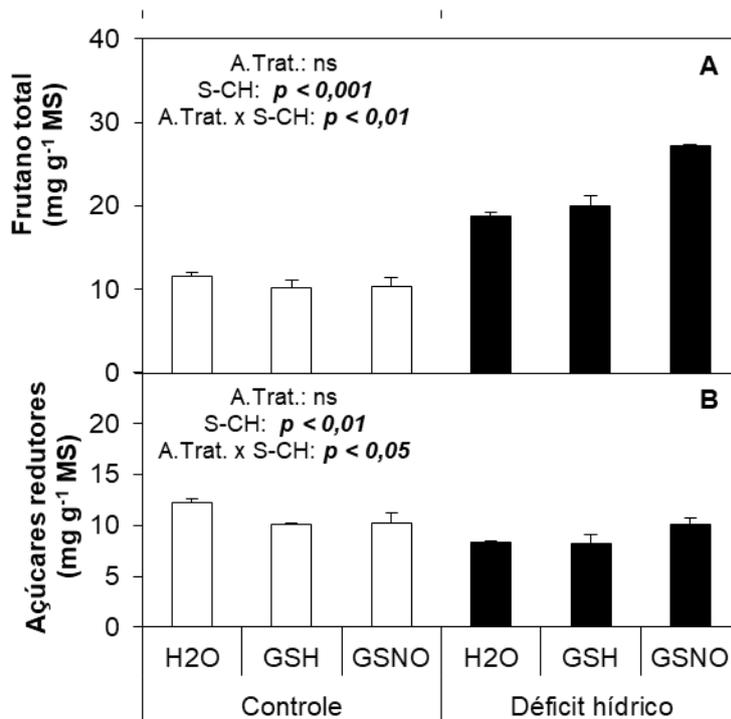
**Figura 18.** Teores de ascorbato (ASC – A), dehidroascorbato (DHA – C), glutathiona reduzida (GSH – B), glutathiona oxidada (GSSG – D), razões ASC:DHA (E) e GSH:GSSG (F) e atividade enzimática da APX (G) e da GR (H) na parte aérea de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob déficit hídrico por suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu\text{M}$  GSH e 100  $\mu\text{M}$  GSNO). As barras representam o erro padrão (n=3). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), S-CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x S-CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

O teor de frutano total foi maior em plantas sob déficit hídrico e esse aumento foi superior sob o tratamento com GSNO (Figura 19A) e perfil semelhante foi observado sob o mesmo tratamento em relação ao teor de açúcares redutores, embora estes tenham sido significativamente reduzidos em condição de déficit hídrico (Figura 19B).

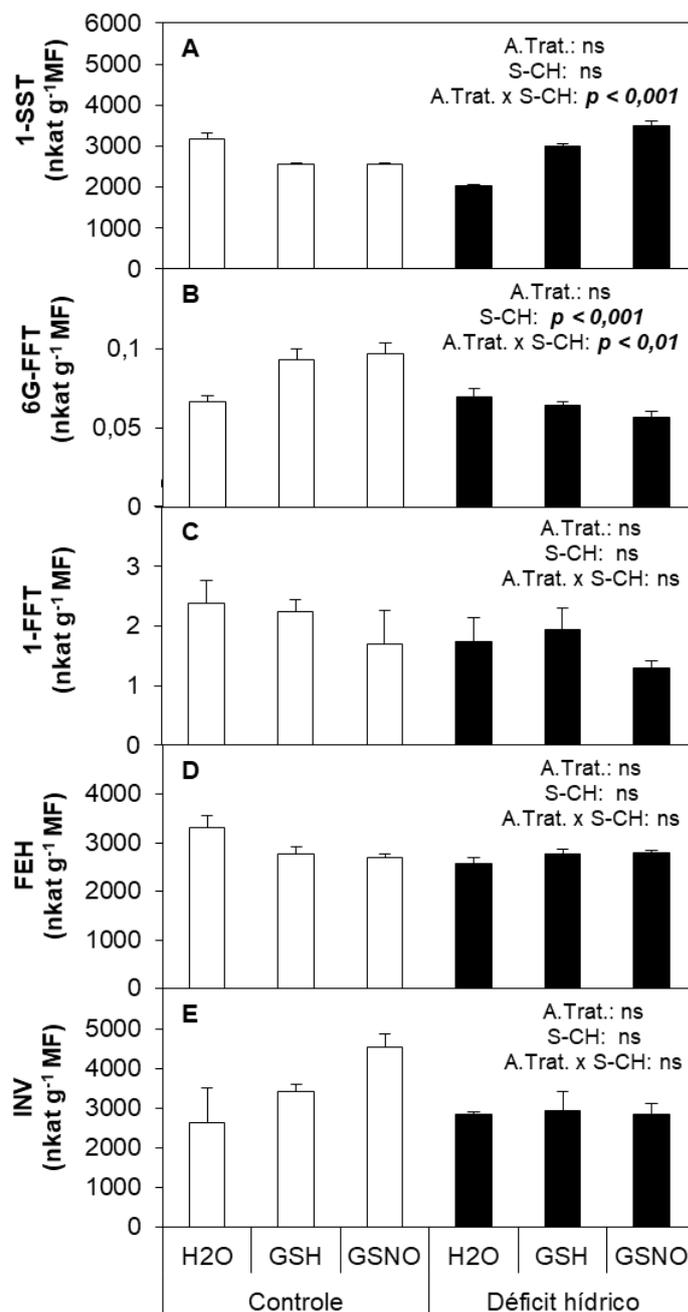
Dentre as enzimas do metabolismo de frutanos a 1-SST, apresentou uma tendência de redução da atividade nas plantas irrigadas e tratadas com GSH e GSNO. Contrariamente, as plantas sob suspensão de rega mostraram um aumento significativo da atividade da 1-SST, especialmente as tratadas com GSH e GSNO (Figura 20A). A 6G-FFT, teve sua atividade significativamente reduzida sob condição de déficit hídrico, independente dos tratamentos de aspersão foliar, porém em condição de solo hidratado, os tratamentos com GSH e GSNO promoveram um aumento significativo da sua atividade (Figura 20B)

A 1-FFT, não apresentou variações significativas de atividade entre os tratamentos (Figura 20C). A atividade desta enzima foi baixa, embora ainda seja possível observar uma tendência na redução de sua atividade nas plantas tratadas com GSNO, independente da condição de rega.

A atividade total das FEHs não variou entre os tratamentos de aspersão em nenhuma condição de hidratação do solo (Figura 19D). Nenhuma variação foi observada também para a atividade da INV, mas há uma tendência de aumento nas plantas irrigadas e tratadas com GSNO (Figura 20E).



**Figura 19.** Teores de frutano total (A) e de açúcares redutores (B) na parte aérea de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob déficit hídrico por suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=3). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), S-CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x S-CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

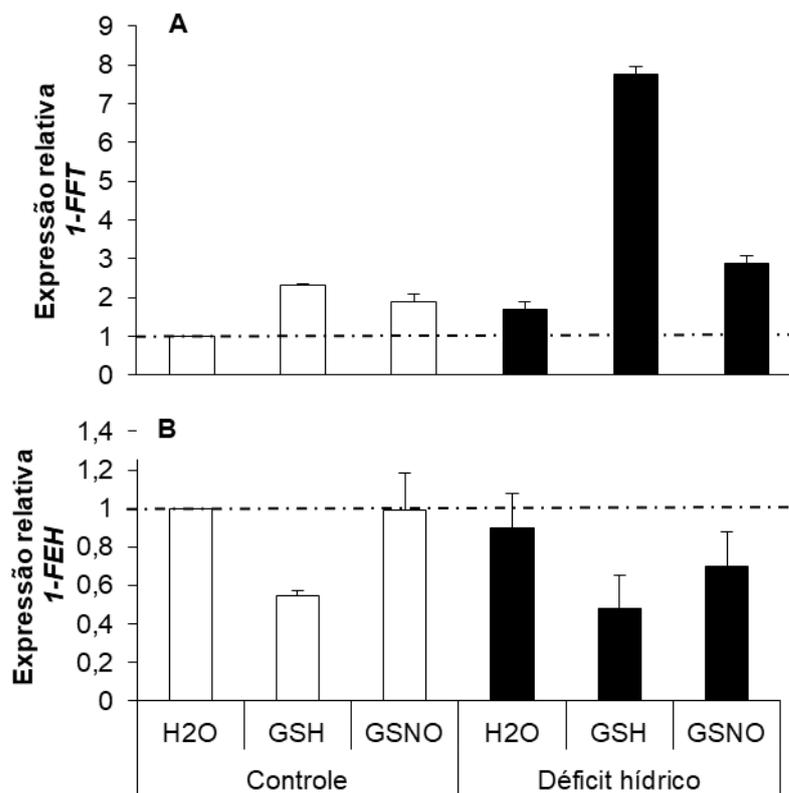


**Figura 20.** Atividade enzimática da 1-SST (A), 6G-FFT (B), 1-FFT (C), FEH total (D) e INV (E) na parte aérea de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob déficit hídrico por suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão (n=3). Teste ANOVA dois fatores com  $p < 0,05$  detalhados no quadro. A.Trat (Tratamentos de Aspersão), S-CH (Condição de hidratação do solo) e A.Trat x S-CH (interação dos tratamentos de aspersão X condição de hidratação do solo).

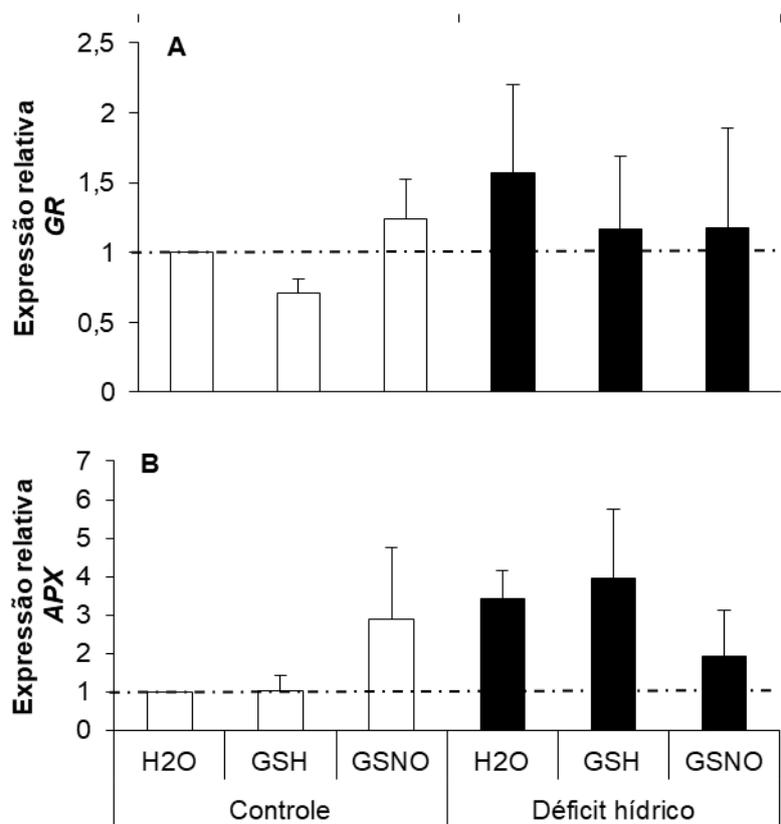
Para a análise da expressão dos genes do metabolismo de frutanos e antioxidante, foram selecionados *primers* para todas as enzimas analisadas no presente trabalho. Contudo, dentre os genes do metabolismo de frutanos selecionados, somente *1-FFT* e *1-FEH* apresentaram amplificação, sendo que todos os *primers* do metabolismo antioxidante amplificaram.

Analisando o perfil de expressão, o déficit hídrico induziu a expressão do gene *1-FFT* nas plantas com aspersão foliar de GSH (Figura 21A) e reprimiu a expressão do gene *1-FEH* nas plantas tratadas com GSNO (Figura 21B). Com relação aos genes do metabolismo antioxidante, a expressão dos genes *GR* (Figura 22A) e *APX* (Figura 22B), que foram induzidos sob déficit com aspersão foliar de água (*GR*) e água e GSH (*APX*).

Em relação à modulação da expressão dos genes do metabolismo de frutanos pelo tratamento com GSH e GSNO, foi observado aumento na expressão de *1-FFT* induzido por GSH (Figura 21A) e repressão da expressão de *1-FEH* no mesmo tratamento (Figura 21B). Para os genes do metabolismo antioxidante, a expressão de *GR* variou pouco, tendo sido observada uma diminuição da expressão no tratamento com GSH (Figura 22A). A expressão de *APX* foi induzida pelo GSNO nas plantas controle (hidratadas) e reprimida por GSNO nas plantas sob déficit hídrico (Figura 22B).



**Figura 21.** Expressão relativa dos genes *1-FFT* (A) e *1-FEH* (B), na parte aérea de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão de duas amostras biológicas com 3 replicatas técnicas cada.

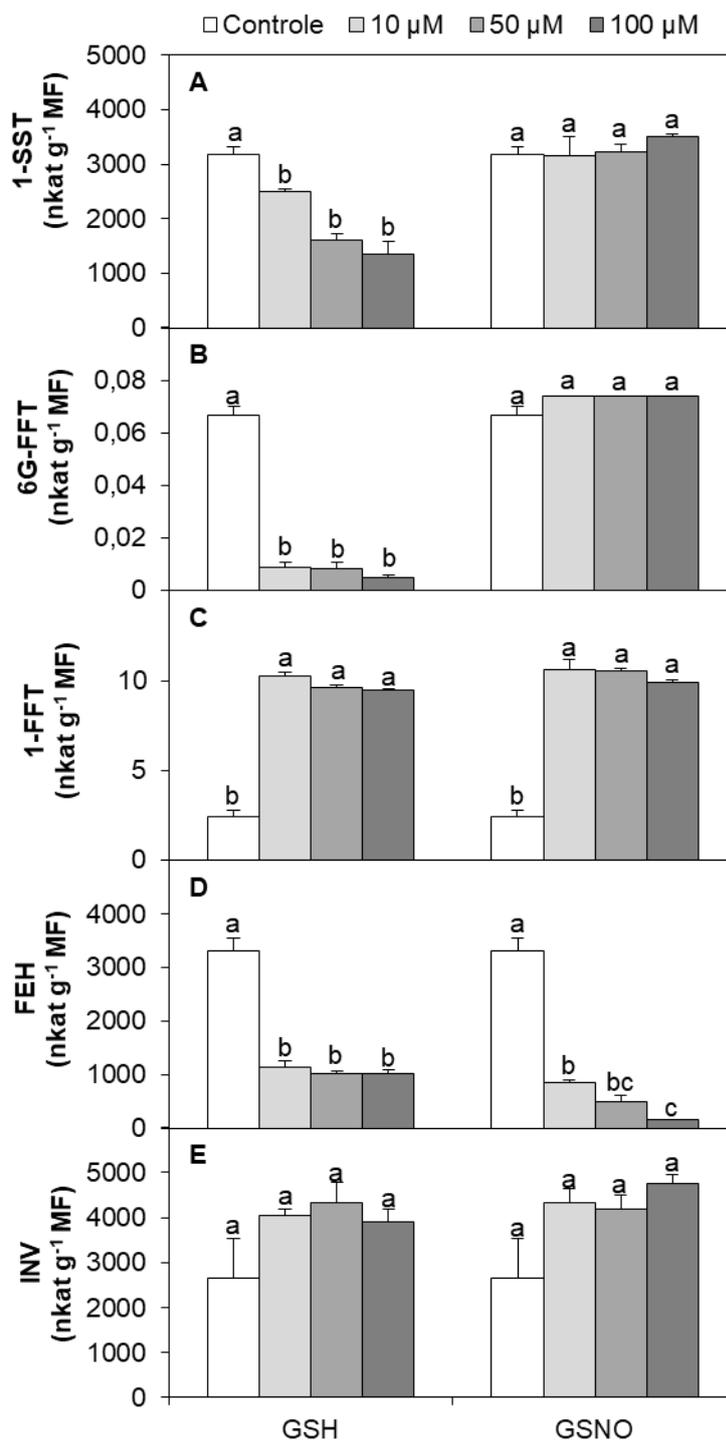


**Figura 22.** Expressão relativa dos genes *GR* (A) e *APX* (B), na parte aérea de plantas de *Lolium perenne* cultivadas em tubetes sob condição controle e sob suspensão de rega e submetidas à aplicação por aspersão foliar de diferentes soluções (água, 100  $\mu$ M GSH e 100  $\mu$ M GSNO). As barras representam o erro padrão de duas amostras biológicas com 3 replicatas técnicas cada.

Tendo em vista a baixa influência da aplicação de GSH e GSNO *in vivo* (por aspersão foliar) na atividade das enzimas de frutanos, foi realizado um experimento de aplicação *in vitro*, diretamente na incubação enzimática. Para tal, foram utilizados extratos das plantas controle (sem déficit hídrico e tratadas apenas com aspersão de água) tratados com diferentes concentrações de GSH e GSNO.

As atividades da 1-SST e da 6G-FFT foram significativamente inibidas somente pelo GSH (Figura 23A e 23B). A atividade de 1-FFT foi significativamente induzida pela aplicação de GSH e GSNO, independente da concentração utilizada (Figura 23C).

A atividade de FEH total foi significativamente inibida por GSH e GSNO, sendo a inibição mais acentuada com maiores concentrações de GSNO (Figura 23D). A invertase não apresentou variações significativas de atividade com a aplicação direta de GSH ou GSNO no extrato enzimático (Figura 23E).



**Figura 23.** Atividade enzimática da 1-SST (A), 1-FFT (B), FEH total (C) e INV (D) de extrato proteico de *Lolium perenne* incubado com diferentes concentrações de GSH e GSNO (10, 50 e 100 μM). As barras representam o erro padrão (n=3). Letras minúsculas comparam os tratamentos de GSH e GSNO, separadamente, em relação ao controle (teste tukey, p<0,05).

Dadas as diferenças entre as respostas *in vivo* e *in vitro* em relação as atividades enzimáticas, para verificar se as enzimas do metabolismo de frutanos e antioxidante de *L. perenne* podem ser potencialmente reguladas pelo tratamento exógeno de NO, realizados a análise preditiva de sítios de *S*-nitrosilação e nitração das sequências protéicas disponíveis destes dois metabolismos.

As análises das sequências proteicas traduzidas de genes do metabolismo de frutanos mostraram que todas as sequências analisadas possuem um ou mais sítios putativos de nitração. Estes sítios, em sua grande maioria apresentam “score” médio ou alto de probabilidade de ocorrência (Tabela 3).

Já com relação aos sítios putativos de *S*-nitrosilação, também estão presentes em todas as sequências, mas nem sempre detectados pelas duas ferramentas utilizadas neste trabalho. O número de sítios para *S*-nitrosilação é baixo, sendo que grande parte das sequências analisadas apresentam apenas um ou dois sítios, apenas as exohidrolases (FEH, 1-FEH e 6-FEH) apresentaram dois ou mais sítios de *S*-nitrosilação.

Os sítios putativos de *S*-nitrosilação detectados pelo GPS-SNO 1.0, em sua grande maioria apresentam baixo “score” de probabilidade de ocorrência, sendo que apenas a 6-FEH e outra FEH apresentaram um “score” alto.

Em relação às enzimas do metabolismo antioxidante, as sequências disponíveis no banco de dados são parciais e apenas a CAT apresenta um possível sítio para *S*-nitrosilação, detectado apenas pela ferramenta iSNO-AAPair. Tanto a CAT quanto a APX apresentam um sítio putativo para nitração com médio “score” de probabilidade e a APX apresenta ainda um outro sítio com alto “score”.

A partir da identificação dos sítios putativos de *S*-nitrosilação nas enzimas do metabolismo de frutanos e antioxidante, a partir de amostras do experimento descrito no item 3.1.3. foi feita a tentativa de detecção de proteínas *S*-nitrosiladas através da marcação destas com iodo-TMT, foi realizado um ensaio de WesternBlot, usando anticorpo anti-TMT. A

detecção foi realizada com anticorpo secundário conjugado com HRP, usando revelador quioluminescente, contudo, não foram observados sinais de marcação em nenhuma das amostras.

**Tabela 3.** Análise das sequências proteicas disponíveis do metabolismo de frutanos e antioxidante em *Lolium perenne* nas ferramentas iSNO-AAPair, GPS-SNO 1.0 e GPS-YNO2 para verificação dos possíveis sítios de S-nitrosilação e nitração.

		S-nitrosilação			Nitração					S-nitrosilação			Nitração		
		iSNO-AAPair	GPS-SNO	GPS-YNO2			iSNO-AAPair	GPS-SNO	GPS-YNO2			iSNO-AAPair	GPS-SNO	GPS-YNO2	
Proteína	Acesso	Posição Cys	Posição Cys	Posição Tyr	Proteína	Acesso	Posição Cys	Posição Cys	Posição Tyr	Proteína	Acesso	Posição Cys	Posição Cys	Posição Tyr	
1-SST	AB288056.1	Cys <sup>508</sup>	Cys <sup>506 (1)</sup>	Tyr <sup>407 (3)</sup> Tyr <sup>608 (2)</sup>	FFT 1	AB186920.1	-	Cys <sup>472 (1)</sup>	Tyr <sup>131 (3)</sup> Tyr <sup>322 (3)</sup> Tyr <sup>507 (3)</sup> Tyr <sup>577 (2)</sup>	FEH	AY693396.5	Cys <sup>235</sup> Cys <sup>437</sup>	Cys <sup>481 (1)</sup>	Tyr <sup>49 (1)</sup> Tyr <sup>162 (3)</sup> Tyr <sup>212 (1)</sup> Tyr <sup>218 (2)</sup> Tyr <sup>287 (2)</sup> Tyr <sup>385 (2)</sup>	
6-SFT	AF494041.1	-	Cys <sup>472 (1)</sup>	Tyr <sup>11 (1)</sup> Tyr <sup>131 (3)</sup> Tyr <sup>322 (3)</sup> Tyr <sup>507 (3)</sup> Tyr <sup>577 (2)</sup> Tyr <sup>614 (1)</sup>	FFT 2	AB288055.1	-	Cys <sup>466 (1)</sup>	Tyr <sup>316 (3)</sup> Tyr <sup>501 (3)</sup> Tyr <sup>571 (2)</sup>	1-FEH	DQ016297.2	-	Cys <sup>438 (1)</sup> Cys <sup>484 (1)</sup>	Tyr <sup>290 (2)</sup>	
6G-FFT	AF492836.2	Cys <sup>500</sup>	Cys <sup>497 (1)</sup>	Tyr <sup>600 (2)</sup> Tyr <sup>630 (2)</sup>	FT a	DQ408726.1	Cys <sup>508</sup>	Cys <sup>506 (1)</sup>	Tyr <sup>407 (3)</sup> Tyr <sup>608 (2)</sup>	6-FEH	EU219846.1	Cys <sup>22</sup> Cys <sup>437</sup> Cys <sup>489</sup>	Cys <sup>18 (3)</sup> Cys <sup>66 (1)</sup> Cys <sup>435 (1)</sup> Cys <sup>481 (1)</sup>	Tyr <sup>287 (2)</sup>	
6G-FFT	AB288057.1	Cys <sup>491</sup>	Cys <sup>35 (1)</sup> Cys <sup>489 (1)</sup>	Tyr <sup>390 (3)</sup> Tyr <sup>592 (2)</sup> Tyr <sup>622 (2)</sup>	1-FEH	DQ018712.1	Cys <sup>235</sup> Cys <sup>437</sup> Cys <sup>489</sup>	Cys <sup>481 (1)</sup>	Tyr <sup>49 (1)</sup> Tyr <sup>287 (3)</sup> Tyr <sup>385 (2)</sup>	FEH	DQ073968.1	Cys <sup>229</sup>	Cys <sup>15 (3)</sup> Cys <sup>429 (1)</sup> Cys <sup>475 (1)</sup>	Tyr <sup>43 (1)</sup> Tyr <sup>281 (2)</sup> Tyr <sup>379 (2)</sup>	
INV	DQ073969.1	Cys <sup>200</sup> Cys <sup>443</sup>	Cys <sup>487 (1)</sup>	Tyr <sup>168 (3)</sup> Tyr <sup>264 (1)</sup> Tyr <sup>299 (3)</sup> Tyr <sup>432 (3)</sup>	CAT (Seq parcial)	JF747381.1	Cys <sup>20</sup>	-	Tyr <sup>222 (2)</sup>	APX (Seq Parcial)	JF747449.1	-	-	Tyr <sup>1 (3)</sup> Tyr <sup>17 (2)</sup>	

(1) Baixo “score” de probabilidade; (2) Médio “score” de probabilidade; (3) Alto “score” de probabilidade

## 6. DISCUSSÃO

O potencial hídrico significativamente mais negativo e o menor teor de água em raízes e folhas de plantas de *L. perenne* tratadas com manitol em solução de hidroponia, bem como sob suspensão de rega, demonstram que as plantas estavam sob condição de estresse quando sob este tratamento (Figuras 12 e 15). No entanto, os períodos de imposição do estresse hídrico no experimento com manitol (quatro dias) e na suspensão de rega (23 dias) não foram suficiente para afetar o crescimento/desenvolvimento das plantas (Figuras 11, 12 e 15). Da mesma forma, a aplicação de GSH e GSNO na forma de aspersão foliar não provocou alterações significativas no desenvolvimento da planta (Figuras 11, 12 e 15).

Embora os dados não tenham sido apresentados nesta tese, plantas de *L. perenne* foram submetidas a três experimentos prévios nos quais o estresse hídrico foi imposto gradativamente pela adição de PEG: dois dias a 10% (-0,4 MPa), seguidos de três dias a 20% (-0,6 MPa) e, posteriormente, de dois dias a 40% (-1,4 MPa), sendo que as plantas controle foram mantidas a -0,2 MPa. Contudo, as plantas morreram quando a solução de hidroponia atingiu -0,6 MPa. Por esta razão, a indução de estresse foi feita adicionando-se manitol ao meio, em concentração suficiente para provocar estresse hídrico, conforme atestam os parâmetros de potencial hídrico radicular e foliar, sem provocar danos letais às plantas.

Trabalho realizado com *L. perenne* demonstrou que as respostas ao estresse hídrico podem variar de acordo com a variedade utilizada desta espécie. Duas variedades diferentes submetidas ao déficit hídrico induzido por PEG apresentaram respostas divergentes em relação ao conteúdo relativo de água. Uma destas variedades, PI 462336, considerada resistente ao estresse hídrico, manteve seu conteúdo de água semelhante ao controle durante todo o período de exposição (uma semana), enquanto a outra, Cashel, apresentou uma queda substancial. Além disso, sob condição de estresse, a variedade resistente apresentou um aumento significativo da biomassa de suas raízes quando na presença do PEG, enquanto a outra não apresentou variação deste parâmetro (Foito *et al.* 2009). Os dados obtidos no

presente trabalho indicam que a variedade AberAvon utilizada é resistente a condição de estresse, apresentando poucas variações nos parâmetros de crescimento avaliados.

Plantas de cana-de-açúcar sob condições de cultivo semelhantes às utilizadas para *L. perenne* neste trabalho apresentaram biomassa das raízes e da parte aérea semelhante ao controle quando submetidas ao estresse hídrico induzido por PEG e tratadas com GSNO 100  $\mu$ M. O conteúdo relativo de água das plantas tratadas com GSNO também foi superior aos das plantas não tratadas, embora ainda inferior ao controle, confirmando o efeito protetor do NO sob a condição de estresse (Silveira *et al.* 2016). Tal efeito protetor não foi observado para plantas de *L. perene*, tanto em relação ao estresse hídrico quanto à exposição ao NO.

É bastante conhecido que os frutanos são compostos osmorreguladores e que o seu metabolismo é regulado, entre outros fatores, em condições de déficit hídrico (Verspreet *et al.* 2015, Moraes *et al.* 2016). Os frutanos atuam, portanto, na tolerância à seca em diversas espécies de gramíneas de clima temperado como *Dactylis glomerata* (Volaire & Thomas 1995), *L. perenne* (Amiard *et al.* 2003) e *Triticum aestivum* (Feng *et al.* 2009), além de plantas da ordem Asterales como *Cichorium intybus* (chicória) (De Roover *et al.* 2000) amplamente cultivada em região de clima temperado e *Chrysoleaena obovata* (Garcia *et al.* 2011, Garcia *et al.* 2015), espécie nativa do Cerrado. A resposta ao déficit hídrico é predominantemente marcada pelo aumento da atividade e expressão das FEHs e da atividade da INV, que resulta na diminuição do comprimento da cadeia de frutanos, aumentando sua capacidade de osmoregulação (Van den Ende & Van Laere 1996; Amiard *et al.* 2003; Portes *et al.*, 2008; Asega *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2011, Garcia *et al.* 2015). No entanto, em raízes de chicória, o estresse hídrico resultou em aumento da atividade e da expressão da 1-SST, devido ao aumento no teor de açúcares como glicose, frutose e sacarose, levando ao acúmulo e à síntese de oligossacarídeos de frutanos, promovendo a osmorregulação e garantindo a maior resistência a condição de estresse (De Roover *et al.* 2000).

Plantas de *L. perenne* crescidas em vaso, neste trabalho, não apresentaram variações significativas quanto à atividade da 1-FFT, das FEHs e da INV, apenas uma tendência de redução na atividade destas enzimas em condição de estresse hídrico (Figura 20). Já a 1-SST teve sua atividade reduzida em condição de déficit hídrico, sendo que o pré-tratamento com GSH e GSNO reverteu parcialmente esse efeito inibitório do déficit sobre a atividade desta enzima. Estes mesmos tratamentos de aspersão foliar promoveram também o aumento do teor de frutanos nas plantas sob condição de déficit (Figura 19), indicando que a atividade de síntese deve ter levado ao acúmulo de oligossacarídeos de frutanos e promovendo a resistência a condição de estresse. De fato, em *L. perenne*, o acúmulo de frutanos e seu papel na tolerância à seca já foi descrito e discutido (Amiard *et al.*, 2003) e a tolerância à seca desta espécie está correlacionada com o ajuste osmótico, alta elasticidade da parede celular e estabilidade da membrana celular, bem como o suporte de um sistema radicular mais profundo e o acúmulo de carboidratos solúveis (Bothe *et al.*, 2018).

Estudos prévios que analisaram a expressão de genes do metabolismo de frutanos em gramíneas e cereais, como *L. perenne* e *Hordeum vulgare*, mostram que a atividade das respectivas enzimas é, em geral, consistente com a expressão dos genes e que, por isso, os genes associados ao metabolismo de frutanos apresentam, a priori, uma regulação em nível transcricional (Chalmers *et al.* 2005), com regiões promotoras reguladas por luz, temperatura, concentrações de sacarose e reguladores hormonais, como auxina, ácido abscísico, etileno e giberelinas (Michiels *et al.* 2004; Chalmers *et al.* 2005).

Em revisão sobre a genética molecular do metabolismo de frutanos em *L. perenne*, Chalmers *et al.* (2005) também descrevem que este padrão de regulação transcricional observado para genes de frutanos não ocorre para os genes de invertases e que estas enzimas devem apresentar também uma regulação pós-transcricional, tendo em vista os diferentes padrões de atividade e expressão.

Em relação ao tratamento com GSNO, tanto as enzimas de síntese, 1-SST, 1-FFT e 6G-FFT, quanto as de degradação, FEHs e invertase, apresentaram, em geral, um perfil de diminuição da atividade, embora este perfil não seja constante e o conteúdo de frutanos não tenha variado entre os tratamentos. Além disso, os genes *1-FEH* e *1-FFT*, não apresentaram correlação entre expressão e atividade das respectivas enzimas (Figura 21). Vale ressaltar que, ao se analisar a atividade das enzimas, está sendo avaliada a atividade das diferentes isoformas conjuntamente, sendo que as análises de expressão gênica foram realizadas para isoformas específicas em função do desenho dos primers. Seis sequências de frutossil-hidrolases (1- e 6-FEHs) e 15 sequências de frutossiltransferases (1-SST, 1-FFT, 6G-FFT) de *L. perenne* estão depositadas no *Genbank*, indicando a complexidade do controle molecular do metabolismo de frutanos nessa espécie.

Em trabalho recente, Gasperl *et al.* (2016) mostraram baixa correlação entre a atividade das enzimas e a expressão dos genes do metabolismo de frutanos em *L. perenne*. Esses autores estudaram o efeito da aplicação exógena dos cinco principais fitormônios (ácido abscísico, etileno, auxina, giberelina e citocinina) em um curto período de tempo (48h) no metabolismo de frutanos em bainhas de plantas jovens de *L. perenne*. Visto que os dados de Gasperl *et al.* (2016) contrariaram estudos prévios que reforçam a correlação de diferentes hormônios com alterações no metabolismo de frutanos (Bravo *et al.* 1998, Kerepesi *et al.* 2004, Yang *et al.* 2004, Ruuska *et al.* 2008, Suárez-González *et al.* 2014), os autores sugeriram que o curto período de exposição aos fitormônios pode não ter promovido alterações significativas no metabolismo de frutanos que, nessa espécie, apresenta grande complexidade, incluindo interações com as invertases, que podem competir com o substrato sacarose, também utilizado pelas frutossiltransferases. Ainda segundo os autores, a não correlação entre os padrões de atividade e expressão estaria de acordo com a observação geral de que a abundância de transcritos e proteínas é de fato, frequentemente, pouco correlacionada (Stitt & Gibon 2014) e, uma vez que a abundância de transcritos é

constantemente utilizada para avaliar a função de enzimas envolvidas em processos metabólicos, inclusive no metabolismo de frutanos (Abeynayake *et al.* 2015), a ausência de correlação observada por Gasperl *et al.* (2016) e no presente trabalho demonstra a importância da determinação de atividades enzimáticas para se obter informações sobre a relevância fisiológica da expressão.

Considerando-se que o NO atua em diversas vias de sinalização celular, como um importante regulador do crescimento vegetal e em respostas a estresses, sendo capaz de modular, em nível transcricional ou pós-transcricional, os teores de fitormônios, por meio de enzimas de síntese e degradação, pela distribuição nos tecidos e células via proteínas de transporte, ou pela sinalização celular e sistêmica *via* proteínas de transdução de sinal (Freschi 2013), as observações feitas por Gasperl *et al.* (2016) podem também justificar os diferentes padrões de resposta ao NO obtidos no presente trabalho. Da mesma forma que foi sugerido por esses autores para os cinco hormônios utilizados, a exposição ao NO pode não ter sido suficiente para promover alterações consistentes na regulação do metabolismo de frutanos em nossos experimentos. As plantas foram expostas a 7 aplicações de GSNO e seu respectivo controle (GSH) por aspersão foliar das soluções. Nem todo o NO fornecido foi provavelmente absorvido pelas folhas. Embora as caixas de hidroponia tenham sido fechadas após a aspersão, mantendo uma atmosfera enriquecida em NO, o período de liberação de NO pelo GSNO é bastante curto, de aproximadamente duas horas (Ederli *et al.* 2009).

Adicionalmente, não podemos excluir o eventual fechamento estomático em função do tratamento. Experimentos realizados com diferentes espécies de plantas mostraram que o NO exógeno fornecido na forma de soluções doadoras induz o fechamento estomático e reduz as taxas de transpiração (Neil *et al.* 2008). No entanto, os experimentos que demonstram o papel do NO no fechamento estomático foram realizados com folhas destacadas e mergulhadas em SNP sob vácuo (García-Mata & Lamatina 2001) ou com fragmentos de epiderme de folhas mergulhados em tampão contendo SNP (Neil *et al.* 2002) ou L-NAME (Desikan *et al.* 2002),

o que facilita a penetração dos reagentes e o acesso às células-guarda. Além disso, resultados do efeito do GSNO no fechamento estomático não estão disponíveis na literatura científica. Foram feitas tentativas de medidas de fotossíntese e transpiração nas plantas do experimento do presente trabalho, mas a diminuta largura foliar das plantas jovens de *L. perenne* (aproximadamente 4 mm) inviabilizou as referidas análises. No entanto, o fato dos valores de teor de água (%) terem sido similares entre as plantas com aspersão foliar de água, GSH e GSNO sugere que as taxas transpiratórias não foram significativamente afetadas (Figuras 12 e 15).

Contudo, nossos resultados mostraram que tanto o GSH quanto o GSNO são capazes de induzir o acúmulo de SNOs nas folhas, semelhante ao relatado para cana-de-açúcar submetida a déficit hídrico (Silveira *et al.*, 2016). Fornecer GSH de forma exógena pode induzir a formação de GSNO nas folhas, devido ao aumento da liberação de NO sob condições de estresse, como sugerido por Silveira *et al.* (2016). A concentração de GSNO empregada em nosso estudo foi eficaz no aumento de compostos S-nitrosilados em plantas sob seca, que por sua vez poderia modular a proteína S-nitrosilação (Lindermayr *et al.*, 2005). No entanto, as duas únicas enzimas que tiveram sua atividade modulada pelo NO *in vivo* foram 1-SST e 6G-FFT (Figuras 10 e 20) e ainda assim, uma regulação putativa pela S-nitrosilação de enzimas de frutanos não está clara. A modificação de proteínas pela S-nitrosilação depende em grande parte do microambiente ao qual uma unidade de proteína cisteína é submetida e a proximidade de resíduos básicos ou ácidos na molécula pode favorecer a reação (Zaffagnini *et al.*, 2016). Portanto, as respostas mais sutis observadas para o ensaio *in vivo* podem estar relacionadas às condições específicas do ambiente intracelular e mudanças nas atividades também podem ser reguladas por outros fatores endógenos ou mesmo pela regulação transcricional, que pode ser influenciada pela aspersão de GSH e GSNO ou não. Nosso trabalho consiste em uma primeira tentativa de identificar a regulação direta das enzimas de frutanos por NO e considerando os resultados para plântulas de trigo

sob estresse pelo frio, apresentadas por Li *et al.* (2013), nos quais a atividade de enzimas de síntese (especialmente 1-FFT) e a expressão de genes relacionados (6-SFT) mostraram-se aumentadas pelo tratamento de SNP resultando no aumento da resistência dessas plantas ao frio pelo aumento de frutanos de baixo GP, realizamos a análise por ferramentas preditivas dos sítios putativos de S-nitrosilação e nitração nas seqüências de *L. perenne* disponíveis no *GenBank* (Tabela 3).

Todas as enzimas apresentaram pelo menos um sítio putativo, ainda que com baixa possibilidade de escore para S-nitrosilação e muitos locais de alto “score” de possibilidade de nitração. O estudo preditivo do transcriptoma do pólen de *Olea europaea* durante a germinação *in vitro* mostrou por ferramentas preditivas, que proteínas associadas ao metabolismo de carboidratos ocupam a 6ª posição no número de proteínas (92 ao todo). Das proteínas passíveis de S-nitrosilação, 146 estão localizadas no interior dos vacúolos e 231 proteínas estão associadas às respostas de estresses abióticos, como o salino e por cádmio (Jimenez-Quesada *et al.* 2017). Em *A. thaliana*, 70 proteínas vacuolares foram identificadas com elevada chance de ocorrência de S-nitrosilação (Chaki *et al.* 2014). Cabe ressaltar que os frutanos e as enzimas do seu metabolismo estão localizados predominantemente nos vacúolos (Vijn & Smeekeens 1999).

O mesmo estudo com *O. europaea* mostrou, em relação às proteínas alvo de nitração de tirosinas, que 200 estão localizadas nos vacúolos e 351 estão associadas a respostas a estresses abióticos, como o salino, por cádmio e a respostas ao calor (Jimenez-Quesada *et al.* 2017). Signorelli *et al.* [*in press*], observaram que o estresse hídrico é capaz de induzir o acúmulo de NO, resultando em aumento da nitração de proteínas em células corticais de *Lotus japonicus* pela ocorrência de estresse nitrosativo.

Considerando que o uso de ferramentas preditivas pode ser controverso, considerando que “scores” baixos podem gerar falsos positivos resultados e que altas pontuações podem levar à perda de informações importantes (Jimenez-Quesada *et al.*, 2017), realizamos o ensaio

de atividades enzimáticas *in vitro*, adicionando GSH e GSNO diretamente na mistura de incubação (Figura 23). Neste ensaio, nenhuma enzima demonstrou ser regulada exclusivamente pelo tratamento com GSNO.

Nos métodos de extração das enzimas de frutanos utilizados por Lasseur *et al.* (2006), método adotado no presente trabalho e Li *et al.* (2013), foi utilizado ditioneitol (DTT), agente redutor frequentemente empregado em reações enzimáticas visando inibir a oxidação de grupos tióis e reduzir pontes dissulfeto. Contudo, em estudos de *S*-nitrosilação de proteínas, ele é constantemente empregado como um controle redutor negativo, capaz de romper as ligações do grupo tiol com o NO (Raju *et al.* 2012; Serahwat *et al.* 2013). Desta forma, o emprego do DTT no protocolo utilizado pode ter removido o grupo nitrosil das enzimas do metabolismo de frutanos que tenha resultado da aplicação de GSNO ou da imposição do déficit hídrico, tendo em vista a baixa modulação da atividade destas enzimas por NO.

Foi realizado um teste de extração e atividade das enzimas dos frutanos sem a utilização do DTT, mas as enzimas não apresentaram atividade, o que dificulta, portanto, a análise do NO como potencial regulador da atividade destas enzimas. Já foi demonstrado para uma ATPase vacuolar bovina que a formação de uma única ponte dissulfeto envolvendo o resíduo de cisteína 254, altamente conservado, inibe a atividade da enzima e que o tratamento com DTT restaura a atividade da enzima oxidada (Feng & Forgac 1992). É importante considerar eventos similares para justificar a importância do uso do DTT para obtenção das atividades das enzimas dos frutanos *in vitro*. Embora as frutossiltransferases e frutossilhidrolases possuam diversas cisteínas em sua estrutura primária com potencial de formar pontes dissulfeto, a análise da estrutura cristalina da frutossiltransferase 6-SST/6-SFT de *Pachydrum terminalis* identificou a formação de uma única ponte dissulfeto, entre as cisteínas 401 e 449 (Lammens *et al.* 2012). O mesmo foi observado para a frutano exohidrolase 1-FEH IIa de *C. intybus*, com uma ponte entre as cisteínas 393 e 440 (Verhaest *et al.* 2005).

Por essa razão, foi realizada também a tentativa de identificação de proteínas *S*-nitrosiladas nas folhas de plantas de *L. perenne* submetidas a seis diferentes tratamentos, por meio de uma técnica denominada *S*-nitrosoproteoma. A técnica empregada é baseada no bloqueio irreversível dos grupos tióis livres das proteínas presentes no extrato proteico com o Metil Metanotiosulfonato (MMTS), seguida de redução dos grupos tióis *S*-nitrosilados com ácido ascórbico, seguido de reação irreversível destes grupos reduzidos com N-[6-(biotinamido)hexil]-3'-(2'-piridilditio)-propionamida (Biotina-HPDP) e posterior levantamento das proteínas marcadas (Zaffagnini *et al.* 2016). No presente estudo, a Biotina-HPDP foi substituída pelo uso do iodo-TMT, utilizado para investigar a *S*-nitrosilação em células de murino, uma espécie de roedor (Qu *et al.* 2014, Boronat *et al.* 2015, Zaffagnini *et al.* 2016). Esta técnica ainda se encontra em fase de padronização para diferentes tecidos vegetais e não permitiu, em uma primeira análise, a identificação das proteínas marcadas nos diferentes extratos protéicos.

Tendo em vista o importante papel do NO como sinalizador celular e que a regulação da atividade de diversas enzimas pode ocorrer por processos de *S*-nitrosilação, especialmente em condições de estresse, métodos de detecção das proteínas reguladas por esta reação devem mostrar, mesmo nas amostras controle (aspersão de água e sem déficit hídrico), proteínas *S*-nitrosiladas, conforme observado em outros estudos (Lindermayr *et al.* 2005; Maldonado-Alconada *et al.* 2011; Wang *et al.* 2017). No entanto, dependendo da intensidade de ocorrência de *S*-nitrosilação ou mesmo da abundância das proteínas alvo, o sinal pode não ser detectado, o que poderia justificar a ausência de proteínas *S*-nitrosiladas no presente estudo. Desta forma, para obtenção de resultados conclusivos será necessária a padronização do método com iodo-TMT para folhas de *L. perenne*.

Em relação à modulação da atividade e expressão de genes do metabolismo de frutanos em trigo por NO, a atividade da 1-FFT foi ainda mais induzida na variedade resistente ao frio sob alta concentração de SNP concomitante ao estresse por frio, levando ao

aumento dos oligossacarídeos de frutanos. O gene *1-SST* teve sua expressão pouco alterada em ambas as variedades, tendo sua expressão reduzida na presença do SNP, enquanto *6-SFT* teve sua expressão induzida no tratamento com 0,075  $\mu\text{M}$  de SNP (Li *et al.* 2013).

O menor teor de ROS e a manutenção do estado de peroxidação lipídica em plantas tratadas com a seca sugerem que as plantas de *L. perenne* foram capazes de prevenir o dano oxidativo, independentemente do tratamento de pulverização. O aumento da atividade da 1-SST concomitante ao aumento do teor de frutanos pode ser o mecanismo responsável por isso, considerando o papel dos frutanos na estabilização de membranas durante a dessecação pela inserção de polissacarídeos na região da cabeça lipídica diminuindo o fluxo de água (Livingston *et al.*, 2009) e também, sua contribuição para osmorregulação e remoção de  $\text{OH}\cdot$ , evitando maiores danos oxidativos, como sugerido por Peshev *et al.* (2013).

Dados semelhantes foram observados para plântulas de trigo submetidas à deficiência hídrica, nas quais também foi descrito um aumento na síntese de frutanos, associado à eliminação de radicais  $\text{OH}\cdot$  e à manutenção do estado de peroxidação lipídica, resultando em maior tolerância ao estresse (Nemati *et al.*, 2018). Neste trabalho, a cultivar de trigo tolerante apresentou aumento específico na atividade da 1-FFT, que promoveu um aumento no GP e no conteúdo de frutanos. Embora *L. perenne* não tenha apresentado um aumento no GP (dados não mostrados), o teor de frutanos foi maior na seca, especialmente sob tratamento com GSNO, o que sugere, mais uma vez, que pelo menos a variedade AberAvon é resistente a esse estresse.

Em relação aos compostos antioxidantes, um aumento no status redox transferido de um estado oxidado para um estado reduzido de glutathiona (relação GSH: GSSG) está relacionado com um aumento na atividade de GR em plantas tratadas com seca que possivelmente melhorou a recuperação dos níveis de GSH e diminuiu GSSG (Figuras 14 e 18). Ao contrário da glutathiona, o status de redox ascorbato estava sob seca, mas o conteúdo de ASC permaneceu sempre mais alto comparado ao conteúdo de DHA. Em uma variedade

de trigo resistente à seca, um maior conteúdo de ASC e GSH e mais a indução das enzimas do ciclo ASC-GSH foram associados ao menor dano oxidativo durante o estresse osmótico (Lascano *et al.*, 2001) e outro trabalho com trigo mostrou uma correlação positiva entre o conteúdo de ASC e a tolerância à seca em diferentes genótipos de trigo (Roy *et al.*, 2017). Portanto, sob seca, as plantas de *L. perenne* parecem ser capazes de manter seu estado redox de condição reduzida, garantindo, com o acúmulo de frutanos, maior resistência à seca, evitando danos oxidativos como observado para outras espécies (Szalai *et al.*, 2009).

Tem sido bastante discutida a capacidade do NO exógeno de induzir a atividade de enzimas antioxidantes e prevenir o dano oxidativo causado por estresses ambientais como a seca de maneira dose-dependente (Groß *et al.*, 2013; Begara-Morales *et al.*, 2016; Majeed *et al.*, 2018; Nabi *et al.*, 2019). Em *L. perenne*, *Poa pratensis*, *Cynodon dactylon* e *Oryza sativa*, foi observado um aumento nas atividades enzimáticas do metabolismo antioxidante quando submetidas à seca e tratadas com SNP, o que contribuiu para maior resistência ao estresse (Farooq *et al.*, 2009; Boogar *et al.*, 2014). Um possível mecanismo para a atividade induzida por NO das enzimas da via ascorbato-glutationa é a S-nitrosilação, como mostrado anteriormente para sementes de *Antiaris toxicaria* submetidas à dessecação (Bai *et al.* 2011). Neste trabalho, embora não tenham ocorrido diferenças significativas, houve uma atividade de GR ligeiramente maior nas plantas tratadas com GSNO quando comparadas aos tratamentos com água e GSH sob seca (Figuras 14 e 18), bem como a expressão do gene relacionado (Figura 22), resposta que parece ser comum em gramíneas (Jiang & Huang 2001; Bian & Jiang 2009; Xu *et al.* 2011), a maior razão GSH: GSSG nas plantas tratadas com GSNO sob seca (Figura 18) pode sugerir que o NO exógeno influenciou positivamente a manutenção de redução do status de glutatona por um aumento na atividade de GR. O mesmo é observado para o APX, o tratamento com GSNO apresenta um ligeiro aumento de sua atividade (Figura 18), bem como a expressão do gene *APX* (Figura 22).

Finalmente, é importante ressaltar que em diversas das análises realizadas neste trabalho a glutathiona reduzida (GSH), utilizada como controle, por ser um produto da quebra do GSNO para a liberação de NO, também apresentou atividade biológica, geralmente com efeitos contrários em relação ao tratamento controle com água ou ao tratamento com GSNO, sobretudo no metabolismo de frutanos, no teor de glicose, frutose, sacarose e *S*-nitrosotióis.

O GSH é o mais importante composto tiol não protéico intracelular e tem papel importante na proteção celular contra o estresse oxidativo, estando envolvido no ciclo ascorbato-glutathiona (Foyer & Noctor 2005; 2009; 2011).

Quando aplicada exogenamente, esta molécula é capaz de ativar a expressão de genes de defesa e pode também afetar a sinalização hormonal. A depleção na produção desta molécula pode modificar os níveis de auxina e seus canais de transporte durante o crescimento do tubo polínico e também pode influenciar a atividade meristemática em processos de floração (Noctor *et al.* 2012). Portanto, os resultados aqui apresentados mostram que, apesar do perfil variar conforme as condições experimentais, o tratamento com GSH também pode modular as respostas ao déficit hídrico e as atividades e expressões dos metabolismos de frutanos e antioxidante em plantas de *L. perenne*, o que fica claro com a aplicação do doador diretamente no extrato enzimático *in vitro*, mas que também se confirma pela modulação pontual da atividade das enzimas e regulação dos genes analisados *in vivo*.

A interação de GSNO e GSH com o metabolismo de frutanos parece ser bastante complexa e pode envolver a interação com outras vias, como por exemplo, a sinalização por fitormônios, que é comprovadamente afetada pelo GSNO e GSH.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Plantas de *L. perenne* mostraram tolerância à seca, independentemente do tratamento por pulverização. Embora a seca seja clara, as plantas estudadas não enfrentaram estresse oxidativo, possivelmente pelo papel dos frutanos e GSH, através da regulação da atividade GR, na manutenção da homeostase das ROS.

O tratamento com GSNO pode modular a atividade de 1-SST *in vivo*, mas não as outras enzimas do metabolismo de frutanos. No entanto, apesar dos sítios putativos de *S*-nitrosilação e nitração, nenhuma enzima foi regulada para as análises *in vitro*. Isto sugere que o aumento de 1-SST na condição seca, especialmente no tratamento com GSNO, está relacionado a alguma outra sinalização endógena, que pode ser regulada pelo NO ou não. O GSH também pode desempenhar um papel regulador e a interação do GSNO e GSH com o metabolismo do frutano parece ser complexa e pode envolver a regulação primária de outras vias, como a sinalização hormonal, que por sua vez pode interferir nesse metabolismo.

Trabalhos futuros devem considerar um tempo maior de exposição ao NO, assim como maiores concentrações de aplicação, outros doadores, ou a fumigação como forma de tratamento, que isolaria o efeito do NO. A detecção efetiva de *S*-nitrosilação de enzimas de frutanos também deve ser considerada para comprovação de possíveis regulações pós-traducionais.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Abeynayake, S.W.; Etzerodt, T.P.; Jonaviciene, K.; Byrne, S.; Asp, T.; Boelt, B.** 2015. Fructan metabolism and changes in fructan composition during cold acclimation in perennial ryegrass. *Frontiers in Plant Science* 6: 329.
- Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G.** 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal* 357: 593-615.
- Amiard, V.; Morvan-Bertrand, A.; Billard, J.P.; Huault, C.; Keller, F.; Prud'homme, M.P.** 2003. Fructans, But Not the Sucrosyl-Galactosides, Raffinose and Loliose, Are Affected by Drought Stress in Perennial Ryegrass. *Environmental Stress and Adaptation* 132(4): 2218-2229.
- Apel, K.; Hirt, H.** 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373-399.
- Asai, S.; Yoshioka, H.** 2009. Nitric oxide as a partner of reactive oxygen species participates in disease resistance to necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea* in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 619-629.
- Asega, A.F.; Nascimento, J.R.; Carvalho, M.A.M.** 2011. Increased expression of fructan 1exohydrolase in rhizophores of *Vernonia herbacea* during sprouting and exposure to low temperature. *Journal of Plant Physiology* 168: 558-65.
- Asega, A.F.; Nascimento, J.R.O.; Schroeven, L.; Van den Ende, W.; Carvalho, M.A.M.** 2008. Cloning, characterization and functional analysis of 1-FEH cDNA from *Vernonia herbacea* (Vell.) Ruby. *Plant Cell Physiology* 49: 1185-1195.
- Bachmann, M.; Matilde, P.; Keller, F.** 1994. Metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides in Leaves of *Ajuga reptans* L. (Cold Acclimation, Translocation, and Sink to Source Transition: Discovery of Chain Elongation Enzyme). *Plant Physiology* 105(4): 1335-1345.
- Bai, X.; Yang, L.; Tian, M.; Chen, J.; Shi, J.; Yang, Y.; Hu, X.** 2010. Nitric Oxide Enhances Desiccation Tolerance of Recalcitrant *Antiaris toxicaria* Seeds via Protein S-Nitrosylation and Carbonylation. *Plos One* 6(6): 20714.

- Bancal, P.; Carpita, N. C.; Gaudillere, J. P.** 1992. Differences in fructan accumulated in induced and field-grown wheat plants: an elongation-trimming pathway for their synthesis. *New Phytologist* 120: 313-321.
- Begara-Morales, J.C., Sánchez-Calvo, B., Chaki, M., Valderrama, R., Mata-Pérez, C., Corpas, F. J., Barroso, J. B.** 2016. Protein S-nitrosylation and S-glutathionylation as regulators of redox homeostasis during abiotic stress response. In: Gupta, D.K., Palma, J.M., Corpas, F.J. *Redox State as a Central Regulator of Plant-Cell Stress Responses*, p. 365-386.
- Begara-Morales, J.C.; Sánchez-Calvo, B.; Chaki, M.; Mata-Pérez, C.; Valderrama, R.; Padilla, M.N.; López-Jaramillo, J.; Luque, F.; Corpas, F.J.; Barroso, J.B.** 2015. Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *Journal of Experimental Botany* 66: 5983-5996.
- Beligni, M.V., Lamattina, L.** 2002. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant Cell & Environment*. 25 (6), 737-748.
- Beligni, M.V.; Lamatina, L.** 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and deetiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 210: 215-221.
- Besson-Bard, A.; Pugin, A.; Wendehenne, D.** 2008. New insights into nitric oxide signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 59: 21-39.
- 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.
- Bian, S.; Jiang, Y.** 2009. Reactive oxygen species, antioxidant enzyme activities and gene expression patterns in leaves and roots of Kentucky bluegrass in response to drought stress and recovery. *Scientia Horticulturae* 120: 264-270.
- Boaretto, L.F., Carvalho, G., Borgo, L., Creste, S., Landell, M.G., Mazzafera, P., Azevedo, R.A.** 2014. Water stress reveals differential antioxidant responses of tolerant and non-tolerant sugarcane genotypes. *Plant Physiology. Biochem.* 74, 165-175.
- Boogar, A.R.; Salehi, H.; Jowkar, A.** 2014. Exogenous nitric oxide alleviates oxidative damage in turgrasses under drought stress. *South African Journal of Botany* 92: 78-82.
- Boronat, S.; Garcia-Santamarina, S.; Hidalgo, E.** 2015. Gel-free proteomic methodologies to study reversible cysteine oxidation and irreversible protein carbonyl formation. *Free Radical Research* 49(5): 494-510.
- Bothe, A., Westermeier, P., Wosnitza, A., Willner, E. Schum, A., Dehmer, K.J., Hartmann, S.** 2018. Drought tolerance in perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) as

- assessed by two contrasting phenotyping systems. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 204 (4): 375-389.
- Bravo, L.A.; Zúñiga, G.E.; Alberdi, M.; Corcuera, L.J.** 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. *Physiologia Plantarum*, 103: 1723.
- Bright, J.; Desikan, R.; Hancock, J.T.; Neill, S.J.** 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthesis. *The Plant Journal* 45: 113-122.
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R.L.** 2015. *Biochemistry & molecular biology of plants*, 2<sup>a</sup> ed. Wiley Blackwell, Reino Unido.
- Cairns, A. J.; Pollock, C. J.** 1988. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. *New Phytologist* 109: 399-405.
- Carvalho, M.A.M.; Dietrich, S.M.C.** 1993. Variation in fructan content from underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby in different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Chaki, M.; Kovacs, I.; Spannagl, M.; Lindermayr, C.** 2014. Computational Prediction of Candidate Proteins for S-Nitrosylation in *Arabidopsis thaliana*. *Plos One* 9(10): 110232.
- Chalmers, J.; Johnson, X.; Lidgett, A.; Spangenberg, G.** 2003. Isolation and characterisation of a sucrose:sucrose 1-fructosyltransferase gene from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Plant Physiology* 160: 1385–1391.
- Chalmers, J.; Lidgett, A.; Cummings, N.; Cao, Y.; Forster, J.; Spangenberg, G.** 2005. Molecular genetics of fructan metabolism in perennial ryegrass. *Plant Biotechnology Journal* 3: 459-474.
- 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 localisation 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.
- 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.

- Culotta, E.; Koshland, D.E.** 1992. NO news is good news. *Science* 258: 1862-1865.
- De Roover, J.; Van Laere, A.; De Winter, M.; Timmermans, J.; Van Der Ende, W.** 1999. Purification and properties of a second fructan exohydrolase from roots of *Cichorium intybus*. *Plant Physiology* 106: 28-34.
- De Roover, J.; Vandenbranden, K.; Van Laere, A.; Van den Ende, W.** 2000. Drought induces fructan synthesis and 1-SST (sucrose: sucrose fructosyltransferase) in roots and leaves of chicory seedlings (*Cichorium intybus* L.). *Planta* 210(5): 808-814.
- 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. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 390-396.
- Delledonne, M.; Xia, Y.; Dixon, R.A.; Lamb, C.** 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- 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.
- Durzan, D.J.; Pedroso, M.C.** 2002. Nitric oxide and reactive nitrogen oxide species in plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 19: 293-337.
- Edelman, J.; Jefford, T.G.** 1968. The mechanism of fructosan metabolism in higher plants as exemplified in *Helianthus tuberosus*. *New Phytologist* 67: 517-531.
- Ederli, L.; Morettini, R.; Borgogni, A.; Wasternack, C.; Miersch, O.; Reale, L.; Ferranti, F.; Tosti, N.; Pasqualini, S.** 2006. Interaction between nitric oxide and ethylene in the induction of alternative oxidase in ozone-treated tobacco plants. *Plant Physiology* 142: 595-608.
- Ederli, L.; Reale, L.; Madeo, L.; Ferranti, F.; Gehring, C.; Fornaciari, M.; Romano, B.; Pasqualini, S.** 2009. NO release by nitric oxide donors *in vitro* and in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 42-48.
- Farooq, M.; Basra, S.M.A.; Wahid, A.; Rehman, H.** 2009. Exogenously Applied Nitric Oxide Enhances the Drought Tolerance in Fine Grain Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* 195: 254-261.

- Feechan, A.; Kwon, E.; Yun, B.W.; Wang, Y.; Pallas, J.A.; Loake, G.J.** 2005. A central role for *S*-nitrosothiols in plant disease resistance. *PNAS* 102: 8054-8059.
- Feelisch, M.** 1998. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. *NaunynSchmiedeberg's Archives of Pharmacology* 358: 113-122
- Feng, B.; Yu, H.; Hu, Y.; Gao, X.; Gao, J.; Gao, D.; Zhang, S.** 2009. The physiological characteristics of the low canopy temperature wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes under simulated drought condition. *Acta Physiologiae Plantarum* 31(6): 1229-1235.
- Feng, Y.; Forgac, M.** 1992. A novel mechanism for regulation of vacuolar acidification. *The Journal of Biological Chemistry* 267(28): 19769-19772.
- Floryszak-Wieczorek, J.; Arasimowicz, M.; Milczarek, G.; Jelen, H.; Jackowiak, H.** 2007. Only a nearly nitric oxide burst and the following wave of secondary nitric oxide generation enhanced effective defence responses of pelargonium to a necrotrophic pathogen. *New Phytologist* 175: 718-730.
- Floryszak-Wieczorek, J.; Milczarek, G.; Arasimowicz, M.; Ciszewski, A.** 2006. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 224: 1363-1372.
- Foito, A.; Byrne, S.L.; Shepherd, T.; Stewart, D.; Barth, S.** 2009. Transcriptional and metabolic profiles of *Lolium perenne* L. genotypes in response to a PEG-induced water stress. *Plant Biotechnology Journal* 7: 719-732.
- Foyer, C.H.; Noctor, G.** 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell* 17(7): 1866-1875.
- Foyer, C.H.; Noctor, G.** 2005. Redox homeostis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell* 17: 1866-1875.
- Foyer, C.H.; Noctor, G.** 2009. Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications. *Antioxidants & Redox Signaling* 11(4): 861-905.
- Foyer, C.H.; Noctor, G.** 2011. Ascorbate and Glutathione: The Heart of the Redox Hub. *Plant Physiology* 155: 2-18.
- Freschi, L.** 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 4: 398.
- Frungillo, L.; Skelly, M.J.; Loake, G.J.; Spoel, S.H.; Salgado, I.** 2014. *S*-nitrosothiols regulates nitric oxide production and storage in plants through the nitrogen assimilation pathway. *Nature Communications* 5: 5401.

- Gadegaard, G.; Didion, T.; Folling, M.; Storgaard, M.; Andersen, C.H.; Nielsen, K.K.** 2008. Improved fructan accumulation in perennial ryegrass transformed with the onion fructosyltransferase genes 1-SST and 6G-FFT. *Journal of Plant Physiology* 165(11): 1214-1225.
- Gallagher, J.A.; Cairns, A.J.; Turner, L.B.** 2007. Fructan in temperate forage grasses: agronomy, physiology and molecular biology. In: Shiomi N, Benkeblia N, Onodera S, eds. Recent advances in fructo-oligosaccharides research. Trivandrum, India: Research Signpost, p. 15-46.
- Garcia, P.M.A.; Asega, A.F.; Silva, E.A.; Carvalho, M.A.M.** 2011. Effect of drought and rewatering on fructan metabolism in *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby. *Plant Physiology and Biochemistry* 49: 664-670.
- Garcia, P.M.A.; Hayashi, A.H.; Silva, E.A.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Carvalho, M.A.M.** 2015. Structural and metabolic changes in rhizophores of the Cerrado species *Chrysolaena obovata* (Less.) Dematt. as influenced by drought and rewatering. *Frontiers in Plant Science* 6: 721.
- García-Mata, C.; Lamattina, L.** 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. *Plant Physiology* 126: 1196-1204.
- Gasperl, A.; Morvan-Bertrand, A.; Prud'homme, M.P.; Van der Graaff, E.; Roitsch, T.** 2015. A Simple and Fast Kinetic Assay for the Determination of Fructan Exohydrolase Activity in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science* 6: 1154.
- Gasperl, A.; Morvan-Bertrand, A.; Prud'homme, M.P.; Van der Graaff, E.; Roitsch, T.** 2016. Exogenous Classic Phytohormones Have Limited Regulatory Effects on Fructan and Primary Carbohydrate Metabolism in Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science* 6: 1251.
- 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.
- Gillespie, K.M., Ainsworth, E.A.** 2007. Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nature Protocols*. 2 (4), 871-874.
- Groß, F., Durner, J., Gaupels, F.** 2013. Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in Plant Science*. 4, 419.
- Guo, F.; Okamoto, M.; Crawford, N.M.** 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100-103.
- Gupta, D.K.; Palma, J.M.; Corpas, F.J.** 2016. Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses. Springer, Nova York.

- Gupta, K.J.; Fernie, A.R.; Kaiser, W.M.; van Dongen, J.T.** 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in Plant Science* 16: 160-168.
- Halliwell, B., Grootveld, M., Gutteridge, J.M.** 1988. Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biochemical systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation. *Methods of Biochemical Analysis*. 33, 59-90.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.** 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 4th ed., Oxford University Press, Oxford.
- 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.
- Heath, R.L., Packer, L.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 125, 189-198.
- Hendry, G.A.F.; Wallace, R.K.** 1993. The origin, distribution and evolutionary significance of fructans. In: Suzuki, M. & Chatterton J.N, (eds). *Science and Technology of Fructans*. CRC Press, Boca Raton, p. 119-139.
- Henry, R.J., Darbyshire, B.** 1980. Sucrose : sucrose fructosyltransferase and fructan : fructan fructosyltransferase from *Allium cepa*. *Phytochemistry* 19: 1017–1020.
- Hincha, D.K.; Livingston, D.P.; Premakumar, R.; Zuther, E.; Obel, N.; Cacela, C.; Heyer, A.G.** 2007. Fructans from oat and rye: composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1611-1619.
- Hussain, A.; Mun, B.; Imran, Q.M.; Lee, S.; Adamu, T.A.; Sahid, M.; Kim, K.K.; Yun, B.** 2016. Nitric Oxide Mediated Transcriptome Profiling Reveals Activation of Multiple Regulatory Pathways in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 7: 975.
- Ignarro, L.J.; Byrns, R.E.; Buga, G.M.; Wood, K.S.** 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research* 61: 866-879.
- Isejima, E.M.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Dynamics of fructans in tuberous roots of *Viguiera discolor* Baker (Asteraceae) as influenced by phenology. *Plant Cell Physiology* 34: 723-727.
- Israr, M., Sahi, S., Datta, R., Sarkar, D.** 2006. Bioaccumulation and physiological effects of mercury in *Sesbania drummondii*. *Chemosphere*. 65 (4), 591-598.
- Jensen, D.E.; Belka, G.K.; Du Bois, G.C.**1998. S-Nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochemical Journal* 331: 659-668.

- Jermyn, M.A.** 1956. A new method for the determination of ketohexoses in presence of aldohexoses. *Nature*. 177, 38-39.
- Jiang, Y.; Huang, B.** 2001. Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Science* 41(2): 436.
- Jimenez-Quesada, M.J.; Carmona, R.; Lima-Cabello, E.; Travers, J.A.; Castro, A.J.; Claros, M.G.; Alché, J.D.** 2017. Generation of nitric oxide by olive (*Olea europaea* L.) pollen during *in vitro* germination and assessment of the S-nitroso- and nitro-proteomes by computational predictive methods. *Nitric Oxide* 68: 23-37.
- Jin, C.W.; Du, S.T.; Zhang, Y.S.** 2009. Atmospheric nitric oxide stimulates plant growth and improves the quality of spinach (*Spinacia oleracea*). *Annals of Applied Biology* 115: 113-120.
- Junglee S., Urban L., Sallanon H., Lopez-lauri F.** 2014. Optimized assay for hydrogen peroxide determination in plant tissue using potassium iodide. *American Journal of Analytical Chemistry*. 5, 730–736.
- Kawakami A.; Sato Y.; Yoshida M.** 2008. Genetic engineering of rice capable of synthesizing fructans and enhancing chilling tolerance. *Journal of Experimental Botany* 59: 793-802.
- Kawakami, A.; Yoshida, M.; Van den Ende, W.** 2005. Molecular cloning and functional analysis of a novel 6&1-FEH from wheat (*Triticum aestivum* L.) preferentially degrading small graminans like bifurcose. *Gene* 358: 93-101.
- Kerepesi, I.; Bányai-Stefanovits, E.; Galiba, G.** 2004. Cold acclimation and abscisic acid induced alterations in carbohydrate content in calli of wheat genotypes differing in frost tolerance. *Journal of Plant Physiology* 161: 131-133.
- Khan, M.N.; Mobin, M.; Mohammad, F.; Corpas, F.J.** 2014. *Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology*. Springer, Nova York.
- Kharitonov, V.G.; Sundquist, A.R.; Sharma, V.S.** 1994. Kinetics of nitric oxide autoxidation in aqueous solutions. *The Journal of Biological Chemistry* 269: 5881-5883.
- Lammens, W.; Le Roy, K.; Yuan, S.; Vergauwen, R.; Rabijns, A.; Van Laere, A.; Strelkov, S.V.; Van den Ende, W.** 2012. Crystal structure of 6-SST/6-SFT from *Pachysandra terminalis*, a plant fructan biosynthesizing enzyme in complex with its acceptor substrate 6-kestose. *The Plant Journal* 70: 205-219.
- Lascano, H.R., Antonicelli, G.E. Luna, C.M., Melchiorre, M.N., Gómez, L.D., Racca, R.W., Trippi, V.S., Casano, L.M.** 2001. Antioxidant system response of different

- wheat cultivars under drought: field and in vitro studies. *Aust. J. Plant Physiology*. 28 (11): 1095-1102.
- Lasseur, B.; Lothier, J.; Djoumad, A.; Coninck, B.; Smeekens, S.; Laere, A.V.; Morvan-Bertrand, A.; Van den Ende, W.; Prud'homme, M.P.** 2006. Molecular and functional characterization of a cDNA encoding fructan:fructan 6G-fructosyltransferase (6G-FFT)/fructan:fructan 1-fructosyltransferase (1-FFT) from perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Journal Experimental Botany* 57(11): 2719-2734.
- Lasseur, B.; Lothier, J.; Wiemken, A.; Van Laere, A.; Morvan-Bertrand, A.; Van den Ende, W.; Prud'homme, M.P.** 2010. Towards a better understanding of the generation of fructan structure diversity in plants: molecular and functional characterization of a sucrose:fructan 6-fructosyltransferase (6-SFT) cDNA from perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Journal of Experimental Botany* 62(6): 1871-1885.
- Lee, J.M.; Donaghy, D.J.; Sathish, P.; Roche, J.R.** 2010. Perennial ryegrass regrowth after defoliation – physiological and molecular changes. *NZ Grassland Association* 72: 127-134.
- Li, C.; Li, T.; Zhang, D.; Jiang, L.; Shao, Y.** 2013. Exogenous nitric oxide effect on fructan accumulation and *FBEs* expression in chilling-sensitive and chilling-resistant wheat. *Environmental and Experimental Botany* 86: 2-8.
- Lindermayr, C.; Saalbach, G.; Durner, J.** 2005. Proteomic Identification of S-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*<sup>[w]</sup>. *Plant Physiology* 137: 921-930.
- Liu, H.; Lau, E.; Lam, M.P.; Chu, H.; Li, S.; Huang, G.; Guo, P.; Wang, J.; Jiang, L.; Chu, I.K.; Lo, C.; Tao, Y.** 2010. OsNOA1/RIF1 is a functional homolog of AtNOA1/RIF1: implication for a highly conserved plant cGTPase essential for chloroplast function. *New Phytologist* 187: 83-105.
- Liu, L.; 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.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D.** 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods* 4: 402-408.
- Livingston III, D.P., Hinch, D.K., Heyer, A.G.** 2009. Fructan and its relationship to abiotic stress tolerance in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 66: 2007-2023.
- Livingston, D.P.; Henson, C.A.** 1998. Apoplastic sugars, fructans, fructan exohidrolase, and invertase in winter oat: responses to second-phase cold hardening. *Plant Physiology* 116: 403-408.

- Longhi-Wagner, H.M.** 2015. *Lolium* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. BFG. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia* 66(4): 1085-1113.
- Lopez, M.G.; Mancilla-Margalli, N.A.; Mendonza-Díaz, G.** 2003. Molecular Structures of Fructans from *Agave tequilana* Weber var. *azul*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(27): 7835-7840.
- Lothier, J.; Lasseur, B.; Le Roy, K.; Van Laere, A.; Prud'homme, M.P.; Barre, P.; Van den Ende, W.; Morvan-Bertrand, A.** 2007. Cloning, gene mapping, and functional analysis of a fructan 1-exohydrolase (1-FEH) from *Lolium perenne* implicated in fructan synthesis rather than in fructan mobilization. *Journal of Experimental Botany* 58(8): 1969-1983.
- Majeed, S., Nawaz, F., Naeem, M., Ashraf, M. Y.** 2018. Effect of exogenous nitric oxide on sulfur and nitrate assimilation pathway enzymes in maize (*Zea mays* L.) under drought stress. *Acta Physiologiae Plantarum*. 40 (12), 206.
- Maldonado-Alconada, A.M.; Echevarría-Zomeño, S.; Lindermayr, C.; Redondo-López, I.; Durner, J.; Jorrín-Novo, J.** 2011. Proteomic analysis of Arabidopsis protein S-nitrosylation in response to inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Acta Physiologiae Plantarum* 33(4): 1493-1514.
- Marx, S.P.; Josef, N.; Frehner, M.** 1997. Hydrolysis of fructan in grasses: a  $\beta$ -(2-6)-linkage specific fructan- $\beta$ -fructosidase from stubble of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 135(2): 279-290.
- Meuriot, F.; Morvan-Bertrand, A.; Noiraud-Romy, N.; Decau, M.L.; Escobar-Gutiérrez, J.; Gastal, F.; Prud'homme, M.P.** 2018. Short-term effects of defoliation intensity on sugar remobilization and N fluxes in ryegrass. *Journal of Experimental Botany* 69(16): 3975-3986.
- Michiels, A.; Van Laere, A.; Van Den Ende, W.; Tucker, M.** 2004. Expression analysis of a chicory fructan 1-exohydrolase gene reveals complex regulation by cold. *Journal of experimental Botany*. 55(401): 1325-1333.
- Mishina, T.E.; Lamb, C.; Zeier, J.** 2007. Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environment* 30: 39-52.
- Mittler, R.; Vanderauwera, S.; Gollery, M.; Van Breusegem, F.** 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9: 490-498.
- Modolo, L.V.; Augusto, O.; Almeida, I.M.; Magalhães, J.R.; Salgado, I.** 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to

- Pseudomonas syringae*. Federation of European Biochemical Societies 579: 3814-3820.
- Modolo, L.V.; Augusto, O.; Almeida, I.M.G.; Pinto-Maglio, C.A.F.; Oliveira, H.C.; Seligman, K.; Salgado, I.** 2006. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. Plant Science 171: 34-40.
- Moraes, M.G.; Carvalho, M.A.M.; Franco, A.C.; Pollock, C.J.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2016. Fire and Drought: Soluble Carbohydrate Storage and Survival Mechanisms in Herbaceous Plants from the Cerrado. Bioscience 66: 107-117.
- Moro, C.F.; Gaspar, M.; da Silva, F.R.; Pattathil, S.; Hahn, M.G.; Salgado, I.; Braga, M.R.** 2016. S-nitrosoglutathione promotes cell wall remodelling, alters the transcriptional profile and induces root hair formation in the hairless *root hair defective 6 (rhd6)* mutant of *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist 213(4): 1771-1786.
- Moro, M.A.; Darley-Usmar, V.M.; Lizasoain, I.** 1995. The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite. British Journal of Pharmacology 116: 1999-2004.
- Nabi, R.B.S., Tayade, R., Hussain, A., Kulkarni, K.P., Muhammad, I., Mun, B.G., Yun, B.W.** 2019. Nitric oxide regulates plant responses to drought, salinity, and heavy metal stress. Environmental and Experimental Botany. 161, 120-133.
- 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.
- Neil, S.; Barros, R.; Bright, J.; Desikan, R.; Hancock, J.; Harrison, J.; Morris, P.; Ribeiro, D.; Wilson, I.** 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. Journal of Experimental Botany 59(2): 165-176.
- Neil, S.J.; Desikan, R.; Clarke, A.; Hancock, J.T.** 2002. Nitric Oxide Is a Novel Component of Abscisic Acid Signaling in Stomatal Guard Cells. Plant Physiology 128: 13-16.
- Nelson, D.I.; Cox, M.M.** 2014. Princípios de bioquímica de Lehninger, 6ª ed. Artmed, Porto Alegre.
- Nemati, F., Ghanati, F., Gavlighi, H. A., Sharifi, M.** 2018. Fructan dynamics and antioxidant capacity of 4-day-old seedlings of wheat (*Triticum aestivum*) cultivars during drought stress and recovery. Functional Plant Biology. 45 (10), 1000-1008.

- Noctor, G.; Mhamdi, A.; Chaouch, S.; Han, Y.; Neukermans, J.; Marquez-Garcia, B.; Queval, G.; Foyer, C.H.** 2012. Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, Cell & Environment* 35: 454-484.
- 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.
- Palmer, R.M.; Ferrige, A.G.; Monsada, S.** 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526.
- Pavis, N.; Chatterton, N.J.; Harrison, P.A.; Baumgartner, S.; Praznik, W.; Boucaud, J.; Prud'Homme, M.P.** 2001. Structure of fructans in roots and leaf tissues of *Lolium perenne*. *New Phytologist* 150: 83-95.
- Peshev, D.; Vergauwen, R.; Mioglia, A.; Hideg, E.; Van den Ende, W.** 2013. Towards understanding vacuolar antioxidant mechanisms: a role for fructans? *Journal of Experimental Botany* 64: 1025-1038.
- Pilon-Smits, E.A.H.; Ebskamp, M.J.M.; Paul, M.J.; Jeuken, M.J.W.; Weisbeek, P.J.; Smeekens, S.C.M.** 1995. Improved performance of transgenic fructan accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* 107: 125-130.
- Pilon-Smits, E.A.H.; Terry, N.; Sears, T.; Van Dun, K.** 1999. Enhanced drought resistance in Fructan-producing sugar beet. *Plant Physiology and Biochemistry* 37: 313- 317.
- Pollock, C.J.; Cairns, A.J.; Sims, I.M.; Housley, T.L.** 1996. Fructans as Reserve Carbohydrates in Crop Plants. In: Zamski, E. & Shaffer, A.A. (eds). *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops: Source – Sink Relationships*. Marcel Dekker Inc, New York, p. 97-113.
- Portes, M.T.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Carvalho, M.A.M.** 2008. Low temperature and defoliation affects fructan metabolizing enzymes in different regions of the rhizophores of *Vernonia herbacea*. *Journal of Plant Physiologist* 165: 1572-1581.
- Prado, A.M.; Porterfield, D.M.; Feijó, J.A.** 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development* 131: 2707-2714.
- Prud'homme, M.P.; Gonzalez, B.; Billard, J.P.; Boucaud, J.** 1992. Carbohydrate Content, Fructan and Sucrose Enzyme Activities in Roots, Stubble and Leaves of Ryegrass (*Lolium perenne* L.) as Affected by Source/Sink Modification after Cutting. *Journal of Plant Physiology* 140(3): 282-291.
- Prud'homme, M.P.; Morvan-Bertrand, A.; Lasseur, B.; Lothier, J.; Meuriot, F.; Decau, M.L.; Romy, N.** 2007. *Lolium perenne*, backbone of sustainable development, source of fructans for grazing animals and potential source of novel enzymes for

- biotechnology. In Shiomi, N.; Nouredine, B.; Suichi, O. Recent Advances in Fructooligosaccharides Research, eds. Kerala: Reaserch Signpost, p. 231-258.
- Qu, Z.; Meng, F.; Bomgarden, R.D.; Viner, R.I.; Li, J.; Rogers, J.C.; Cheng, J.; Greenlief, C.M.; Cui, J.; Lubahn, D.B.; Sun, G.Y.; Gu, Z.** 2014. Proteomic Quantification and Site-Mapping of S-Nitrosylated Proteins Using Isobaric iodoTMT Reagents. *Journal of Proteome Research* 13: 3200-3211.
- Raju, K.; Doulias, P.T.; Tenopoulou, M.; Greene, J.L.; Ischiropoulos, H.** 2012. Strategies and tools to explore protein S-nitrosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820(6): 684-688.
- Rey-Asensio, A.; Carballeira, A.** 2007. *Lolium perenne* as a biomonitor of atmospheric levels of fluoride, *Environment International* 33: 583-588.
- Rigui, A.P.; Gaspar, M.; Oliveira, V.F.; Purgatto, E.; Carvalho, M.A.M.** 2015. Endogenous hormone concentrations correlate with fructan metabolism throughout the phenological cycle in *Chrysoleaena obovata*. *Annals of Botany* 115: 1177–1190.
- Ritsema, T.; Joling, J.; Smeekens, S.** 2003. Patterns of fructan synthesized by onion fructan:fructan 6G-fructosyltransferase expressed in tobacco BY2 cells – is fructan:fructan 1-fructosyltransferase needed in onion? *New Phytologist* 160: 61-67.
- Ritsema, T.; Smeekens, S.C.M.** 2003. Fructans: beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 223-230.
- Roy, S., Arora, A., Chinnusamy, V., Singh, V.P.** 2017. Endogenous reduced ascorbate: an indicator of plant water deficit stress in wheat. *Ind. J. Plant Physiology.* 22 (3): 365-368.
- Ruuska, S.A.; Lewis, D.C.; Kennedy, G.; Furbank, R.T.; Jenkins, C.L.; Tabe, L.M.** 2008. Large scale transcriptome analysis of the effects of nitrogen nutrition on accumulation of stem carbohydrate reserves in reproductive stage wheat. *Plant Molecular Biology* 66: 15-32.
- Salgado, I.; Oliveira, H.C.; Gaspar, M.** 2017. Plant nitric oxide signaling under environmental stresses. In: Pandey, G.K. Mechanism of plant hormone signaling under stress. Wiley Blackwell, Nova Jersey, p. 345-361.
- Sandrin, C.Z; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.; Carvalho, M.A.M.; Delitti, W.B.C.; Domingos, M.** 2008. Sub-tropical urban environment affecting content and composition of non-structural carbohydrates of *Lolium multiflorum* ssp. *Italicum* cv. Lema. *Environmental Pollution* 156: 915-921.
- Saville, B.** 1958. A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols. *Analyst* 83: 670-672.

- Schaedle, M.; Bassham, J.A.** 1977. Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiology* 59: 1011-1012.
- Sehrawat, A.; Abat, J.K.; Deswall, R.** 2013. RuBisCO depletion improved proteome coverage of cold responsive S-nitrosylated targets in *Brassica juncea*. *Frontiers in Plant Science* 4: 342.
- Signorelli, S.; Corpas, F.J.; Rodríguez-Ruiz, M.; Valderrama, R.; Barroso, J.B.; Borsani, O.; Monza, J.** [in press]. Drought stress triggers the accumulation of NO and SNOs in cortical cells of *Lotus japonicus* L. roots and the nitration of proteins with relevant metabolic function. *Environmental and Experimental Botany*.
- Silveira, N.M.; Frugillo, L.; Marcos, F.C.C.; Pelegrino, M.T.; Miranda, M.T.; Seabra, A.B.; Salgado, I.; Machado, E.C.; Ribeiro, R.V.** 2016. Exogenous nitric oxide improves sugarcane growth and photosynthesis under water deficit. *Planta* 244: 181-190.
- Simaei, R.; Khavari-Nejad, R.A.; Bernard, F.** 2012. Exogenous Application of Salicylic Acid and Nitric Oxide on the Ionic Contents and Enzymatic Activities in NaCl-Stressed Soybean Plants. *American Journal of Plant Sciences* 3: 1495-1503.
- Smirnoff, N.** 1996. The function and metabolism of ascorbic acid in plants. *Annals of Botany* 78: 661-669.
- Somogyi, M.** 1945. A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.* 160, 61-63.
- Souza, S.R.; Blande, J.D.; Holopainen, J.K.** 2013. Pre-exposure to nitric oxide modulates the effect of ozone on oxidative defenses and volatile emissions in lima bean. *Environmental Pollution* 179: 111-119.
- Stitt, M.; Gibon, Y.** 2014. Why measure enzyme activities in the era of systems biology? *Trends in Plant Science*. 19: 256–265.
- Suárez-González, E.M.; López, M.G.; Délano-Frier, J.P.; Gómez-Leyva, J.F.** 2014. Expression of the 1-SST and 1-FFT genes and consequent fructan accumulation in *Agave tequilana* and *A. inaequidens* is differentially induced by diverse (a)biotic-stress related elicitors. *Journal of Plant Physiology* 171: 359-372.
- Szalai, G., Kellós, T., Galiba, G., Kocsy, G.** 2009. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *Journal of Plant Growth Regulation*. 28 (1), 66-80.
- Tamura, K.; Kawakami, A.; Sanada, Y.; Tase, K.; Komatsu, T.; Yoshida, M.** 2009. Cloning and functional analysis of a fructosyltransferase cDNA for synthesis of highly polymerized levans in timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of Experimental Botany* 60: 893-905.

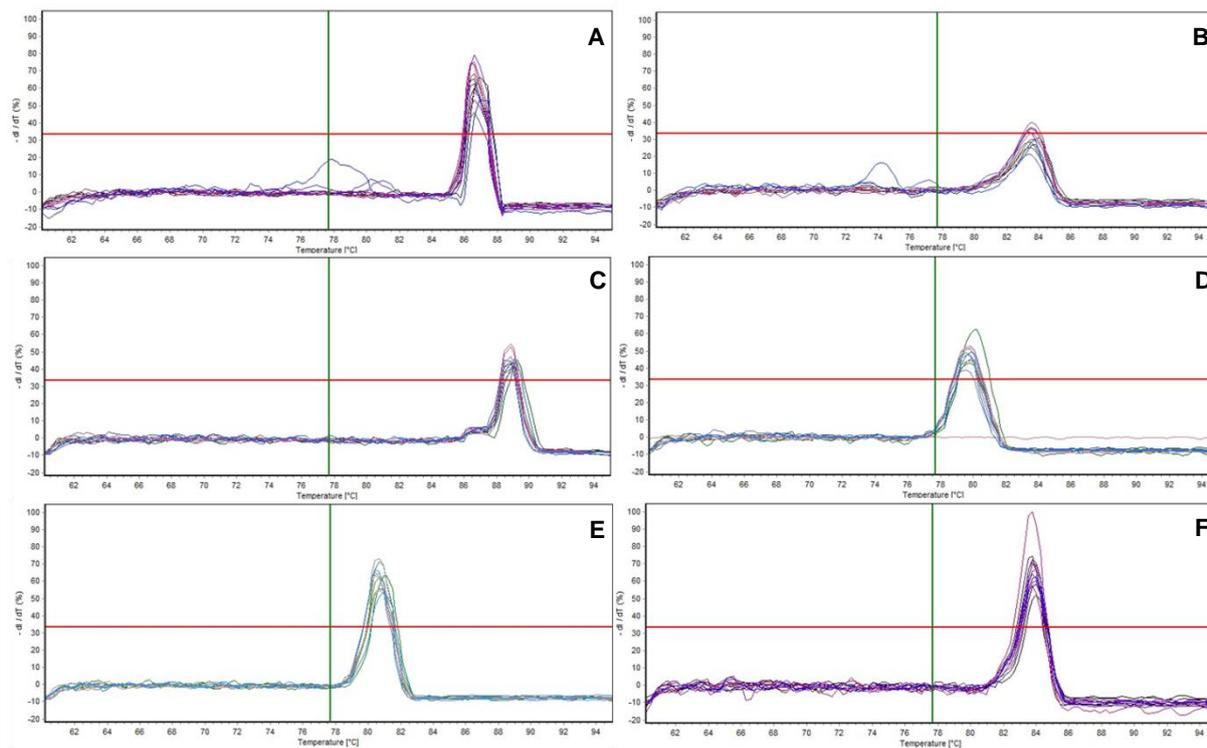
- Terrel, E.E.** 1968. A taxonomic revision of the genus *Lolium*. USDA Technical Bulletins, Washington 1392: 1-95.
- Van den Ende, W.** 2013. Multifunctional fructans and raffinose family oligosaccharides. *Frontiers in Plant Science* 4.
- Van den Ende, W.** 2018. Novel fructan exohydrolase: unique properties and applications for human health. *Journal of Experimental Botany* 69(18): 4227-4231.
- Van den Ende, W.; Van Laere, A.** 1996. Fructan synthesizing and degrading activities in chicory roots (*Cichorium intybus* L.) during growth, storage and forcing. *Journal of Plant Physiology* 149: 43-50.
- Van Den Ende, W.; Yoshida, M.; Clerens, S.; Vergauwen, R.; Kawakami, A.** 2005. Cloning, characterization and functional analysis of novel 6-kestose exohydrolases (6-KEHs) from wheat (*Triticum aestivum*). *New Phytologist*, 166: 917-932.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A.** 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*. 151 (1), 59-66.
- Velikova, V.; Pinelli, P.; Pasqualini, S.; Reale, L.; Ferranti, F.; Loreto, F.** 2005. Isoprene decreases the concentration of nitric oxide in leaves exposed to elevated ozone. *New Phytologist* 166: 419-426.
- Verhaest, M.; Van den Ende, W.; Le Roy, K.; De Ranter, C.J.; Van Laere, A.; Rabijns, A.** 2005. X-ray diffraction structure of a plant glycosyl hydrolase Family 32 protein: fructan 1-exohydrolase IIa of *Cichorium intybus*. *The Plant Journal* 41: 400-411.
- Verspreet, J.; Dornez, E.; Van den Ende, W.; Delcour, J.A.; Courtin, C.M.** 2015. Cereal grain fructans: Structure, variability and potential health effects. *Trends in Food Science & Technology* 43: 32-42.
- Vieira, C.C.J.; Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1993. Fructose-containing carbohydrates in the tuberous root of *Gomphrena macrocephala* St.-Hill. (Amaranthaceae) at different phenological phases. *Plant, Cell & Environment* 16: 919-928.
- Vijn, I.; Smeekens S.** 1999. Fructan: More than a reserve carbohydrate? *Plant Physiology* 120: 351-359.
- Volaire, F.; Thomas, H.** 1995. Effects of Drought on Water Relations, Mineral Uptake, Water-soluble Carbohydrate Accumulation and Survival of Two Contrasting Populations of Cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Annals of Botany* 75: 513-524.
- Wang P.; Du, Y.; Li, Y.; Ren, D.; Song, C.P.** 2010 Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 2981-2998.

- Wang, Y.; Veremeyko, T.; Wong, A.H.K.; El Fatimy, R.; Wei, Z.; Cai, W.; Krichevsky, A.M.** 2017. Downregulation of miR-132/212 impairs S-nitrosylation balance and induces tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* 51: 156-166.
- Wang, Y.S.; Yang, Z.M.** 2005. Nitric oxide reduces aluminium toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant and Cell Physiology* 46: 1915-1923.
- Wei, J.; Chatterton, J.** 2001. Fructan biosynthesis and fructosyltransferase evolution: Expression of the 6-SFT (sucrose:fructan 6-fructosyltransferase) gene in crested wheatgrass (*Agropyron cristatum*). *Journal of Plant Physiology*, 158: 1203-1213.
- Wendehenne, D.; Durner, J.; Klessig, D.F.** 2004. Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7(4): 448-455.
- Weng, X.; Zheng, C.J.; Xu, H.X.; Sun, J.** 2007. Characteristics of photosynthesis and functions of the water–water cycle in rice (*Oryza sativa*) leaves in response to potassium deficiency. *Physiologia Plantarum* 131: 614-621.
- Xu, L.; Han, L.; Huang, B.** 2011. Antioxidant Enzyme Activities and Gene Expression Patterns in Leaves of Kentucky Bluegrass in Response to Drought and Post-drought Recovery. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 136(4): 247-255.
- Yamada, T.; Foster, J.W.; Humphreys, M.W.; Takamizo, T.** 2005. Genetics and molecular breeding in *Lolium/Festuca*. Grass Species Complex. *Grassland Science* 51(2): 89-106.
- Yamamoto, T.; Bing, R.J.** 2000. Nitric oxide donors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 225: 200-206.
- Yamasaki H.; Sakihama, Y.** 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxy nitrite by plant nitrate reductase: *in vitro* evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* 468: 89-92.
- Yang, J.; Zhang, J.; Wang, Z.; Zhu, Q.; Liu, L.** 2004. Activities of fructan- and sucrose-metabolizing enzymes in wheat stems subjected to water stress during grain filling. *Planta* 220: 331-343.
- Zaffagnini, M.; De Mia, M.; Morisse, S.; Di Giacinto, N.; Marchand, C.H.; Maes, A.; Lemaire, S.D.; Trost, P.** 2016. Protein S-nitrosylation in photosynthetic organisms: A comprehensive overview with future perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta* 8: 952-966.

- Zemojtel T.; Fröhlich, 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.
- Zhang, J.; Li, H.; Xu, B.; Li, J.; Huang, B.** 2016. Exogenous Melatonin Suppresses Dark-Induced Leaf Senescence by Activating the Superoxide Dismutase-Catalase Antioxidant Pathway and Down-Regulating Chlorophyll Degradation in Excised Leaves of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Frontiers in Plant Science* 7: 1500.
- Zhang, M.; Dong, J.F.; Jin, H.H.; Sun, L.N.; Xu, M.J.** 2011. Ultraviolet-B-induced flavonoid accumulation in *Betula pendula* leaves is dependent upon nitrate reductase-mediated nitric oxide signaling. *Tree Physiology* 31: 798-807.
- Zhao, M.G.; Chen, L.; Zhang, L.L.; Zhang, W.H.** 2009. Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 755-767.
- Zhao, M.G.; Tian, Q.Y.; Zhang W.H.** 2007. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 144: 206-217.

## 8. ANEXOS

### 8.1. Anexo 1



**Figura 25.** Curvas de desnaturação dos fragmentos amplificados, utilizando os pares de *primers* selecionados para os genes *1-FFT* (A), *1-FEH* (B), *CAT* (C), *GR* (D), *APX* (E), *EF* (F).