

Lucas Martins Zimmer Prados

Respostas ao déficit hídrico em feijão (*Phaseolus vulgaris*) e caupi (*Vigna unguiculata*), induzidas por óxido nítrico

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

**Orientador: Dr. Marcel Giovanni Costa França**  
Co-Orientador: Dr. José Ronaldo Magalhaes

Novembro / 2007  
Belo Horizonte – Minas Gerais

## Ficha Catalográfica

ZIMMER-PRADOS, Lucas Martins.

50pgs

Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Departamento de Botânica.

1. estresse hídrico. 2. óxido nítrico. 3. fotossíntese. 4. tolerância protoplasmática. 5. condutância estomática. 6. germinação.

I. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.  
Departamento de Botânica

Novembro / 2007

Belo Horizonte – Minas Gerais

## **Agradecimentos**

Ao Professor Dr. Marcel Giovanni Costa França pela orientação, de perto e de longe, com uso de tecnologias possíveis e impossíveis.

Ao Professor Dr. José Ronaldo Magalhães pela co-orientação, pela atenção e pela gentileza em ceder ingredientes essenciais à realização deste.

Agradeço à equipe do laboratório de Fisiologia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e seus integrantes pelas belas contribuições a este trabalho, pelas ajudas sinceras, pelo auxílio em experimentos e pesquisas.

Agradeço também à equipe do laboratório de Anatomia Vegetal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pelas contribuições e críticas sempre construtivas.

À CAPES pela bolsa concedida durante a realização do projeto.

Aos meus amigos e amores sempre presentes, à fé na realização deste, aos companheiros atuantes e opinantes nessa jornada.

Aos meus pais pelo incentivo e presença.

Auch zuweiler schlaffert der guter Gott.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
Objetivos gerais	3
Objetivos específicos	3
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	4
2.1. Óxido nítrico	4
2.1.1. Síntese e principais funções	4
2.1.2. Formas químicas	5
2.1.3. Interações fisiológicas associadas à emissão de óxido nítrico	6
2.2. Défice hídrico em plantas: Efeitos fisiológicos	8
2.2.1. Mecanismos celulares de tolerância a seca	9
2.2.2. Tolerância protoplasmática	10
2.2.3. Efeito do déficit hídrico sobre a fotossíntese	11
2.2.4. Efeito do déficit hídrico sobre a germinação de sementes	13
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	13
3.1. Material vegetal e condições de crescimento	13
3.2. Tratamentos com óxido nítrico	14
3.3. Germinação de sementes	15
3.4. Condutância estomática	15
3.5. Eficiência fotossintética	15
3.6. Conteúdo relativo de água	16
3.7. Tolerância protoplasmática	17
3.7.1. Ensaio do tempo de lavagem	17
3.7.2. Índice de dano membranas	18
3.7.3. Eficiência fotossintética em discos foliares	19
3.8. Tratamento estatístico	19
<b>4. RESULTADOS</b>	20
4.1. Efeito do déficit hídrico	20
4.2. Germinação de sementes	20
4.3. Condutância estomática	21
4.4. Eficiência fotossintética	23
4.5. Conteúdo relativo em água	29
4.6. Tolerância protoplasmática	30
<b>5. DISCUSSÃO</b>	32
<b>6. CONCLUSÕES</b>	37
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	37
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	38

## Resumo

O óxido nítrico (NO) atualmente é reconhecido como um mediador intra e intercelular de diversas funções em células animais e vegetais. Enquanto alguns autores consideram-no como agente indutor de estresse, outros afirmam que o mesmo possui papel protetor agindo principalmente, na interrupção de cadeias de radicais livres formadas sob estresse oxidativo. Os fatores mais limitantes ao crescimento vegetal são os estresses ambientais sendo a falta de água, o mais adverso. Os efeitos do estresse por déficit de água são geralmente percebidos como uma redução nas taxas de fotossíntese e crescimento, frequentemente associados a alterações no metabolismo vegetal. Para analisar os efeitos do NO sobre o déficit hídrico, sementes e plantas de *Phaseolus vulgaris* e de *Vigna unguiculata*, respectivamente sensível e tolerante à seca, foram submetidas a estresse hídrico severo com aplicação exógena ou não de NO, através do seu doador nitroprussiato de sódio (SNP). Foram analisados: germinação de sementes, condutância estomática (GS), parâmetros fotossintéticos (taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) e fluorescência máxima da clorofila *a* (FMax)) e conteúdo relativo de água (CRA). A fuga de eletrólitos (FE), e o índice de dano membranar (IDM) foram analisados em porções destacadas do vegetal submetidos à estresse hídrico controlado, em solução de polietileno-glicol (PEG-6000). Em plantas submetidas ao tratamento com PEG, NO foi responsável por um aumento significativo nas taxas de germinação de sementes de 37% para *P. vulgaris* e de 50% para *V. unguiculata*, quando comparadas aos tratamentos que não receberam aplicação exógena de SNP, 11% e 15% respectivamente. O NO também foi responsável por prolongar a sobrevivência das plantas sob estresse em 24h para *V. unguiculata* e 48h para *P. vulgaris*, evidenciado pelos valores mínimos de GS, ETR, FMax e CRA tardios nestes tratamentos quando comparados ao controle. O NO não teve influência sobre o IDM sendo que este foi diretamente proporcional ao nível de estresse hídrico aos quais as plantas foram submetidas sendo que em *P. vulgaris*, sensível à seca, foi mais pronunciado. A FE mostrou-se maior nos primeiros 15 minutos de lavagem de discos foliares estabelecidos em ensaios prévios e também não teve correlação com aplicação exógena de NO. Em porções destacadas, o NO teve um efeito positivo nas taxas fotossintéticas aumentando os valores de ETR em estresses moderados, correspondentes a potenciais hídricos ( $\Psi_w$ ) -0,6MPa para *P. vulgaris* e -0,9MPa para *V. unguiculata*. Em estresse hídrico severo, ( $\Psi_w$ ) de -1,2MPa para *P. vulgaris* e -1,8MPa para *V. unguiculata*, o NO diminuiu a ETR em relação às plantas que não receberam aplicação exógena de SNP. Concluiu-se que há um efeito positivo da aplicação de NO exógeno sobre o retardamento dos efeitos negativos do estresse hídrico moderado, uma interação benéfica entre NO e germinação de sementes sob déficit hídrico induzido por PEG e um aumento da resistência à seca tanto na planta tolerante quanto na planta sensível.

## Abstract

Nitric oxide (NO) is recognized as an intra and inter cellular mediator of a number of functions in animal and vegetal cells. Some authors consider it as a stress inductor agent and some claim it has a protective role acting, mainly, in the interruption of free radical chains formed under stress conditions. Among the limiting factors to plant growth, water stress is considered the greatest. Its effects are usually seen as low photosynthesis and growth rates, frequently associated with disturbances in plant metabolism. To analyze the effects of NO in water stress conditions, seeds and plants of *Phaseolus vulgaris* and *Vigna unguiculata*, respectively sensitive and tolerant to stress, were submitted to severe drought conditions with and without NO exogenous application via sodium-nitroprussiate (SNP). Seed germination, stomatal conductance (GS), photosynthetic parameters (electron transport rate (ETR) and maximum yield (FMax)), and relative water content (CRA) were analyzed. Electrolyte leakage (FE) and membrane injury index (IDM) were measured in detached portions under controlled stress conditions by using polyethylene glycol (PEG-6000) solutions. In PEG Treated plants, NO was responsible for a significative increase of 37% for *P. vulgaris* and 50% for *V. unguiculata* in seed germination rates when compared to the groups that didn't receive SNP, 11% and 15% respectively. It was also responsible for a delay in physiological death, 24h for *V. unguiculata* and 48h for *P. vulgaris*, of the stressed individuals, evident by the minimum GS, ETR, FMax and CRA values found when compared to the control groups. NO had no influence over IDM data being those directly proportional to the stress level which plants were submitted to. Though, *P. vulgaris*, sensitive to drought, had a more pronounced effect. EL was higher during the first 15 minutes of washing, established in previous essays but also had no correlation with exogenous NO application. In detached portions, NO had a positive effect on photosynthetic values increasing ETR under moderate stresses, hidric potentials ( $\Psi_w$ ) -0,6MPa for *P. vulgaris* and -0,9MPa for *V. unguiculata*. Under severe drought conditions, ( $\Psi_w$ ) -1,2MPa for *P. vulgaris* and -1,8MPa for *V. unguiculata*, NO decreased ETR values when compared to the plants that didn't receive exogenous SNP. It was concluded that there is a positive relation between the application of NO and a delay of the negative effects of drought, a beneficial interaction between NO and seed germination under induced drought stress and an increase of drought resistance in both tolerant and sensitive plants.

## 1 - Introdução

O óxido nítrico (NO) é um radical livre lábil, produzido a partir da L-Arginina pela enzima NO sintase (NOS) em diversas células de mamíferos (Anbar, 1995). NO foi originalmente identificado como um fator derivado de relaxante endotelial em coelhos, mas, atualmente, é reconhecido como um mediador intra e intercelular de diversas funções em células animais (Moilanen & Vapaatalo, 1995). Inicialmente, devido às suas propriedades em reagir com centros redox em proteínas e membranas, NO era tido como tóxico ou potencialmente danoso. No entanto, estudos posteriores em animais descreveram NO como um componente molecular de diferentes vias de transdução de sinal. Dependendo da concentração e tecido onde está atuando, NO é considerado tanto tóxico como protetor em células animais e vegetais (Wink et al., 1993; Beligni & Lamattina, 1999c, 2001).

Atividade e acúmulo de NO já foram reportadas em diferentes plantas (Ninneman & Maier, 1996; Barroso et al., 1999) e, recentemente, um gene (*NOS1*) responsável pela codificação de uma proteína com sequência similar àquela que medeia a síntese de NO em *Helix pomatia*, foi isolado de *Arabidopsis* (Guo et al., 2003). Enquanto alguns autores consideram o NO um agente indutor de estresse (Leshem et al., 1997), outros afirmam que o mesmo possui um papel protetor agindo principalmente, na interrupção de cadeias de radicais livres formadas sob estresse oxidativo, condições geradas por ataques de patógenos, alguns tipos de estresse abióticos e herbicidas metilviologênicos (Laxalt et al., 1997; Beligni & Lamattina, 1999a, 1999b).

Os fatores mais limitantes ao crescimento vegetal são os estresses ambientais sendo, a falta de água, o mais limitante. A deficiência hídrica provoca uma série de respostas, geralmente prejudiciais aos vegetais. Diversas dessas respostas como diminuição da condutância estomática (Gs), a fotoinibição e redução das taxas fotossintéticas (e conseqüente diminuição do crescimento e produtividade vegetais), e mecanismos de respostas ao déficit hídrico já foram descritos em diversas espécies (Hsiao & Acevedo, 1974; O'Toole et al., 1976; Bergamaschi et al., 1988; Chaves, 1991; Feng et al., 1994) e, mais recentemente, em espécie endêmica do Cerrado brasileiro (Zimmer-Prados et al., 2008 em preparação).

Esse tipo de estresse ocorre quando as taxas de transpiração excedem as de absorção de água sendo componentes de diversos tipos de estresse associados incluindo seca, salinidade e baixas temperaturas (McCue & Hanson, 1990). As plantas possuem diferentes mecanismos para lidar com o déficit hídrico. A condutância estomática ( $G_s$ ) é reduzida como parte de respostas sistêmicas de origem no sistema radicular. Uma dessas respostas é a produção de ácido abscísico (ABA) que é responsável por uma elevação na concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  nas células guarda levando ao fechamento estomático. Elevação dos teores de  $Ca^{2+}$  podem ocorrer por influxo do mesmo ou pela sua liberação de reservatórios intracelulares. Esse evento envolve diferentes mecanismos como canais iônicos dependentes de voltagem, cadeias de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) e cADP-Rib (cADPR) (Muir & Sanders, 1996; Kopka et al., 1997; Wu et al., 1997; Blatt, 2000).

Os efeitos do estresse por déficit de água são geralmente percebidos como uma redução nas taxas de fotossíntese e crescimento, freqüentemente associados a alterações no metabolismo do carbono e nitrogênio. A nível molecular, os efeitos negativos são associados a danos celulares produzidos por estresse oxidativo, devido a uma deficiência dos sistemas de dissipação de energia, uma consequência das limitações impostas pela seca ao aparato fotossintético (Loggini et al., 1999). Dessa maneira, danos oxidativos a moléculas importantes são o resultado de um balanço negativo entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e defesas antioxidantes da planta (Iturbe-Ormaetxe et al., 1998).

Durante o déficit hídrico uma das várias estratégias vegetais que podem aumentar a tolerância a este estresse é o acúmulo de osmólitos de baixo peso molecular como açúcares álcoois, alguns aminoácidos especiais e Gly-betaína. Outra estratégia é a ativação de um grande grupo de genes que leva ao acúmulo de novas proteínas nos tecidos vegetais, como é o caso da família de genes que codifica proteínas abundantes de embriogênese tardia (LEA). Em todas as angiospermas, proteínas LEA são altamente expressas durante a maturação do embrião e, freqüentemente, em plântulas desidratadas. Essas proteínas têm caráter hidrofílico podendo ter alguma correlação com uma tolerância à dessecação. Enquanto que LEA mRNAs e suas correspondentes proteínas são normalmente encontradas em tecidos vegetativos ou imaturos, o acúmulo de alguns desses produtos pode ser induzido em resposta ao estresse osmótico (Curry



& Walker-Simmons, 1993; Ried & Walker-Simmons, 1993; Xu et al., 1996; Swire-Clark & Marcotte, 1999).

Ainda que existam poucos dados relacionando NO como potencial mediador da tolerância à seca, alguns estudos recentes mostram que sua aplicação exógena sobre folhas destacadas submetidas a curtos períodos de seca (até 3h), foi responsável por uma diminuição na perda de água pelas mesmas em função da diminuição da abertura estomática (Mata & Lamattina, 2001). Esses estudos foram possíveis por meio de técnicas de microscopia de fluorescência, que permitiram a visualização intracelular do NO (Magalhaes et al., 2000). Esse mesmo estudo mostrou uma maior concentração de NO nas células guarda, bem como um efeito redutivo na emissão de NO por plantas submetidas a estresse hídrico, sugerindo mais uma vez, uma participação desse composto como um potencial atenuador dos danos inerentes ao déficit hídrico em vegetais.

## **Objetivos Gerais**

O estudo do possível envolvimento do NO na resposta ao déficit hídrico utilizando o caupi (*Vigna unguiculata*) cultivar Epace10, e o feijão (*Phaseolus vulgaris*) cultivar Pérola, respectivamente tolerante e sensível à seca.

## **Objetivos Específicos**

Avaliar no material genético tolerante (*V. unguiculata*) e sensível (*P. vulgaris*) e sob condições de déficit hídrico moderado e severo e aplicação exógena de NO os seguintes parâmetros fisiológicos:

- 1- variações na condutância estomática (GS)
- 2- variações na eficiência fotossintética por meio da fluorescência da clorofila *a*
- 3- variações no conteúdo relativo em água (CRA)
- 4- tolerância protoplasmática e possível ajustamento osmótico
- 5- testes de germinação de sementes sob déficit hídrico

## **2 - Revisão de literatura**

### **2.1 - Óxido nítrico**

#### **2.1.1 - Síntese e principais funções**

O óxido nítrico é um radical livre gasoso que reage rapidamente com outros átomos ou moléculas que contêm elétrons não pareados. Possui meia vida curta, de aproximadamente 10 segundos na presença de oxigênio (Lancaster Jr., 1992; MeBmer et al., 1994). É produzido como poluente resultante de atividade industrial tendo um papel fundamental na organização dos gases atmosféricos. A oxidação do NO por radicais de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) leva à formação dos radicais hidroxila (OH), dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) e a produção fotoquímica de ozônio ( $O_3$ ) na troposfera (Wildt et al. 1997).

O NO é também produzido por vários organismos vivos, incluindo bactérias, fungos, plantas e animais (Ninnemann & Maier, 1996). Devido ao crescente interesse nas funções do NO na fisiologia animal, este radical livre tem despertado grande atenção como composto sinalizador no desenvolvimento de plantas bem como nas interações planta-patógeno. Por ser extremamente lipofílico, o NO difunde-se rapidamente através da matriz lipídica das membranas (Leshem et al., 1997). Aparentemente, uma de suas principais funções na célula é a ativação da enzima guanilato ciclase, responsável pela conversão de GTP, resultando em um mensageiro secundário, a guanosina monofosfato cíclica (cGMP) (Moncada, 1998).

Embora Klepper (1975) tenha relatado a produção de óxidos de nitrogênio ( $NO_x$ ) por vegetais, os estudos sobre a produção e função do NO em plantas ainda são relativamente escassos, limitando-se principalmente às suas origens e papéis primários em cadeias de sinalização (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Magalhaes et al., 1999, 2000, 2005). Apesar disso, o envolvimento do NO como molécula sinalizadora para o desenvolvimento de plantas e para as interações planta-patógeno surgiu em 1998, causando grande impulso para as pesquisas com plantas. A elucidação do papel do NO em plantas em condições de estresse requer conhecimento detalhado dos processos potencialmente envolvidos na sua síntese e sua regulação.

Em animais, o NO é sintetizado a partir da L-arginina através de uma oxidação complexa catalisada pela NOS (Ignarro, 1996). A enzima NOS catalisa a oxidação da L-arginina a NO e L-citrulina dependente de oxigênio e NADPH. Esta reação é dependente de, no mínimo, seis cofatores incluindo NADPH, FAD, FMN, tetrahidro-L-biopterina (H<sub>4</sub>BPT), heme, cálcio e calmodulina. Em células de mamíferos, várias isoenzimas NOS foram isoladas, purificadas, clonadas, e seqüenciadas (Moncada, 1998). De maneira geral, as isoenzimas da NOS são formadas por proteínas altamente conservadas (Li et al., 2004). Vale destacar que existem diferentes reações possíveis para produção de NO *in vivo* independente da NOS. Estas reações incluem: (1) a redução ácida do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO; (2) a reação entre arginina e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formar NO; (3) a redução do NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO pela xantina oxidase (XO) em condições de anóxia e (4) a redução de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> a NO catalisada pela nitrito redutase (NiR) microbiana, (Zhang et al. 1998). Em vegetais, o NO pode também ser produzido nos cloroplastos através da conversão transmembrana de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Durner et al., 1998).

Em plantas foram descritas atividades enzimáticas semelhantes a da NOS animal (Ribeiro et al., 1999). Por outro lado, é conhecido que plantas adubadas com NO<sub>3</sub><sup>-</sup> podem gerar NO como um subproduto da assimilação de nitrogênio pela atividade da enzima nitrato redutase (NR), (NAD(P)H-NR). Inicialmente este mecanismo parecia ser restrito a NR constitutiva (Dean & Harper, 1988, Klepper, 1990). Atualmente existem evidências que a NR induzida também pode produzir NO (Yamasaki et al., 1999; Magalhaes et al., 2000; Rockel et al., 2002). Recentemente foi indicada uma via de produção de NO que se baseia não na atividade da NR, mas em um transporte de elétrons pela cadeia respiratória mitocondrial (Modolo et al. 2005).

### **2.1.2 – Formas químicas**

As transformações químicas envolvendo o NO, relacionam-se à disposição de formas redoxes inter-relacionadas: cátions de nitrosônio (NO<sup>+</sup>), óxido nítrico (NO<sup>•</sup>) e, ânion de nitroxyl (NO<sup>-</sup>). Estes arranjos são remanescentes das formas redoxes de dióxigênio e oxigênio singlete: <sup>-</sup>O<sub>2</sub>, O<sup>•</sup> e O<sub>2</sub><sup>2-</sup>.

Os compostos nitrosos são amplamente estudados na busca de se estabelecer critérios para as propriedades e reatividades químicas de  $\text{NO}^+$ ,  $\text{NO}^\bullet$  e  $\text{NO}^-$ . O nitroprussiato tem um caráter  $\text{NO}^+$  embora, sob condições fisiológicas, o  $\text{NO}$  possa sofrer interconversões em diferentes formas redoxes com características químicas distintas. A forma neutra,  $\text{NO}^\bullet$ , tem um único elétron em seu orbital  $2p^1$ . Sua neutralidade facilita sua livre difusão em meio aquoso e através de membranas biológicas. Assume-se que a meia-vida biológica do  $\text{NO}^\bullet$  esteja na ordem de grandeza dos segundos, dependendo criticamente da sua concentração inicial (Stanler et al., 1992).

### **2.1.3 – Interações fisiológicas associadas à emissão de NO**

Fatores ambientais indutores de estresses como ataque de patógenos, perturbações mecânicas, seca, alagamento, resfriamento, congelamento, excesso de sais, metais pesados, ozônio, correntes elétricas e certos herbicidas, induzem a produção de etileno (Kacperska, 1997), sendo que este está intimamente relacionado ao  $\text{NO}$  como molécula sinalizadora em plantas (Magalhaes et al., 2000).

A emissão de  $\text{NO}$  varia com o estágio de desenvolvimento da planta, intensidade luminosa e diferentes estresses. Uma tendência inversa para  $\text{NO}$  e emissão de etileno foi observada na fase da floração até o início da senescência (Magalhaes et al., 2000). Quando as plantas entram em senescência, a emissão de  $\text{NO}$  diminui. A relação inversa entre a emissão de etileno e  $\text{NO}$  sugere a interação entre duas vias de síntese.

Seca e alagamento reduzem drasticamente a emissão de  $\text{NO}$  (Magalhaes et al., 2000). No entanto, anóxia em curto prazo ativa a NR, levando ao acúmulo de  $\text{NO}_2^-$  e altas taxas de emissão  $\text{NO}$  pelas folhas e raízes (Rockel et al., 2002). Uma queda da atividade da NR também foi observada em condições de estresse provocado pela seca (Garg et al., 1998).

Também podemos atribuir a diminuição da emissão de  $\text{NO}$  ao declínio da atividade da NR com a idade da planta (Anburaj & Francis, 1996, Lee et al., 1998, Yu et al., 1998). A NR em alface mostrou pico de atividade 20 dias após o plantio

(Lee et al., 1998), uma maneira similar à emissão de NO observada por Magalhaes et al., (2000).

A NR é uma enzima altamente regulada. Tem uma meia vida curta de algumas horas e sua indução requer  $\text{NO}_3^-$  e luz (fotossíntese). A atividade da enzima pode ser diminuída em minutos por fosforilação de um resíduo de serina conservado na região 1, e subsequente ligação de uma proteína 14-3-3, que inativa a enzima. A fosforilação e inibição dependem da presença de cátions bivalentes. Se houver desfosforilação a enzima volta a sua atividade normal. A degradação proteolítica da NR é acelerada quando a enzima está ligada à proteína 14-3-3 (Magalhaes et al., 2005). *In vitro*, a NR é inativada por incubação com MgATP, eventualmente na presença de inibidores de proteína fosfatase 2A (PP2A) que impedem a desfosforilação. A pré-incubação com ATP também diminui a produção de NO dependente de  $\text{NO}_2^-$ , enquanto a reativação por desfosforilação aumenta a produção de NO (Rockel et al., 2002).

Luz e altos níveis de  $\text{CO}_2$  ativam a NR, o que também leva a altas taxas de emissão de NO. Os tratamentos artificiais de conhecidos ativadores da NR no escuro (período em que a enzima encontra-se freqüentemente inativa) levam a alta emissão de NO (também baixa no escuro). Ao lado da anóxia, essas condições podem produzir desacopladores de análogos de 5'-AMP (5-aminoimidazol-4-carboxiamida-1- $\beta$ -ribofuranosil 5'-monofosfato). Se a ativação da NR é impedida pelo ácido okadaico, um inibidor de fosfatases, a emissão de NO é bloqueada (Rockel et al. 2002). Estes resultados indicam que a modulação da NR *in vivo* também modula a emissão de NO.

Em interações planta-patógeno, uma das primeiras respostas após a inoculação do hospedeiro é a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Os radicais superóxido e peróxido de hidrogênio reagem rapidamente com o NO levando, em parte, à formação do peroxonitrito; composto extremamente tóxico que desencadeia a nitração de aminoácidos aromáticos como a tirosina. A NR também é capaz de catalisar em baixas taxas, a redução de oxigênio molecular a superóxido (Yamasaki, 2000). No entanto, a produção simultânea de superóxido e NO leva, inevitavelmente, à formação de peroxonitrito. Mutantes de tabaco sem nitrito redutase (NiR), mas com NR normal acumulam nitrito, emitem altas

quantidades de NO e têm um alto grau de nitração da tirosina (Morot-Gaudry-Talarmain et al., 2002).

## **2.2 - Défice hídrico em plantas: Efeitos fisiológicos**

Os efeitos fisiológicos causados pela deficiência hídrica em vegetais são diretamente proporcionais à duração, intensidade e fase ontogenética de sua ocorrência. Nos ambientes naturais, essa deficiência é gradual afetando primeiro os processos mais sensíveis seguindo para os mais resistentes. Em conjunto, a desorganização desses pode determinar o fim do crescimento vegetal (White, 1988).

Há, no entanto, mecanismos diferentes de resposta dos vegetais aos fatores físicos do meio ambiente. Entre eles destacam-se entre outros: acúmulo de solutos em células vegetais (Feng et al., 1994); encurtamento do ciclo de vida (Bergamaschi et al., 1988); evitamento e tolerância através do controle da abertura estomática (Chaves, 1991).

O estresse hídrico afeta o metabolismo hormonal, especialmente ácido abscísico e citocinina, grandes reguladores das respostas vegetais à deficiência hídrica. Com a ocorrência do estresse, a atividade da citocinina diminui enquanto a do ABA aumenta. Esse aumento é responsável pela redução na abertura estomática; os efeitos da citocinina realizam o oposto (Livne & Vaadia, 1972). Por essas razões é que se atribui ao ABA ser o fator inicial das respostas adaptativas dos vegetais ao estresse hídrico e outros tipos de estresse, uma vez este se acumula em folhas de todas as espécies vegetais, independente do tipo de estresse sofrido (Daie & Campbell, 1981).

Embora seja conhecido o efeito do aumento da concentração de ABA sobre o fechamento estomático em decorrência do estresse hídrico, essa influência é dependente da ação do ABA apoplástico sobre a plasmalema (Hornberg & Weiler, 1984). O fechamento estomático provocado pela deficiência hídrica foi primeiramente mostrado por Stalfelt (1955), como associado à diminuição nas concentrações de solutos no interior das células guarda. Em trabalhos com *Vicia faba*, Hsiao (1973) mostrou que a perda de íons  $K^+$  dessas células coincidiu com o rápido fechamento estomático.

Alguns outros efeitos do ABA frente a diferentes tipos de estresse incluem: aumento da condutividade hidráulica em raízes de girassol submetidas ao frio (Ludewig et al., 1988); redução dos efeitos do estresse hídrico durante o frio, ocasionado pelo fechamento estomático e, aumento da resistência estomática foliar em *P. vulgaris* (Pardossi et al., 1992). Embora seja notória a redução nas taxas de crescimento provocadas pelo fechamento estomático, Makeev et al., (1992), acreditam que possa haver algum mecanismo adicional ao ABA na inibição da fotossíntese além do fechamento estomático.

### **2.2.1 – Mecanismos celulares de tolerância à seca**

As habilidades das células vegetais em manter seu metabolismo sob baixas concentrações de água são denominadas tolerância (Subbarao et al., 1995). Dentre estas, a última linha de defesa da planta contra o déficit hídrico é o protoplasma tolerante à seca (Turner & Jones, 1980). A desidratação pode levar a uma irreversível desorganização metabólico-celular, embora algumas reações fotossintéticas possam ocorrer sob condições de severo estresse hídrico em alguns vegetais mais primitivos (Santarius, 1967).

A tolerância à desidratação depende diretamente da habilidade das células em manter a integridade de suas membranas impedindo a desnaturação de proteínas em condições de déficit hídrico (Gaff, 1980). Alguns solutos como açúcares, aminoácidos como prolina, polióis e, compostos quaternários derivados da amônia como glicina e betaína, protegem as membranas e enzimas dos danos induzidos pela desidratação (Hsiao et al., 1984). Algumas gramíneas que apresentam maior tolerância à seca mantêm maiores teores de açúcares e íons inorgânicos solúveis, do que plantas não tolerantes à desidratação (Schwab & Gaff, 1986). A manutenção da integridade nuclear também é importante para a tolerância à desidratação implicando que, a sobrevivência em condições de estresse hídrico severo, é dependente de mecanismos eficientes de reparo e reconstrução de organelas celulares (Boyer, 1983). Isso foi mostrado por Boyer (1983) ao fazer experimentos com algumas plantas nativas da África. Ao serem submetidas à desidratação, seus núcleos permaneciam intactos contrastando com

diversas plantas menos tolerantes cujos núcleos se desintegram durante a implantação de estresses mais severos.

### **2.2.2 – Tolerância Protoplasmática**

Um déficit hídrico moderado, que provoque redução na turgescência da planta, ou perda de 10 a 15% do seu conteúdo em água induz, em primeiro lugar, uma redução ou inibição do crescimento e do metabolismo, mas, raramente resulta na morte da planta – a menos que estas condições tenham permanência por período prolongado de tempo (Mullet & Whitsitt, 1996). Uma vez que membranas celulares têm um papel fundamental na realização das atividades metabólicas da célula, qualquer dano à sua estrutura é prejudicial ao funcionamento celular e, conseqüentemente, à sobrevivência vegetal. A base metabólica da tolerância à desidratação celular reside na capacidade do funcionamento dos mecanismos que protegem as membranas e a integridade nuclear (Ferrari-Iliou et al., 1984, Boyer, 1983) prevenindo a desnaturação de proteínas (Gaff, 1980). É sabido que solutos compatíveis com as “oses” (trealose e sacarose), aminoácidos (prolina), e compostos quaternários de nitrogênio (glicina e betaína), protegem as membranas e suas enzimas dos danos provocados pela desidratação (Stewart, 1972; Rena & Masciotti, 1976; Machado et al., 1976; Mullet e Whitsitt, 1996). Além disso, o prolina poderia atuar como fonte de energia e nitrogênio no período imediatamente pós-estresse (Singh et al., 1973). Algumas proteínas específicas também podem se acumular nas células durante a desidratação, estas são geralmente altamente hidrofóbicas (dehidrinas ou LEA (late embryogenesis abundant)) (Dure, 1993; Close, 1997), o que permite a retenção de água, o seqüestro de íons e a manutenção da estrutura protéica membranar (Bray, 1997).

Um mínimo de 28 a 30% de água é exigido dentro da célula para manutenção da integridade estrutural da membrana (Blum, 1988). A danificação das membranas pode se traduzir em uma modificação da sua permeabilidade seletiva e, como conseqüência, perda do conteúdo celular. A plasmalema e a membrana cloroplastídica são as componentes mais atingidas pela desidratação (Pham Thi et al., 1987). Modificações na composição lipídica membranar, além de alterar sua permeabilidade, afetam sua capacidade de tradução de energia bem



como a atividade das enzimas associadas às mesmas (Meyer et al., 1992), o que acaba por alterar a atividade metabólica celular. A capacidade de sobrevivência e de recuperação após uma fase de déficit hídrico implica na manutenção da integridade estrutural e metabólica das células e, em particular, a integridade da membrana (Bewley, 1979). Como consequência, a preservação da compartimentalização celular é altamente associada às mudanças quantitativas e qualitativas que podem se produzir nas classes de lipídios membranares (Leshem, 1992).

Uma maneira interessante de manter a turgescência durante um período de estresse é através do ajustamento osmótico (AO). Este pode ser definido como um acúmulo ativo de solutos no tecido vegetal (seja caule, folha ou raiz), em resposta às reduções nos valores de potencial hídrico do solo ( $\Psi_w$ ) (Morgan, 1984), sendo que a natureza química desses solutos varia entre grupos taxonômicos. Esse tipo de estratégia leva a uma redução no potencial osmótico ( $\Psi_\pi$ ), permitindo que a planta extraia água de solos com potenciais mais reduzidos. O AO tem papel importante por (1) manter o turgor durante flutuações no  $\Psi_w$  do solo, (2) manter a condutância estomática ( $G_s$ ) e, conseqüentemente a fotossíntese, (3) manter o crescimento, (4) aumentar a tolerância à desidratação e (5) aumentar a extração de água do solo (Turner & Jones, 1980; Wright et al., 1983; Ludlow, 1987; França et al., 2000).

### **2.2.3 – Efeito do déficit hídrico sobre a fotossíntese**

Embora o déficit hídrico seja responsável por reduções significativas nas taxas fotossintéticas, Smirnoff (1993) mostrou que em estresses suaves – onde o conteúdo relativo em água permanece acima de 75% – a absorção de  $CO_2$  é limitada apenas pelo fechamento estomático. Já em estresses mais severos, essa absorção, além de ser limitada pelo fechamento estomático, o é também pela excessiva exposição dos cloroplastos a elevadas energias de excitação (Daniel, 1997). O excesso de energia passa então a ser dissipado por uma série de mecanismos protetores como: dissipação de calor via carotenóides; fotorrespiração elevada; movimento foliar, mecanismos CAM de fixação de carbono e caracteres morfológicos que minimizem a absorção de radiação luminosa. Em casos onde a

energia de excitação eletrônica é muito maior que a capacidade da planta em dissipá-la e/ou aproveitá-la, há uma tendência para a formação de reativos de oxigênio (peróxidos) no interior dos cloroplastos. O excessivo aumento de peróxidos no interior das células acaba por destruir diversas enzimas antioxidantes de função protetora levando, por fim, à morte da planta (Smirnoff, 1993).

Outro importante fator derivado do fechamento estomático é a fotoinibição dos fotossistemas. Alguns trabalhos como o de Eickmeier et al., (1993) relacionam a fotoinibição a intensidades elevadas de radiação luminosa. No entanto, Casper et al., (1993) sugerem que, em condições de deficiência hídrica, níveis baixos de luz ( $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) podem ser excessivos em virtude da não fixação de  $\text{CO}_2$ .

Existem trabalhos que mostram diferenças nas respostas estomáticas em diversas espécies submetidas a déficit hídrico. Sharkey & Seemann (1989), submetendo plantas de feijoeiro ao déficit hídrico observaram comportamento estomático diferenciado em diversas porções da folha. Enquanto algumas partes permaneceram fotossinteticamente ativas, outras mantiveram os estômatos fechados. No entanto, Gunasekera & Berkowitz (1992), trabalhando com plantas de espinafre e trigo, observaram um fechamento completo e homogêneo dos estômatos quando as plantas atingiram  $\psi_w$  de  $-1,5$  e  $-2,3$  MPa respectivamente, indicando que o fechamento estomático heterogêneo não é um comportamento universal como até então se acreditava.

Posteriormente, Dai et al., (1992) verificaram que os estômatos podem ter fechamento não uniforme até mesmo em plantas irrigadas como consequência de déficit de pressão de vapor elevado, causando superestimativas nos cálculos de  $\text{CO}_2$  interno. Ainda que existam diferenças quanto à sensibilidade estomática, seu papel como regulador dos processos de fotossíntese e transpiração é evidente. No desenvolvimento do déficit hídrico, há um aumento do ponto de compensação de  $\text{CO}_2$  levando a um aumento nas concentrações internas do mesmo. Esses aumentos podem influenciar um sistema químico de “feedback” de ABA levando, por fim, ao fechamento estomático. (Meidner & Mansfield, 1968).

#### **2.2.4 – Efeito do déficit hídrico sobre a germinação de sementes**

A água é o fator mais determinante sobre o processo de germinação de sementes (Carvalho & Nakagawa, 1983), devendo estar disponível para as sementes numa quantidade adequada durante o processo germinativo. Para o estabelecimento de plântulas no campo, tanto o excesso como déficit hídrico são desfavoráveis (Bradford, 1986). O excesso ou falta de água, representam situações em que os problemas fitopatológicos podem se agravar nas sementes em germinação. No primeiro caso, a embebição, rápida e em excesso, reduz o período disponível para que as membranas celulares se reorganizem e, como consequência, há uma expressiva liberação de solutos que passam a agir como substrato para os microorganismos presentes no ambiente (Peske & Delouche, 1985); no segundo caso, o retardamento da germinação e da emergência da radícula, proporcionam uma ampliação do tempo de exposição à potenciais patógenos (Marcos Filho, 1986), acarretando prejuízos ao desempenho das sementes (Hunter & Erikson, 1952).

Os efeitos da disponibilidade hídrica se prolongam ainda após a emergência do eixo embrionário, com reflexos no desenvolvimento da planta. De maneira geral, a deficiência hídrica promove danos tanto à raiz quanto à parte aérea (Young et al., 1983; Silva, 1989). Por outro lado, o excesso hídrico também é prejudicial à germinação por restringir o oxigênio – causando estresse por etileno – ou por causar danos embrionários provocados pela embebição demasiadamente rápida (Peske & Delouche, 1985). A expressão desses prejuízos é revelada por um retardamento do desenvolvimento radicular (Grabe & Danielson, 1965), e elevação da incidência de microorganismos nas sementes em germinação (Norton, 1986).

### **3 - Material e métodos**

#### **3.1 - Material vegetal e condições de crescimento**

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) variedade Pérola e caupi (*Vigna unguiculata*) variedade Epace 10, respectivamente sensível e tolerante à seca, cedidas pela EMBRAPA (CNPAP – Centro Nacional de Pesquisa em Arroz e Feijão

e CNPMN – Centro Nacional de Pesquisa do Meio Norte, respectivamente), foram postas para germinar em mistura areia:vermiculita (1:1, v/v) sob condições de casa de vegetação.

Após quatro dias da germinação, três plântulas foram transferidas para potes com capacidade de 1L contendo a mistura areia/vermiculita e irrigadas, com solução nutritiva de Hoagland, até o aparecimento do terceiro trifólio (25 dias). Após esse período, os grupos foram divididos pelos seguintes tratamentos: (1) plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* irrigadas diariamente – grupo controle –; (2) plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* submetidas ao déficit hídrico por suspensão da irrigação; (3) plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* irrigadas diariamente e que receberam pulverização com NO e (4) plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* que receberam NO submetidas ao déficit hídrico por suspensão da irrigação. O déficit hídrico por suspensão da irrigação foi mantido até a morte dos indivíduos avaliados.

Todos os tratamentos foram mantidos, durante o experimento, em ambiente coberto -  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Os experimentos foram conduzidos entre Dezembro e Janeiro de 2005-2006. As temperaturas médias na área de cultivo foram de  $26 \pm 3,0$  °C com média de  $65 \pm 5\%$  de umidade relativa do ar.

### **3.2 - Tratamentos com óxido nítrico**

Nitroprussiato de sódio (SNP), um sal com alta solubilidade em água foi utilizado como doador de NO. Após solubilização, este sal apresenta uma liberação gradual de NO com um pico de liberação 2h após sua dissolução. A liberação de NO declina gradativamente cessando 4 a 5h após seu início (Magalhaes et al., 2005).

Soluções de SNP nas concentrações de  $10^{-3}\text{M}$  e  $10^{-4}\text{M}$  foram utilizadas nos seguintes processos: (1) aspersão (1 ao dia) da solução na concentração de  $10^{-4}\text{M}$ , 1h 30' a 2h após seu preparo, sobre as plantas estudadas com auxílio de um aspersor farmacêutico padrão e (2) embebição de sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* em soluções de SNP nas concentrações de  $10^{-3}\text{M}$  e  $10^{-4}\text{M}$ , para posterior análise quantitativa da germinação.

### 3.3 – Germinação de sementes

Experimentos de germinação de sementes foram realizados para se avaliar o efeito do NO em situações de déficit hídrico. Para a indução do déficit hídrico, utilizou-se de solução de polietilenoglicol (PEG-6000), preparada para imposição de um potencial osmótico ( $\Psi\pi$ ) de -0,6MPa (a escolha desse potencial foi baseada em estudo prévio com as mesmas espécies).

Grupos de 100 sementes em 04 repetições de 25 sementes cada, para *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, foram divididos pelos seguintes tratamentos: (1) sementes embebidas em água; (2) sementes embebidas em PEG -0,6MPa; (3) sementes embebidas em SNP  $10^{-4}$ M; (4) sementes embebidas em SNP  $10^{-3}$ M; (5) sementes embebidas em SNP  $10^{-4}$ M + PEG -0,6MPa e (6) sementes embebidas em SNP  $10^{-3}$ M + PEG -0,6MPa.

A embebição das sementes foi realizada por um período de 24h. Em seguida, as sementes foram transferidas para caixas de germinação, tipo “gerbox”, contendo três camadas de papel filtro umedecidos com as respectivas soluções e então transferidas para câmara de germinação a 25°C. O processo da germinação foi considerado efetivado por meio da protusão da radícula. Sementes germinadas foram descartadas e o experimento mantido por 120h.

### 3.4 - Condutância estomática

Avaliações da condutância estomática (Gs) foram realizadas na face abaxial de trifólios adultos de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* submetidos aos tratamentos descritos no item 3.1. As medidas foram realizadas sempre na parte da manhã entre 9:00 e 10:00h, durante todo o período experimental com o auxílio de um porômetro AP4 ( $\Delta T$  Devices, Cambridge, Inglaterra).

### 3.5 - Eficiência fotossintética

Avaliações da eficiência fotossintética foram realizadas por meio da fluorescência da clorofila *a*. As medidas foram tomadas diariamente, no escuro e no claro, durante todo o experimento, em 04 plantas de cada tratamento. Foi

utilizado um medidor de fluorescência modulada (MINI PAM photosynthesis yield analyser, Walz Mess und Regeltechnik). Para as medidas realizadas no escuro, as plantas foram aclimatadas por período mínimo de 30 minutos antes da realização das mesmas.

Além das medidas de fluorescência imediata e valores máximos de fluorescência (FMax) determinou-se, a cada dois dias contados do terceiro dia de experimento (tempo 1; 2; 3 e 4 correspondentes aos 3<sup>o</sup>; 5<sup>o</sup>; 7<sup>o</sup> e 9<sup>o</sup> dias de experimento, respectivamente), a performance fotossintética em função de níveis crescentes de luz (ETR). Níveis crescentes de luz foram aplicados às folhas de plantas submetidas aos tratamentos propostos durante 04 minutos, em oito estádios de 30 segundos cada. Ao final de cada estádio, um pulso saturante de luz (6000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) foi aplicado para determinação dos parâmetros de fluorescência.

A performance fotossintética também foi analisada em segmentos destacados de plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* submetidas a choque hídrico em solução de PEG-6000 com e sem adição de NO. Item 3.7.3.

### **3.6 - Conteúdo relativo de água**

Medidas de conteúdo relativo de água (CRA) foram tomadas diariamente pela manhã, ao longo do experimento, em plantas de cada um dos tratamentos. Discos foliares de 0,4cm de diâmetro foram retirados da porção média das folhas dos cultivares selecionados, e pesados em balança de precisão. Em seguida, colocados em placas de Petri contendo água destilada suficiente para cobri-los, e armazenados a 4°C por período mínimo de 24h, para serem novamente pesados. Logo após, colocados em estufa de circulação forçada de ar a 70°C também por período mínimo de 24h, para serem pesados pela última vez. Dessa maneira foram determinados respectivamente, os pesos das massas fresca, túrgida e seca dos discos foliares. O CRA foi dado em porcentagem segundo a expressão:

$$\text{CRA} = (\text{PF} - \text{PS})/(\text{PT} - \text{PS}) \times 100$$

Onde PF é o peso da massa fresca dos discos foliares, PT o peso da massa túrgida e PS o peso da massa seca.

### **3.7 – Tolerância Protoplasmática**

#### **3.7.1 - Ensaio de tempo de lavagem**

Um ensaio para avaliação da fuga de eletrólitos (FE) foi efetuado para estimativa do tempo de lavagem dos discos de folíolos de plantas adultas de feijão (*Phaseolus vulgaris*) variedade Pérola e caupi (*Vigna unguiculata*) variedade Epace 10 necessário para a avaliação da tolerância protoplasmática em condições de déficit hídrico. Sementes de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* foram colocadas em recipientes do tipo “gerbox” com papel filtro no fundo e embebidas em água deionizada para pré-germinação. Após a emissão da radícula as sementes foram transferidas para bandejas plásticas em substrato contendo vermiculita e areia 1:1 e irrigadas sempre que necessário. Vinte dias após a emergência das plantas (DAE) realizou-se uma adubação com solução de Uréia e fosfato de potássio na concentração de 2mM repetida 15 dias após (35 DAE). Aos 48 DAE foram coletados 17 discos foliares de 1cm de diâmetro de diferentes folíolos superiores adultos de plantas. Desses foi tomada a massa fresca e em seguida, os mesmos foram acondicionados em tubos do tipo Falcon de 50mL e em cada um deles foi acrescentado 20mL de água deionizada sendo em seguida medida a condutividade elétrica ( $EC_0$ ) através do condutímetro (Digimed DM-3 - Digicron Analítica LTDA). A fuga de eletrólitos foi determinada da seguinte forma:  $FE = (EC_{15} - EC_0) / pf$  onde  $EC_0$  e  $EC_{15}$  representam, respectivamente, a EC inicial (tempo 0) e a EC após 15 minutos de lavagem. O mesmo ensaio de lavagem foi realizado com 20mL de solução de nitroprussiato de sódio (SNP) na concentração  $10^{-4}M$ , preparado com 1 hora de antecedência, em substituição a água deionizada. O experimento foi realizado em laboratório com ambiente aos 20°C a fim de evitar interferência das variações de temperatura e 04 repetições por análise foram feitas. Foram realizadas lavagens até os 90 minutos decorridos da  $EC_0$ .

### 3.7.2 – Índice de dano membranar

Após a determinação do melhor tempo de lavagem dos discos foliares, realizou-se um ensaio para determinar a capacidade de tolerância ao déficit hídrico (índice de dano membranar) do *P. vulgaris* e *V. unguiculata* na presença de NO. As plantas utilizadas neste ensaio foram cultivadas como descrito no item 3.7.1. Obteve-se 17 discos foliares de 1cm de diâmetro de diferentes folíolos superiores adultos de plantas que foram acondicionados em tubos Falcon de 50mL, acrescentou-se 20mL de água deionizada e foram submetidas ao tempo de lavagem determinado no ensaio anterior (15 minutos) em agitador orbital do tipo “shaker” a 100 rpm. Após a lavagem, retirou-se a água da lavagem dos discos com uso de uma peneira e os discos foram retornados aos tubos Falcon onde se adicionou 20mL de soluções de polietilenoglicol 6000 (PEG-6000) nas seguintes concentrações (M): 0,0 (água deionizada); 0,0248; 0,0372 e 0,0495 equivalentes a um potencial osmótico (MPa) de 0; -0,3; -0,9 e -1,8. Os cálculos para a concentração de PEG-6000 foram realizados de acordo com Mooney (1989). Para este trabalho, além de pulverizar as plantas 15 minutos antes da coleta dos discos como descrito anteriormente, acrescentou-se SNP nas soluções de PEG-6000, para obtenção de uma concentração final de  $10^{-4}$ M. Após acrescentar as diferentes soluções, os tubos foram colocados sob ausência de luz a uma temperatura de 20°C por um período de 15 horas seguindo o mesmo procedimento de Bajji et al. (2001). Ao fim das 15 horas em contato com a solução de PEG, os discos foram retirados e lavados com água destilada corrente por 20 segundos em peneira de plástico e colocados em tubos de vidro com fundo cônico com 6mL de água deionizada. Foi realizada a medição de EC logo que os discos foram colocados nos tubos ( $EC_i$ ) e após 0,5; 1,5; 3,5; 7,5 e 22,5 horas de rehidratação. Depois de 22,5 horas de rehidratação, os discos foram autoclavados em panela de pressão por 30 minutos, quando foram retirados e colocados a temperatura ambiente até que chegassem aos 20°C para a medição da EC dos tubos após a autoclavagem ( $EC_f$ ). O ensaio contou com 8 tratamentos (sendo 4 concentrações de PEG 6000 e a presença ou ausência de SNP), 2 cultivares e 4 repetições, totalizando 64 amostras.

O índice de dano membranar (IDM) foi calculado da seguinte forma:



$$\text{IDM} = [(\text{EC}_f - \text{EC}_i) / (\text{EC}_t - \text{EC}_i)] * 100$$

### **3.7.3 - Eficiência fotossintética em discos foliares**

Para avaliação da eficiência fotossintética, foram coletados segmentos (1,5 x 2,5cm) dos folíolos superiores adultos de plantas de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* cultivados como descrito no item 3.7.1. As plantas utilizadas para o tratamento com NO foram pulverizadas com SNP a 10<sup>-4</sup>M, seguindo o mesmo procedimento seguido no item 3.7.2. Este tecido foi colocado em placas de petri (4 segmentos por placa) e embebidas em 20mL das soluções de PEG-6000 com e sem SNP, nos potenciais hídricos ( $\Psi_w$ ) de 0; -0,6; -1,2MPa para *P. vulgaris* e 0; -0,9; -1,8 MPa para *V. unguiculata*, e mantidas sob ausência de luz por 15 horas. Após esse período, os segmentos foram lavados em água destilada corrente por 20 segundos com auxílio de peneira plástica e colocadas novamente nas placas de petri, desta vez com 20mL de água deionizada para rehidratação durante três horas sob baixas intensidades de luz. Decorridas três horas de rehidratação nas condições citadas, as placas foram colocadas em ambiente aberto por mais uma hora. Depois das quatro horas em água deionizada, avaliou-se a eficiência fotossintética da clorofila *a* conforme descrito no item 3.5.

### **3.8 – Tratamento estatístico**

Os dados primários, após verificação de distribuição normal e variância homocedástica, foram submetidos à análise estatística de variância (ANOVA) para cada parâmetro estudado. Médias foram comparadas através de testes *t Student* e de *Tukey*. Todas as análises estatísticas foram efetuadas pelo programa Systat 8.0 (1998) e figuras foram criadas através do programa GraphPad Prism 2.0 (1995).

## 4 - Resultados

### 4.1 – Efeito do déficit hídrico

Ao longo do estabelecimento do déficit hídrico, as plantas submetidas ao estresse hídrico apresentaram características morfológicas de murcha e queda de folhas, sintomas comuns de plantas sob este tipo de restrição.

A suspensão da irrigação pelo período proposto (10 dias) levou a um severo estresse hídrico o que provocou a morte das plantas avaliadas ao final do período de estudo. As plantas de *P. vulgaris* que não receberam aplicação exógena de NO apresentaram morte fisiológica anterior (8º dia) aos demais grupos sendo seguido pelas plantas de *V. unguiculata* (9º dia) sob ausência de NO. As plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* sob déficit hídrico e que receberam solução de SNP mantiveram-se vivas por um período maior (10º dia).

### 4.2 – Germinação de sementes

A embebição de sementes em soluções de SNP nas concentrações utilizadas ( $10^{-3}M$  e  $10^{-4}M$ ) aumentou a porcentagem de germinação das sementes quando associadas à solução de PEG -0,6MPa, embora tenha apresentado valores significativamente menores que a do controle em sua ausência (Tabela 1).

Sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* apresentaram porcentagens de germinação elevadas (aproximadamente 80% após 120h) com períodos de germinação aproximados. Quando embebidas em solução de SNP  $10^{-3}M$  e  $10^{-4}M$ , as taxas de germinação ao final do experimento caíram para aproximadamente 70%, sem influência nos períodos de germinação.

As associações de SNP + PEG embora não tenham se mostrado tão eficientes para a germinação das sementes, apresentando taxas de germinação de 37% para *P. vulgaris* e 50% para *V. unguiculata*, foram significativamente maiores que aquelas apresentadas por sementes embebidas apenas em solução de PEG - 0,6MPa, 11% e 15% respectivamente (Tabela 1).

**Tabela 1.** Porcentagem de germinação de sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* sob diferentes tratamentos de nitroprussiato de sódio (SNP) e polietilenoglicol (PEG-6000) (-0,6 MPa), avaliada em intervalos de tempo de 24h.

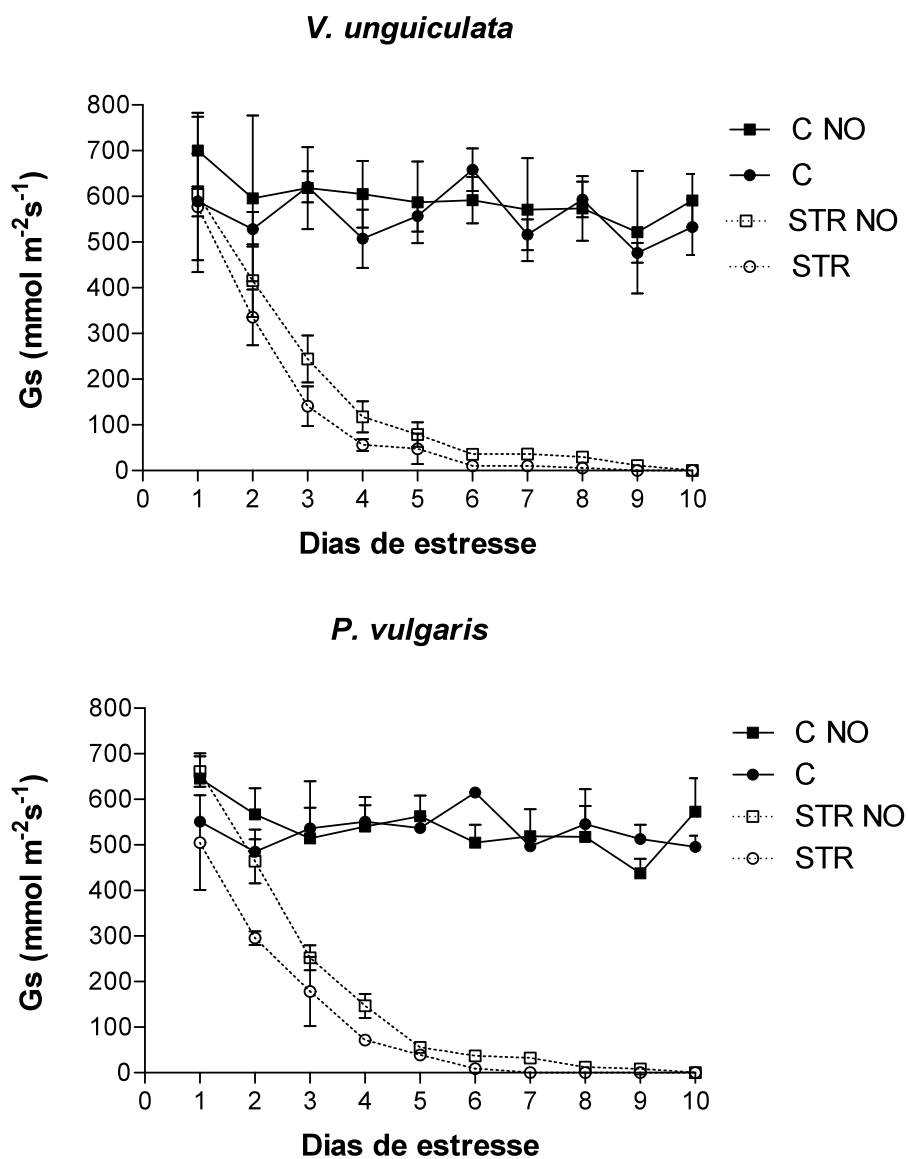
Tempo de germinação (h)	24	48	72	96	120
Tratamentos	<b><i>P. vulgaris</i></b>				
I	47 ± 1,5 aC	51 ± 1,6 aC	61 ± 1,2 bD	63 ± 1,3 bD	<b>79 ± 1,8 cE</b>
II	3 ± 1,2 aA	5 ± 1,3 aA	5 ± 0,9 aA	8 ± 0,7 aA	<b>11 ± 1,2 bA</b>
III	50 ± 2,2 aC	55 ± 2,3 Ac	57 ± 2,1 aD	66 ± 1,9 bD	71 ± 1,7 bD
IV	49 ± 2,7 aC	51 ± 2,8 aC	55 ± 3,0 aD	63 ± 3,1 bD	65 ± 3,0 bC
V	20 ± 3,0 aB	25 ± 2,7 bB	27 ± 2,4 bC	30 ± 2,6 bB	<b>37 ± 2,4 cB</b>
VI	15 ± 2,2 aB	20 ± 2,1 bB	24 ± 2,2 bC	28 ± 2,0 bB	<b>36 ± 1,8 cB</b>
	<b><i>V. unguiculata</i></b>				
I	50 ± 2,2 aC	55 ± 2,0 aC	57 ± 1,8 aD	77 ± 1,5 bE	<b>83 ± 2,0 bE</b>
II	5 ± 1,0 aA	5 ± 1,1 aA	10 ± 0,9 bB	13 ± 1,2 bA	<b>15 ± 1,0 bA</b>
III	55 ± 2,0 aC	60 ± 2,1 aD	60 ± 1,9 aD	69 ± 1,8 bD	70 ± 1,8 bD
IV	55 ± 3,0 aC	61 ± 3,4 aD	63 ± 3,2 aD	64 ± 3,1 aD	73 ± 2,9 bD
V	15 ± 2,0 aB	30 ± 1,5 bB	33 ± 1,7 bC	46 ± 2,1 cC	<b>50 ± 2,1 cC</b>
VI	20 ± 1,5 aB	30 ± 1,6 bB	35 ± 2,1 bC	50 ± 2,2 cC	<b>51 ± 2,2 cC</b>

**Tratamentos:** I - água destilada; II - solução de PEG; III - solução de SNP  $10^{-4}$ M; IV - solução de SNP  $10^{-3}$ M; V - solução de PEG + SNP  $10^{-4}$ M; VI - solução de PEG + SNP  $10^{-3}$ M. Cada valor corresponde a média de 4 repetições de 25 sementes cada. Letras minúsculas comparam valores em uma mesma linha  $P \leq 0,05$ .

### 4.3 - Condutância estomática

Durante o período experimental, e à medida que o déficit hídrico se estabelecia, os valores de condutância estomática (Gs) mostraram-se sempre decrescentes (Fig. 1). Os valores de Gs começaram a diminuir a partir do 2º dia de experimento. Este progressivo fechamento estomático mostrou-se relativamente constante a partir do 6º dia do déficit hídrico. As plantas de *P. vulgaris* e *V. unguiculata* que não receberam aplicação exógena de NO, tiveram mínimos valores de Gs aos 8º e 9º dias de experimento, respectivamente. Nas plantas sob déficit hídrico e que receberam aplicação exógena de SNP, os valores de Gs foram próximos a zero apenas no 10º dia de experimento (Fig. 1). Houve diferenças significativas entre os valores médios de Gs – 580 e 620  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para *V. unguiculata* sem e com NO respectivamente; 490 e 580  $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para *P. vulgaris* sem e com NO respectivamente –, embora o desvio padrão tenha sido

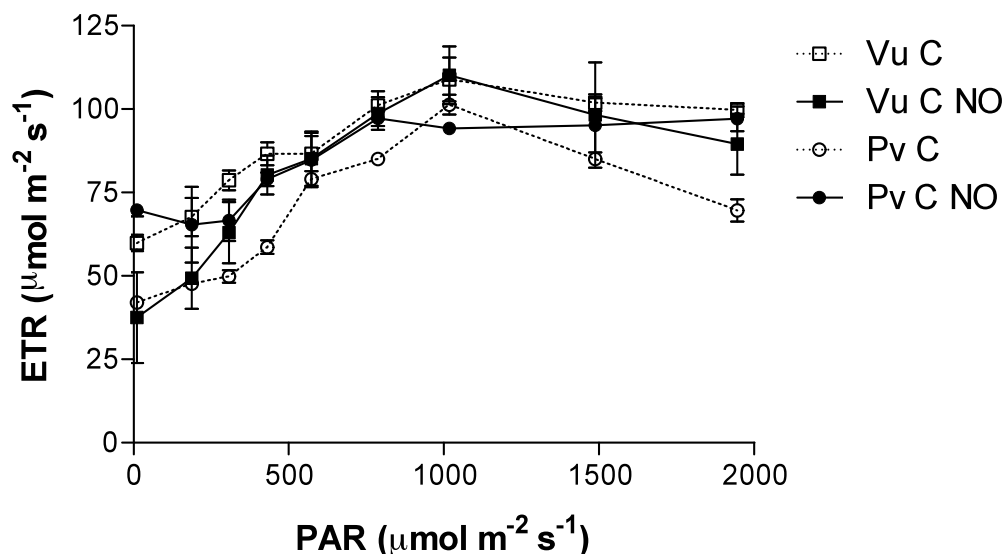
menor na presença do NO tanto nos tratamentos controle quanto nos tratamentos sob déficit hídrico.



**Figura 1.** Valores de condutância estomática (Gs) medidos em *V. Unguiculata* e *P. vulgaris* sob diferentes tratamentos ao longo do experimento. C – plantas irrigadas; STR – plantas submetidas ao estresse; NO – indica tratamento com solução de SNP  $10^{-4}\text{M}$ . Cada valor corresponde à média de 04 repetições.  $P \leq 0,05$ .

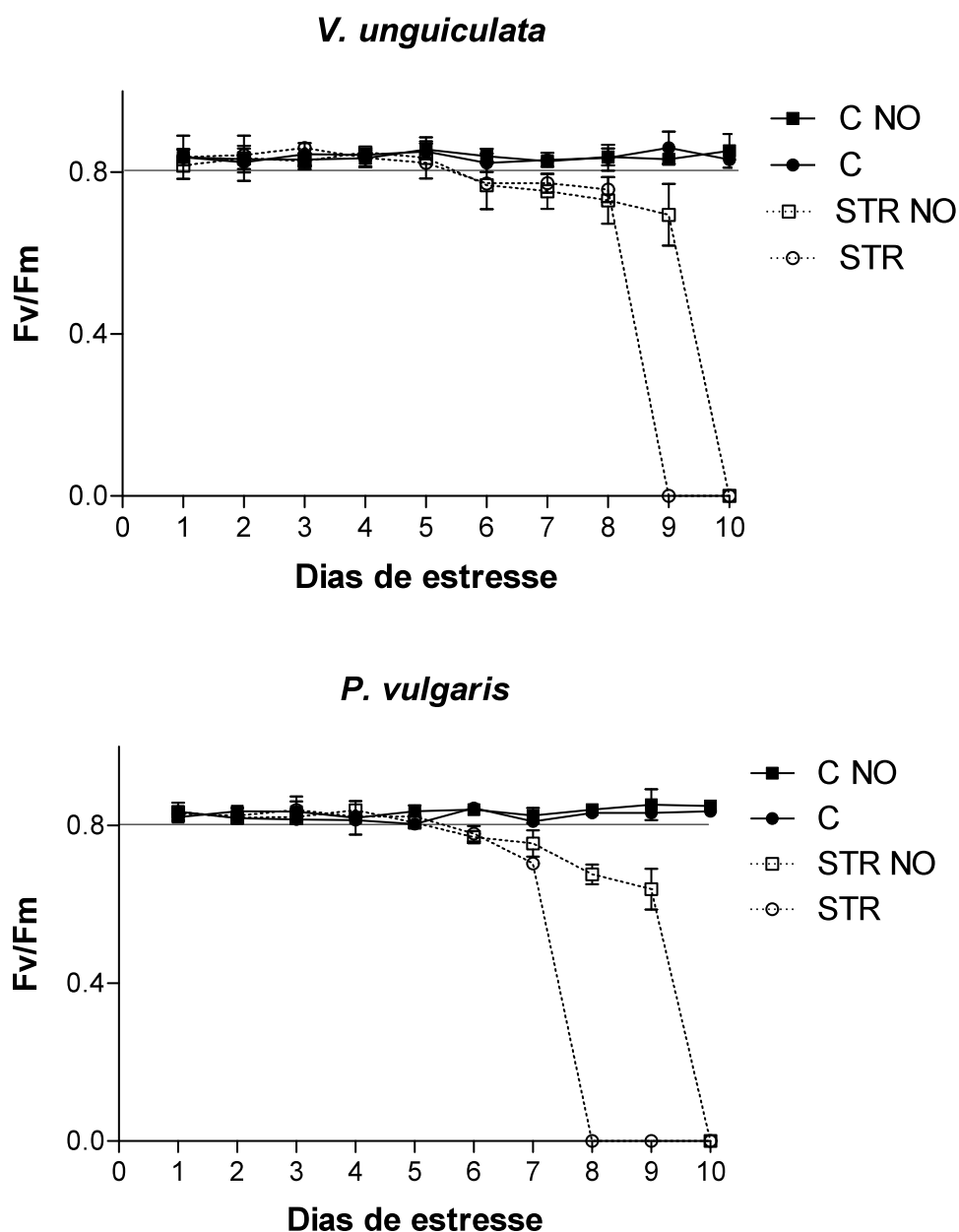
#### 4.4 – Eficiência fotossintética

Tanto para *V. unguiculata* quanto para *P. vulgaris*, não houve diferenças significativas entre os valores máximos de ETR entre os tratamentos irrigados, com e sem NO durante o experimento (Fig 2).



**Figura 2.** Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) medidos nas plantas irrigadas (C) com (NO) e sem aplicação exógena de solução de SNP  $10^{-4}\text{M}$ . Cada valor corresponde à média de 04 repetições,  $P \leq 0,05$ .

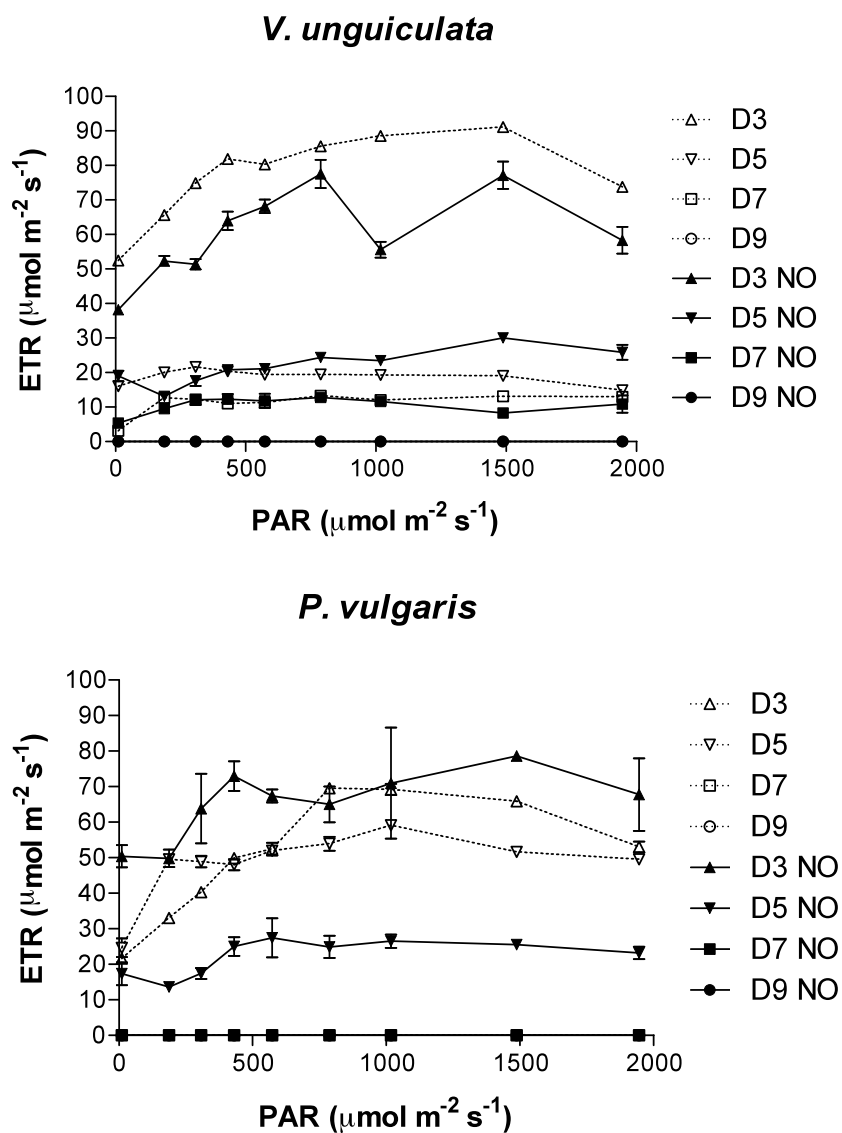
Os valores de intensidade luminosa medidos na área de cultivo não foram elevados, permanecendo em torno de  $500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ( $\pm 100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) durante o período experimental. As temperaturas médias do ar mantiveram-se estáveis, em torno de  $26 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $\pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e a umidade relativa do ar,  $65\%$  ( $\pm 5\%$ ) ao longo do experimento. Ao longo do estabelecimento do estresse e concomitante com a redução dos valores de ETR (5º e 6º dias de experimento), foram observados quadros de fotoinibição em todas as plantas submetidas à deficiência hídrica (valores de rendimento quântico potencial –  $F_v/F_m$  – inferiores a 0,8 em medições no escuro) (Fig 3).



**Figura 3.** Rendimento quântico potencial ( $F_v/F_m$ ) ao longo do experimento em plantas irrigadas (C) e plantas submetidas à deficiência hídrica (STR), com (NO) e sem aplicação de solução de SNP  $10^{-4}M$ . Cada valor corresponde à média de 4 repetições,  $P \leq 0,05$ .

O déficit hídrico imposto às plantas levou a uma significativa redução nos valores máximos da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) *in vivo* (Fig 4). Para as plantas submetidas ao estresse hídrico a redução nos valores de ETR foi significativa a partir do 5º dia de experimento (STR2) cessando primeiro nas plantas de *P. vulgaris* que não receberam aplicação exógena de NO (STR3). Nessas

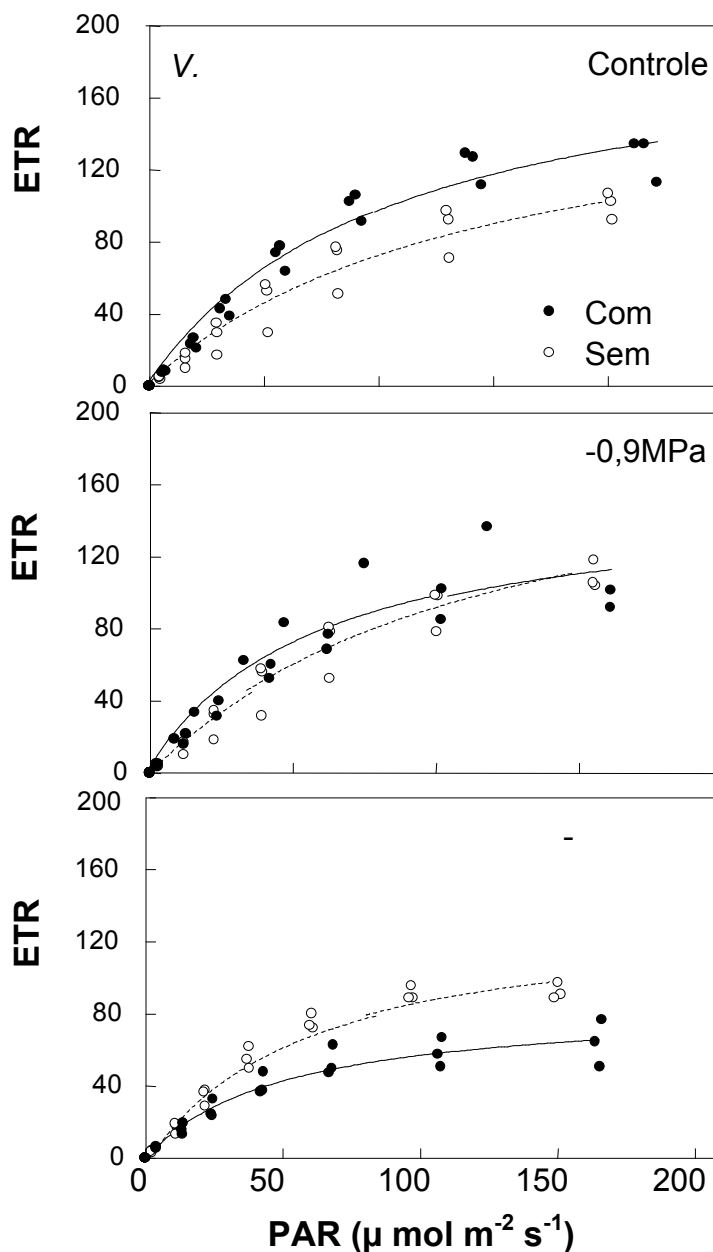
plantas também não houve diferenças significativas entre os valores máximos de ETR com aplicação e sem aplicação de SNP, mas, repetiu-se a tendência dos valores máximos de ETR serem maiores em *V. unguiculata* que em *P. vulgaris* tanto na ausência quanto na presença de NO (Fig 4).



**Figura 4.** Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) medidos em plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* submetidas ao déficit hídrico com (NO) e sem aplicação exógena de solução de SNP  $10^{-4}\text{M}$ . (D) corresponde ao dia de experimento ( $3^{\circ}$ ;  $5^{\circ}$ ;  $7^{\circ}$  e  $9^{\circ}$  dias). Cada valor corresponde à média de 04 repetições,  $P \leq 0,05$ .

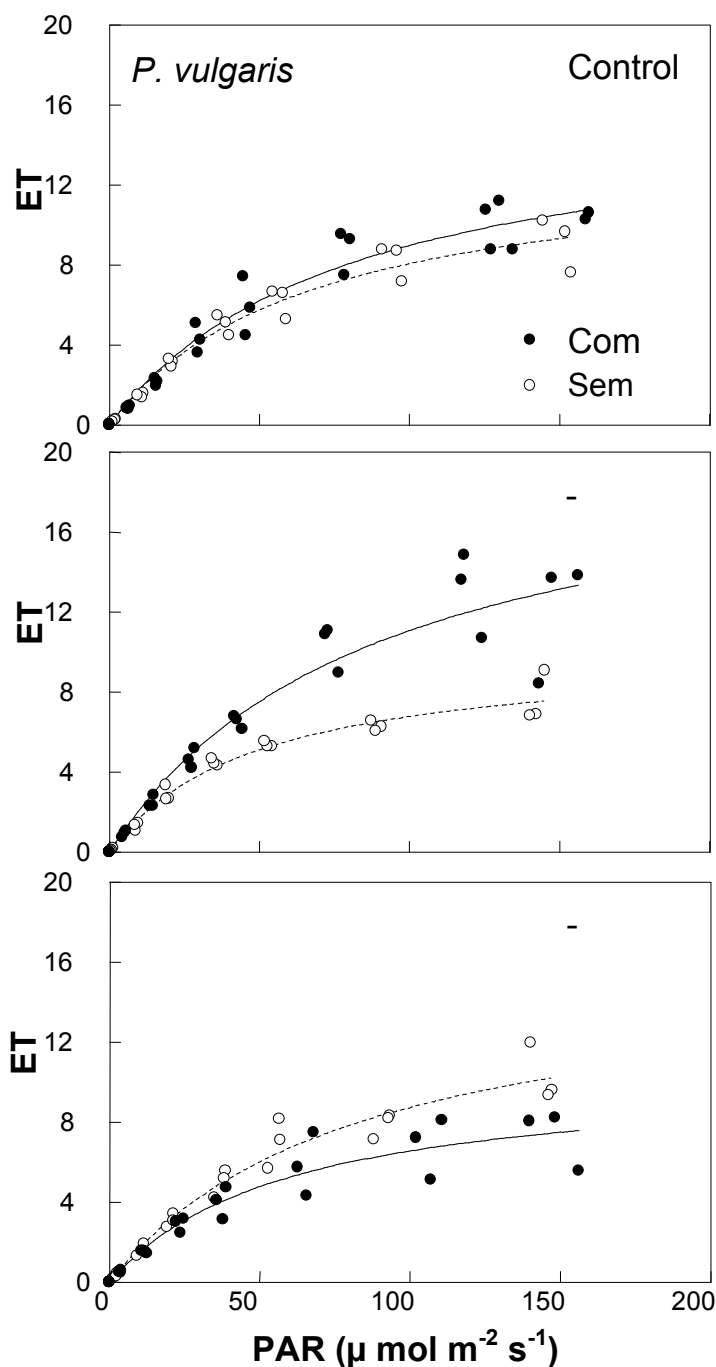
No entanto, para os segmentos foliares submetidos ao choque hídrico em tratamento com PEG-6000, o NO aumentou os valores de ETR quando comparados às plantas controle, em  $\Psi_w$  de 0 e  $-0,6\text{MPa}$  para *P. vulgaris* e em  $\Psi_w$

de 0 e -0,9MPa para *V. unguiculata*. Nos potenciais hídricos de -1,2MPa para *P. vulgaris* e -1,8MPa para *V. unguiculata*, o NO causou efeito inverso, diminuindo a ETR em relação às plantas que não receberam aplicação exógena de SNP (Figs. 5 e 6).



**Figura 5.** Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) medidos em segmentos foliares de plantas de *V. unguiculata* submetidas a choque hídrico ( $\Psi_w$ ) com (NO) e sem aplicação exógena de solução de SNP  $10^{-4}\text{M}$ . Cada valor corresponde à média de 04 repetições.  $P \leq 0,05$ .

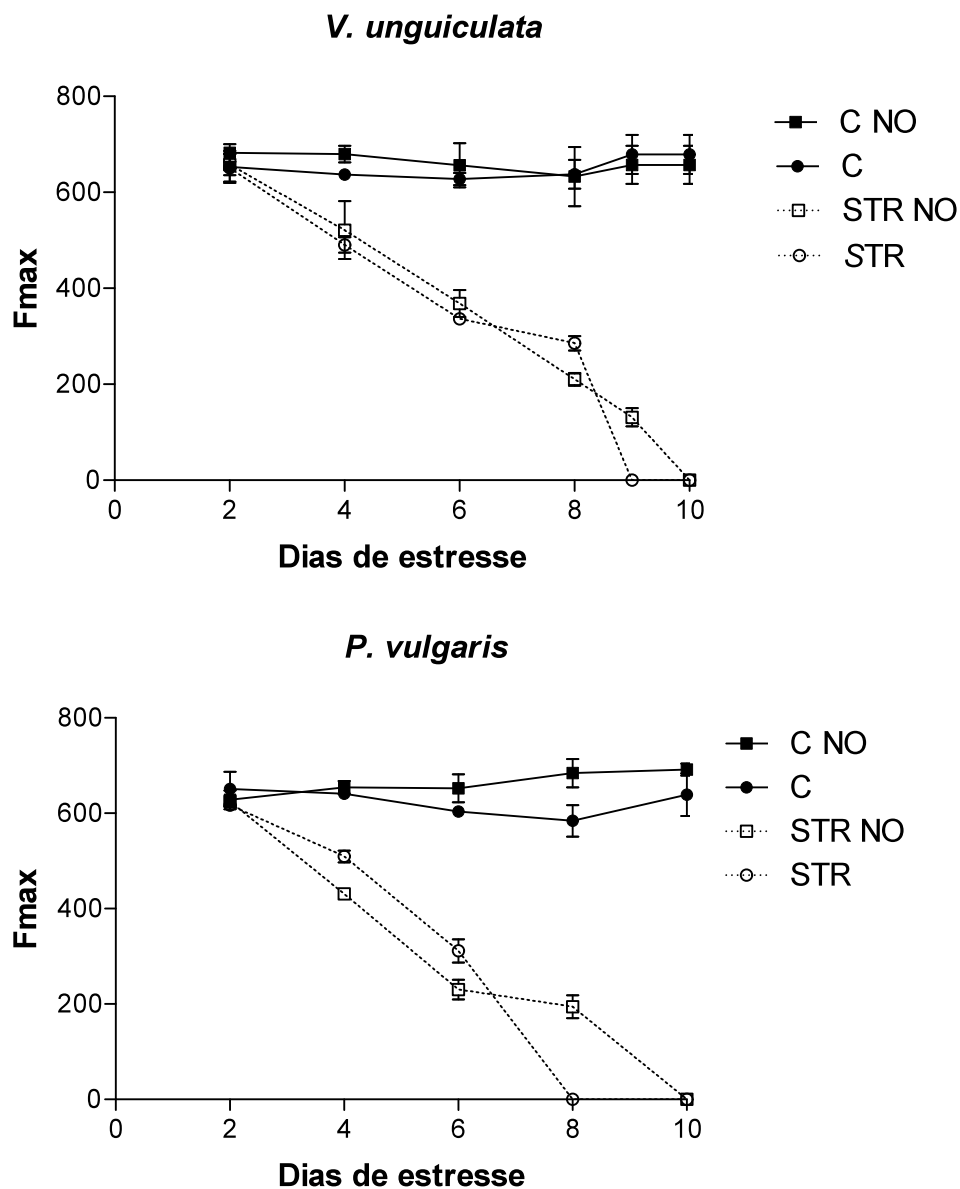




**Figura 6.** Taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) em função da radiação fotossinteticamente ativa (PAR) medidos em segmentos foliares de plantas de *P. vulgaris* submetidas a choque hídrico ( $\Psi_w$ ) com (NO) e sem aplicação exógena de solução de SNP  $10^{-4}\text{M}$ . Cada valor corresponde à média de 04 repetições,  $P \leq 0,05$ .

Não houve diferenças significativas entre os valores máximos de fluorescência emitidos pela clorofila *a* entre as plantas não submetidas à deficiência hídrica ou entre os tratamentos avaliados. Os valores máximos

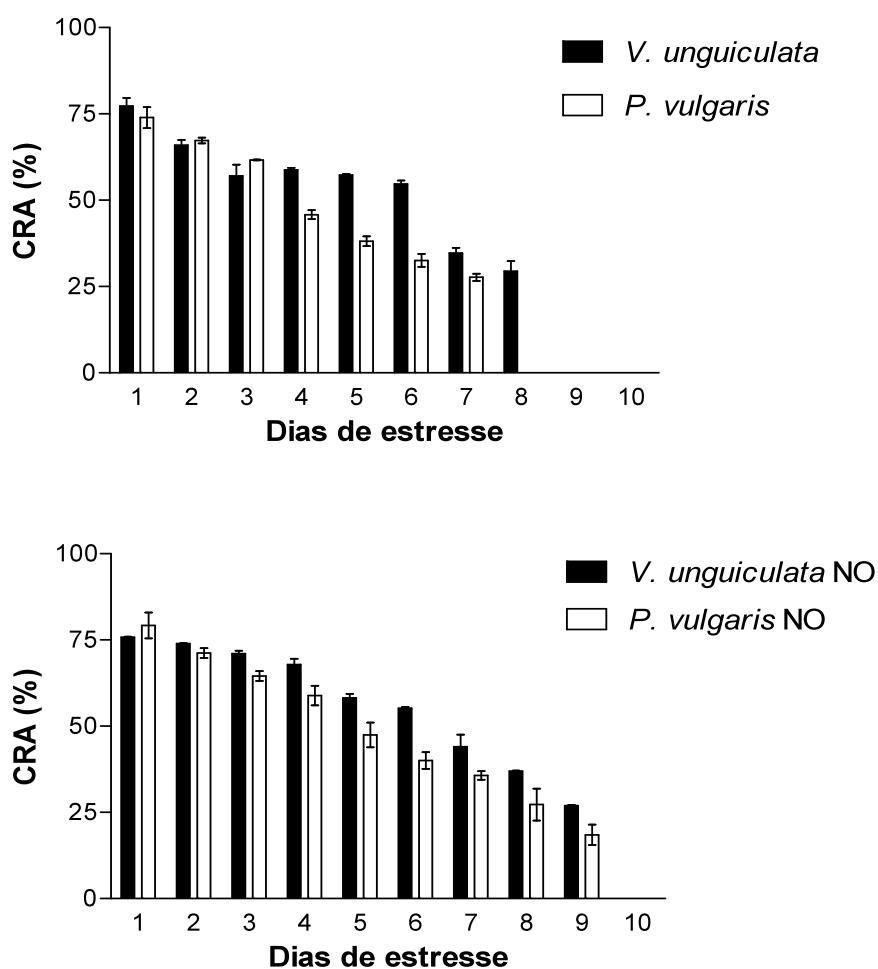
observados foram de  $703\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e  $705\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  para *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, respectivamente. A queda nos valores máximos de fluorescência nas plantas submetidas ao estresse acompanhou a redução dos demais parâmetros fotossintéticos (Fig 7).



**Figura 7.** Valores máximos de fluorescência emissíveis pela clorofila *a* medidos em *V. unguiculata* e *P. vulgaris* em função do déficit hídrico. Cada valor corresponde à média de 4 repetições,  $P \leq 0,05$ .

#### 4.5 - Conteúdo relativo de água

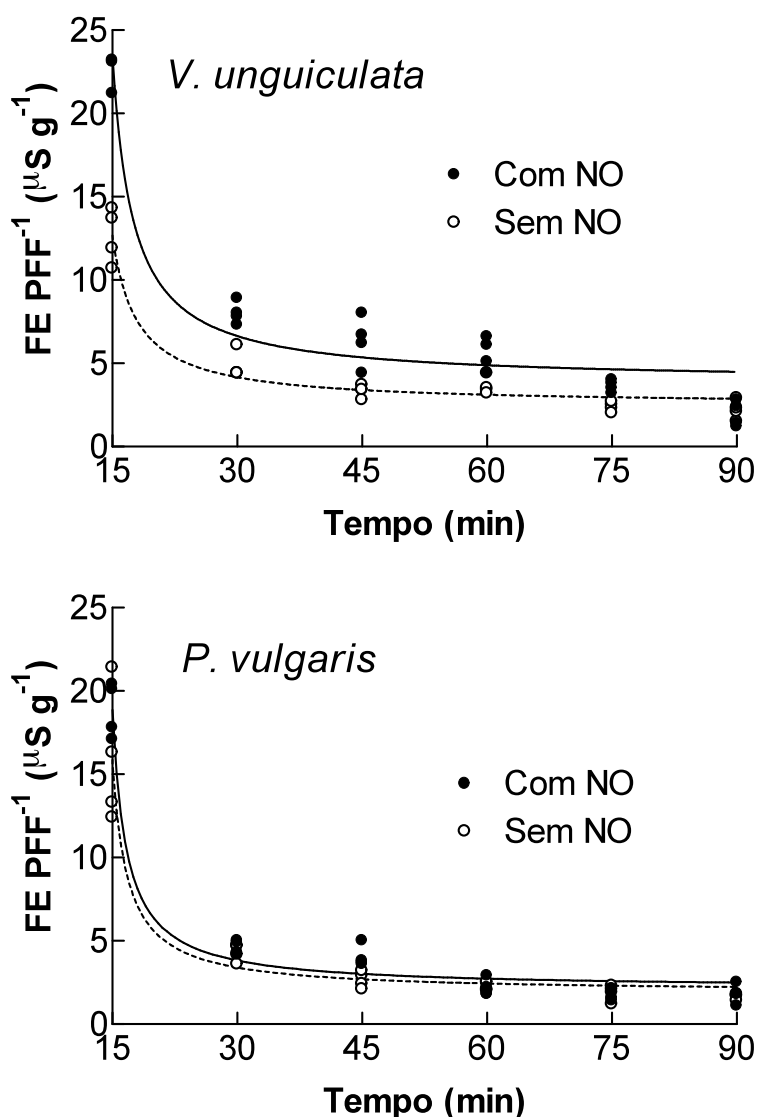
Os valores do conteúdo relativo de água (CRA) permaneceram constantes (aproximadamente 80%), sem diferenças significativas entre espécies ou tratamentos, nas plantas irrigadas (dados não mostrados). Nas plantas submetidas ao estresse, o declínio dos valores de CRA iniciou-se ao 2º dia de experimento sendo progressivo até a morte das plantas. Nas plantas sob déficit hídrico, houve uma tendência dos valores de CRA de *V. unguiculata* serem ligeiramente superiores aos valores encontrados para o *P. vulgaris*, fato que condiz com sua maior aptidão para tolerância à seca (Fig 8).



**Figura 8.** Conteúdo relativo de água (CRA) medidos ao longo do experimento nas plantas submetidas aos tratamentos com e sem aplicação de NO. Cada valor expressa a média de 4 repetições,  $P \leq 0,05$ .

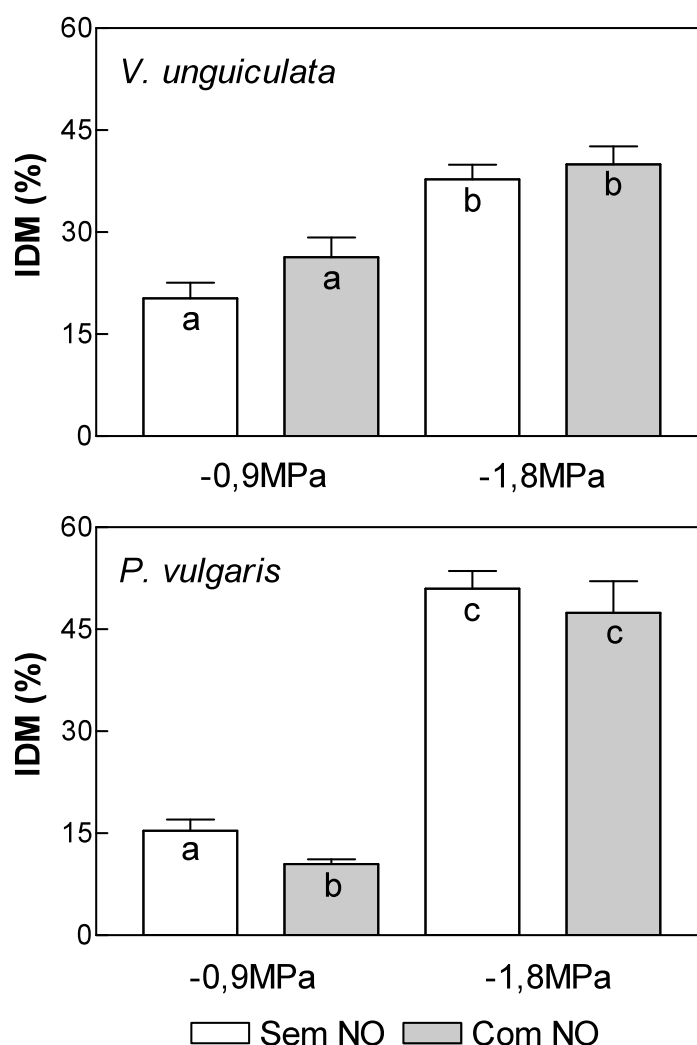
#### 4.5 – Tolerância protoplasmática

A fuga de eletrólitos (FE) foi maior nos primeiros 15 minutos sendo relativamente mais alta em *V. unguiculata* onde foi adicionado NO (Fig 9). Não houve diferenças significativas entre os tratamentos para *P. vulgaris*. Nos tempos subsequentes, a remoção de solutos permaneceu relativamente constante, apresentando leve decréscimo. As menores remoções de soluto ocorreram nos últimos dois intervalos, 60-75 e 75-90 minutos de lavagem dos discos foliares.



**Figura 9.** Fuga de eletrólitos (FE) em plantas de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* em função do tempo de lavagem de discos foliares, com e sem adição de solução de SNP [ $10^{-4}$ M].

O índice de dano membranar (IDM) foi diretamente proporcional às concentrações de PEG utilizadas. Plantas de *P. vulgaris* sofreram mais com o estresse imposto que *V. unguiculata*, atingindo valores aproximados de 50% de dano a um potencial de -1,8MPa comparados a 38% ao mesmo potencial (Fig 10). Em estresse moderado, -0,9MPa, foi observada uma redução do IDM em *P. vulgaris* que recebeu aplicação exógena de NO.



**Figura 10.** Índice de dano membranar (IDM) em função do potencial hídrico imposto para *P. vulgaris* e *V. unguiculata* com e sem adição de solução de SNP [ $10^{-4}$ M],  $P \leq 0,05$ .

## 5 - Discussão

Em vegetais, estudos envolvendo mecanismos de tolerância ao déficit hídrico se restringem, quase que exclusivamente, a parâmetros fisiológicos. A associação de outros componentes moleculares como o NO nesses estudos, é algo relativamente novo, porém, como aqui demonstrado, pode ser efetivo como um mecanismo adicional às defesas naturais da planta contra situações de deficiência hídrica. Neste trabalho foram avaliadas algumas das respostas ao déficit hídrico que podem ser mediadas pelo NO.

A associação do NO com a germinação de sementes ainda é muito especulativa. Os resultados apresentados evidenciam que o NO tem um papel na redução dos efeitos do déficit hídrico (Tabela 1), porém, o mesmo NO não demonstrou efeito algum quando na ausência do estímulo de estresse. Existem muitas evidências de que o NO tenha uma ligação direta com o metabolismo do nitrogênio (N) absorvido e que, durante a germinação, o embrião faça uso do N proveniente das reservas do endosperma, inviabilizando alguma atuação do NO (Beligni & Lamattina, 2000). A redução nas taxas de germinação de sementes embebidas em soluções de NO e não submetidas ao déficit hídrico, pode estar relacionada com um papel regulatório do próprio NO associado a espécies reativas de oxigênio (ROS). Alguns estudos (Aver'yanov & Lapikova, 1990; Michan et al., 2002; Wang & Higgins, 2005) mostram um efeito de NO e ROS associados ao retardamento da germinação. Embora o NO tenha um papel protetor do estresse oxidativo (Morot-Gaudry-Talarmain et al., 2002) acredita-se que até uma inibição da germinação possa ser causada pelo desbalanço de ROS (Wang & Higgins, 2005).

Adicionalmente, as vias dependentes de cAMP, fosfolipase C e MAPK, embora envolvidas no desenvolvimento embrionário, não apresentam evidências suficientes do envolvimento do NO como molécula sinalizadora e a via sinalizadora de cGMP, a qual o NO está diretamente ligado, não apresenta associação com a germinação de sementes (Warwar & Dickman, 1996; Yang & Dickman, 1997; Tucker & Talbot, 2001; Barhoom & Sharon, 2004).

O decréscimo nos valores de condutância estomática demonstrou semelhança com outros estudos em plantas sob efeito do déficit hídrico (Grzesiak

et al., 1997; Repeli et al., 1997; França et al., 2000). O decréscimo gradual da  $G_s$  nas plantas dos tratamentos com deficiência de irrigação (Fig. 1) se relaciona diretamente com a instalação do estresse e, principalmente, com a redução da abertura estomática.

Durante a instalação dos efeitos do déficit hídrico, há uma indução do fechamento estomático a partir do momento que as folhas têm a percepção da restrição hídrica, especialmente após a redução do potencial hídrico foliar a valores abaixo de um limite. A produção de ácido abscísico (ABA) estimula um aumento da concentração citosólica de  $Ca^{2+}$  nas células guarda por duas vias distintas, uma dependente da transdução de sinal via inositol 3-fosfato (IP<sub>3</sub>) e outra dependente de ADP-ribose cíclica (cADPR). (Muir & Sanders, 1996; Grill & Himmelbach, 1998; Leckie et al., 1998).

Em animais, NO é responsável por um aumento das concentrações internas de  $Ca^{2+}$  em vias dependentes e independentes de cGMP. Esses aumentos foram reportados como consequência da absorção de  $Ca^{2+}$  presente nos espaços intercelulares (via canais de membrana tipo L), ou devido à liberação do mesmo de reservatórios intracelulares (via cADPR ou IP<sub>3</sub>) (Ishii et al., 1997; Volk et al., 1997; Berkels et al., 2000). Em plantas, existem evidências de que NO aumenta os níveis de cGMP, responsáveis por estimular a expressão de genes de defesa da planta, incluindo genes relacionados à tolerância ao estresse. Alguns desses genes também foram induzidos por cADPR, sugerindo que essa molécula possa ser um mensageiro secundário do NO (Durner et al., 1998; Klessig et al., 2000).

Mata e Lamattina (2001) ao adicionarem c-PTIO (um quelante de NO) à epiderme foliar de plantas de *P. vulgaris* colocadas no escuro, mostraram uma inibição do fechamento estomático, sugerindo a participação do NO endógeno nos mecanismos de movimentação estomática. O controle da abertura e fechamento estomáticos, sob qualquer conjunto de condições ambientais, é uma função complexa das interações entre os níveis hormonais, e as vias de transdução de sinal iniciadas por estímulos mecânicos e bioquímicos (Mott & Buckley, 2000). Como não há uma resposta estomática individual a esses estímulos, acredita-se em uma teoria de movimento estomático em blocos, onde os estômatos respondem de maneira diferente em função de sua localização. Dessa maneira o NO teria um papel fundamental na propagação desse tipo de estímulo uma vez que é uma

molécula pequena, de meia-vida curta e altamente solúvel em membranas biológicas (Mata & Lamattina, 2001), o que poderia explicar o comportamento diferenciado entre os desvios-padrão entre a Gs das plantas dos tratamentos com e sem aplicação exógena de NO (Fig. 1).

A aplicação de NO exógeno conferiu uma maior adaptação às condições de dessecação tanto na planta tolerante (*V. unguiculata*) quanto na planta sensível (*P. vulgaris*). Como relatado por Bray (1997), a resitência ao déficit hídrico se dá quando o indivíduo é capaz de resistir ao estresse imposto por um período de tempo maior que outros indivíduos não adaptados, através de mecanismos que permitam uma tolerância ou um evitamento da situação. Neste caso, as plantas que receberam aplicação exógena de NO através de SNP, suportaram, por um período de tempo maior (48h para *P. vulgaris* e 24h para *V. unguiculata*), ao estresse imposto mantendo, em média, 10% mais água que aquelas que não receberam NO (Fig. 6). Assim, as diferenças observadas entre *V. unguiculata* e *P. vulgaris* no que diz respeito ao decréscimo de CRA apontam para uma melhor adaptabilidade do primeiro às condições de deficiência hídrica. Vale ressaltar, que mesmo sendo *P. vulgaris* naturalmente menos adaptado à condição da restrição hídrica, os valores do CRA mantiveram-se mais elevados em relação àqueles das plantas que não recebam NO.

Na avaliação da eficiência fotossintética por meio de medidas da fluorescência da clorofila *a*, com a imposição do déficit hídrico, observou-se uma acentuada redução nos valores da taxa aparente de transporte de elétrons (ETR) (Figs. 4, 5 e 6). Uma das principais consequências dessa diminuição e não funcionalidade do aparato fotossintético é a formação de ROS, contribuindo ainda mais para danos aos fotossistemas. Estresses oxidativos são uma consequência comum do estresse hídrico em vegetais. O papel do NO como atenuador de várias consequências severas do estresse oxidativo como clorose, fragmentação de DNA e apoptose, já foi evidenciado (Laxalt et al., 1997; Beligni & Lamattina, 1999a, 1999b). Outra consequência do estresse oxidativo é o extravasamento de íons para os compartimentos intercelulares (Halliwell & Gutteridge, 1984). Um fato interessante observado foi um aumento da ETR tanto em *V. unguiculata* quanto em *P. vulgaris* nos testes em segmentos foliares na presença do NO (Figs. 5 e 6). Este fato evidencia o papel atenuador do NO em



estresses moderados ( $\Psi_w$  de -0,6MPa para *P. vulgaris* e -0,9MPa para *V. unguiculata*). A ausência desse fenômeno nos experimentos em plantas intactas mostra que, nesses casos – em segmentos foliares – o NO estaria absorvendo ROS formados impedindo danos aos fotossistemas (Beligni & Lamattina, 1999a, 1999b), o que não acontece quando o estresse é gradual e/ou severo (Fig. 4).

O NO mostrou-se eficiente também como atenuador dos efeitos lesivos do estresse hídrico/oxidativo, evidenciado pela observação do fenômeno de fotoinibição (Fig. 3). A ocorrência deste em concomitância com a redução dos valores máximos de fluorescência da clorofila *a* (Fig. 7), em períodos diferentes para as plantas sob estresse que receberam aplicação exógena de SNP e as plantas que não receberam SNP, sugere a participação do NO no processo. Folhas expostas a altas densidades de fluxo de fótons sempre exibem um decréscimo no rendimento quântico do fotossistema II (FSII). Assim, um decréscimo no rendimento quântico potencial ( $F_v/F_m$ ) pode resultar ora de uma diminuição nas taxas constantes da fase fotoquímica da fotossíntese, ora de um aumento nas taxas não fotoquímicas de dissipação de excesso de energia – refixação de  $CO_2$  (Daniel, 1997). Com os estômatos praticamente fechados e conseqüente acúmulo de ATP e poder redutor – NADPH – em virtude do não funcionamento do ciclo de Calvin dada a ausência de  $CO_2$ , era de se esperar que ocorresse fotoinibição nas plantas submetidas ao déficit hídrico (Genty et al., 1987).

Sendo as membranas biológicas um dos primeiros alvos do estresse hídrico, a avaliação de sua integridade permitiu confirmarmos a ocorrência de danos severos. Ao se estudar os melhores tempos de lavagem de discos foliares, observamos que a maior parte dos eletrólitos foi liberada nos primeiros 15 minutos (Fig. 9), o que pode ser atribuído àqueles aderidos à superfície celular e também àqueles presentes em células, vasos e apoplasto, danificados durante o processo (Borochoy & Borochoy, 1991). O fato da FE ter sido ligeiramente maior nas soluções onde foi adicionado NO, pode ser explicado pela leve interação do mesmo com um aumento da liberação intracelular de  $Ca^{2+}$ , principalmente em *V. unguiculata*, (García-Mata et al., 2003) que atuaria como mensageiro modulando um influxo de  $K^+$  através de canais e transportadores (Zhao et al., 2007), íons conseqüentemente liberados durante a lavagem.

O estresse hídrico modifica a estrutura físico-química de membranas (Lauriano et al., 2000) levando a alterações nas taxas de fuga de eletrólitos. Esse dano pode ser amenizado por mecanismos diversos, destacando-se o acúmulo de açúcares (Bajji et al., 2000). Alguns autores sugerem que esses açúcares, principalmente dissacarídeos não redutores como a sacarose e a trealose, interagem com as membranas celulares aumentando sua estabilidade (Nilsen & Orcutt, 1996), ao associarem-se com grupos fosfolipídicos diminuindo sua fluidez lateral (Leopold & Vertucci, 1986). No entanto, esses fatores não têm interação nas vias onde o NO tem participação como evidenciado na figura 10.

O fato da FE ter sido diferente em função da concentração de PEG e do tempo de exposição, e ter sido influenciada pela presença de NO em *P. vulgaris* sob estresse moderado sugere: (1) o estresse induzido pelo PEG teve um impacto diferente em transportadores específicos envolvidos na translocação de íons através de membranas (Bajji et al., 2001), (2) o papel protetor do NO em *P. vulgaris* sob estresse moderado pode ser atribuído à ação direta sobre canais de  $Ca^{2+}$ , e conseqüentemente  $K^{+}$ , (Martinoia et al., 1986). A inobservância deste efeito em *V. Unguiculata* evidencia sua maior adaptabilidade às condições de seca.

Além do NO, podem estar atuando outros mecanismos protetores. Existem estudos que comprovam um efeito protetor do aparato fotossintético exercido pela fotorrespiração e refixação de  $CO_2$ . Ambas podem agir como um dreno para os produtos da cadeia transportadora de elétrons ao estimular o aumento de um gradiente protoiônico transtilacóide pelo favorecimento de um fluxo cíclico de elétrons ao redor do fotossistema I (FSI) (Leegood et al., 1995; Daniel, 1997).

De uma maneira interessante é possível associar o NO, então tido como potencialmente danoso (dada sua fácil difusão através de membranas biológicas e seu elevado potencial redox), a papéis protetores em situações comuns experimentadas pelos vegetais em ambiente natural. No entanto, estudos mais profundos sobre as interações moleculares do NO também devem ser realizados. A associação do NO como regulador hormonal, principalmente no mecanismo de sinalização de deficiência hídrica via ABA e nos estresses onde o etileno atua como fitoregulador, sua interação molecular com jasmonatos, e seu papel nas vias de transdução de sinal MAPK e  $IP_3$  ainda devem ser explorados.

## 6 – Conclusões

1. A aplicação exógena de NO através de seu doador SNP nas concentrações utilizadas foi efetiva em promover um retardamento dos efeitos do déficit hídrico (24 e 48h) em *V. unguiculata* e *P. vulgaris* respectivamente.
2. Foi possível detectar uma interação positiva entre presença do NO e aumento da resistência à seca tanto em planta tolerante (*V. unguiculata*) quanto em planta sensível (*P. vulgaris*), ainda que os mecanismos de tolerância operem de maneiras diferenciais entre as espécies.
3. Respostas mais evidentes ao déficit hídrico foram observadas pela análise dos valores de ETR e condutância estomática quando comparadas com presença e ausência de NO.
4. NO favoreceu um pequeno aumento nas taxas de germinação de sementes de *V. unguiculata* e *P. vulgaris* quando submetidos à deficiência hídrica moderada ( $\Psi_w$  de -0,6MPa), bem como efeito protetor nas taxas de IDM em *P. vulgaris* sob estresse moderado.

## 7 - Considerações finais

A aplicação exógena de NO através de seu doador SNP em baixas concentrações mostrou-se como uma possibilidade efetiva para o prolongamento da tolerância à seca em *V. unguiculata* e *P. vulgaris*.

Outros estudos ainda precisam ser levados em consideração, no entanto. É necessário um entendimento mais profundo dos mecanismos de atuação do NO na tolerância à seca. Esses estudos deveriam se focar em canais de Cálcio e sua modulação intracelular, no controle do conteúdo osmótico da célula vegetal, bem como nas participações do NO como sinalizador de outros tipos de estresse.

Além desses estudos, são necessários conhecimentos mais profundos acerca das origens intrínsecas do NO (atividade da Nitrato redutase / Nitrito redutase e NO sintase) e sua participação em vegetais não submetidos a estresse.

Por fim, torna-se evidente a necessidade de maiores investigações sobre a relação entre o NO e as respostas vegetais à deficiência hídrica. Uma vez que essa interação for bem conhecida tanto em plantas tolerantes quanto em plantas

sensíveis, e compreendida a interação com outros fatores ambientais, o papel do NO nessas questões se tornará mais evidente. Em um primeiro momento, aplicações exógenas de NO como mediador das respostas à seca podem ser indicadas e, em um segundo momento, a transferência de genes de interesse, comprovadamente envolvidos no processo, a outros vegetais.

## 8 - Referências Bibliográficas

- Anbar M., 1995. Nitric oxide: a synchronizing chemical messenger. *Experientia* 51: 481–490.
- Anburaj A., Francis K., 1996. Partitioning of  $\text{NO}_3^-$  reduction between roots and shoots of Italian millet and small millet as influenced by plant age. *Plant Physiol. Bioch.* 23(2): 145-147.
- Aver'yanov A.A., Lapikova V.P., 1990. Activated oxygen as a possible factor in the autoinhibition of spore germination of the fungus *Pyricularia oryzae*. *Biochemistry-Moscow* 55, 1397–1402.
- Bajji M., Lutts S., Kinet J. M., 2000. Resistance to water stress in durum wheat: Comparison of cell and whole seedling behaviours. In: Bajji M., Lutts S., Kinet J. M., 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Reg.* 00: 01-10.
- Bajji M., Lutts S., Kinet J.M., 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Reg.* 00: 01-10.
- Barhoom S., Sharon A., 2004. cAMP regulation of “pathogenic” and “saprophytic” fungal spore germination. *Fungal Genetics and Biology* 41, 317–326.
- Beligni M.V., Lamattina L., 1999a. Is nitric oxide toxic or protective? *Trends Plant Sci.* 4: 299–300.
- Beligni M.V., Lamattina L., 1999b. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. *Planta* 208: 337–344.

- Beligni M.V., Lamattina L., 1999c. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. *Nitric Oxide Biological Chemistry* 3: 199–208.
- Beligni M.V., Lamattina L., 2000. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light inducible responses in plants. *Planta* 210: 215–221.
- Beligni M.V., Lamattina L., 2001. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. *Plant Cell Environ* 24: 267–278.
- Berkels R., Suerhoff S., Roesen R., Klaus W., 2000. Nitric oxide causes a cGMP-independent intracellular calcium rise in porcine endothelial cells: a paradox? *Microvasc. Res.* 59: 38–44.
- Bergamaschi H., Vieira H. J., Ometto J.C., Angelocci, L.R., Libardi P.L., 1988. Deficiência hídrica em feijoeiro. Análise de crescimento e fenologia. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 23 (7) 733-743.
- Bewley J.C., 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 30: 195-238.
- Blatt M.R., 2000. Ca<sup>2+</sup> signaling and control of guard-cell volume in stomatal movements. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 196–204.
- Blum A., 1988. *Plant breeding for stress environments*. CRC Press, Boca Raton, FL USA. pp 163-178.
- Borochoy-Neori H., Borochoy A., 1991. Response of melon plants to salt. Growth, morphology and root membrane. *J Plant Physiol.* 139: 100-106.
- Boyer J.S., 1983. Subcellular mechanisms of plant response to low water potential. *Agricult. Water Manag.* 7: 239-248.
- Bradford K. J., 1986. Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. *Hortscience*, 05: 1105-1112.
- Bray E.A., 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2: 48–54.
- Carvalho N. M., Nakagawa J., 1983. Germinação. In: Carvalho, N. M., Nakagawa, J. eds. *Sementes – ciência, tecnologia e produção*. 2<sup>a</sup> ed. Campinas: Fundação Cargill, Cap. 7, pp 107-143.
- Casper C., Eickmeier W.G., Osmond, C.B., 1993. Changes of fluorescence and xanthophylls pigments during dehydration in the resurrection plant

- Selaginella lepidophylla* in low and medium light intensities. *Oecologia*, 94: 528-533.
- Chaves M.M., 1991. Effects of water deficits on carbon assimilation. *J Exp Bot*, 42: 1-16.
- Close T.J., 1997. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol. Plantarum*, 100: 291-296.
- Curry J., Walker-Simmons M.K., 1993. Unusual sequence of group 3 LEA (II) mRNA inducible by dehydration stress in wheat. *Plant Mol Biol* 21: 907-912.
- Dai Z., Edwards G.E., Ku M.S.B., 1992. Control of photosynthesis and stomatal conductances in *Ricinus communis* L. (castor bean) by leaf to air vapour pressure deficit. *Plant Physiology*, 99: 1426-1434.
- Daie J., Campbell W.F., 1981. Response of tomato plants to stressful temperatures. Increase in abscisic acid concentrations. *Plant Physiology*, 67: 26-29.
- Daniel E., 1997. The temperature dependence of photoinhibition in leaves of *Phaseolus vulgaris* (L.) Influence of CO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> concentrations. *Plant Science*, 124: 1-8.
- Dean J.V., Harper J.E., 1988. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. *Plant Physiol.* 88: 389-395.
- Delledonne M., Xia Y., Dixon R.A., Lamb C., 1998. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394: 585-588.
- Dure L., 1993. A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 3: 363-369.
- Durner J., Wendehenne D., Klessig F., 1998. Defence gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 10328-10333.
- Eickmeier W.G., Casper C., Osmond C.B., 1993. Chlorophyll fluorescence in the resurrection plant *Selaginella lepidophylla* (Hook. & Grev.) spring during high-light and desiccation stress, and evidence for zeaxanthin-associated photoprotection. *Planta*, 189: 30-38,
- Feng Y., Li X., Boersma L., 1994. Roles of osmotic adjustment and turgor potential in leaf area expansion. *Physiol. Plantarum*, 90: 1-8.

- Ferrari-Iliou R., Pham Thi A. T., Vieira da Silva J., 1984. Effect of water stress on the lipid and fatty acid composition of cotton (*Gossypium hirsutum*) chloroplasts. *Physiol. Plantarum*, 62: 219-224.
- França M.G.C., Pham Thi A.T., Pimentel C., Rossiello R.O.P., Zuilly-Fodil Y., Laffray D., 2000. Differences in growth and water relations among *Phaseolus vulgaris* cultivars in response to induced drought stress. *Env, Exp.Bot.*, 43 227-237.
- Gaff D.F., 1980. Protoplasmatic tolerance of extreme water stress. In: *Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress*. Turner, N.C. & Kramer, P. J. Eds., Wiley, New York, pp 207-230.
- García-Mata C., Gay R., Sokolovski S., Hills A., Lamattina L., Blatt M. R., 2003. Nitric oxide regulates  $K^+$  and  $Cl^+$  channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 10: 11116-11121.
- Garg B.K., Vxas S.P., Kathju S., Lahiri A.N., 1998. Influence of water deficit stress at various growth stages on some enzymes of nitrogen metabolism and yield in cluster bean genotypes. *Indian J. Plant Physiol.* 3(3): 214-218.
- Genty B., Briantais J.M., Silva J.B.V., 1987. Effects of drought on primary photosynthetic processes of cotton leaves. *Plant Physiology*, 83: 360-364.
- Grabe A.R., Danielson R.E., 1965. Effect of  $CO_2$ ,  $O_2$  and soil moisture suction on germination of corn and soybeans. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, 29: 12-18.
- GraphPad Software 2.0 Copyright © GraphPad Software Inc., 1988. All rights reserved. Standard Version.
- Grill E., Himmelbach A., 1998. ABA signal transduction. *Curr Opin Plant Biol* 1: 412-418.
- Grzesiak S., Iijima M., Kono Y., Yamauchi A., 1997. Differences in drought tolerance between cultivars of field bean and field pea. A comparison of drought-resistant and drought-sensitive cultivars. *Physiol Plantarum* 19: 349-357.
- Gunaseker, D., Berkowitz G.A., 1992. Heterogenous stomatal closure in response to leaf water deficits is not a universal phenomenon. *Plant Physiology* 98: 660-665.

- Guo F.Q., Okamoto M., Crawford N.M., 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100–103.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J* 219: 1–14.
- Hornberg C., Weiler E.W., 1984. High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells. *Nature* 310: 321-324.
- Hsiao T.C., 1973. Effects of water deficits on guard cell potassium and stomatal movement. *Plant Physiology, Supplement* 4-43.
- Hsiao T.C., Acevedo E., 1974. Plant responses to water deficits, water use efficiency, and drought resistance. *Agric. Meteorology* 14: 59-84.
- Hsiao T.C., O'Toole J.C., Yambao E.B., Turner N.C., 1984. Influence of osmotic adjustment on leaf rolling and tissue death in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology* 75: 338-341.
- Hunter J.R., Erikson A.E., 1952. Relation of seed germination to soil moisture tension. *Agronomy J* 44: 107-109.
- Ignarro L.J., 1996. Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int. (Supplement)* 55: 52-5.
- Iturbe-Ormaetxe I., Escudero P.R., Arrese-Igor C., Becana M., 1998. Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. *Plant Physiol* 116: 173–181.
- Ishii K., Yuyama H., Matsuura N., Abe S.I., Tanaka Y., Nakayama K., 1997. Regulation of the intracellular free calcium concentration of rat pancreatic b cells via the nitric oxide-cyclic GMP system. In: S. Moncada, N. Toda, E.A. Higgs, eds, *The Proceedings of the Fifth International Meeting on the Biology of Nitric Oxide*, Kyoto, Japan. Portland Press, London, pp 178.
- Kacperska A., 1997. Ethylene synthesis and a role in plant responses to different stressors. In: *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene* (Ed. Kanellis, A.K.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp. 207-216.
- Klepper L.A., 1975. Evolution of nitrogen oxide gases from herbicide treated plant tissues. *WSSA Absts.* 184: 70.
- Klepper L.A., 1990. Comparison between NO<sup>x</sup> evolution mechanism of wild type and nr1 mutant soybean leaves. *Plant Physiol* 93:26-32.



- Klessig D.F., Durner J., Noad R., Navarre D.A., Wendehenne D., Kumar D., Zhou J.M., Shah J., Zhang S., Kachroo P., 2000 Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc Nat Acad Sci* 97: 8849–8855.
- Kopka J., Provart J.N., Muller-Roer B., 1997. Potato guard cells respond to drying soil by a complex change in the expression of genes related to carbon metabolism and turgor regulation. *Plant J* 11: 871–888.
- Lancaster Jr. J.R., 1992. Nitric oxide in cells. *Am Scient* 80: 248-259.
- Lauriano A.C., Lidon F.C., Carvalho C.A., Campos P.S., Matos M.D., 2000. Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica* 38: 7-12.
- Laxalt A.M., Beligni M., Lamattina L., 1997. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Eur J Plant Pathol* 73: 643–651.
- Leckie C.P., McAinsh M.R., Allen G.J., Sanders D., Hetherington A.M., 1998. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose. *Proc Nat Acad Sci USA* 95: 15837–15842.
- Lee E.H., Lee B.Y., Lee J.W., Kim K., Kwon Y.S., 1998. Nitrate content and activity of nitrate reductase and glutamine synthetase as affected by plant age, leaf position, time of day of leaf lettuce in hydroponics. *J. Korean Soc. Hort. Sci.* 39(2): 149-151.
- Leegood R. C., Lea P. J., Adcock M.D., Häusler R.A., 1995. The regulation and control of photorespiration. *J Exp,Bot* 46: 1397-1414.
- Leopold A.C., Vertucci C.W., 1986. Physiological attributes of desiccated seeds. In: Bajji M., Lutts S., Kinet J. M., 2001. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Reg.* 00: 01-10.
- Leshem Y.Y., 1992. Plant membrane biophysics in development and senescence. In: Leshem, Y. Y., ed. *Plant Membranes: a biophysical approach to structure, development and senescence*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 111-154.
- Leshem Y.Y., Haramaty E., Iluz D., Malik Z., Sofer Y., Roitman L., Leshem Y., 1997. Effect of stress nitric oxide (NO): interaction between chlorophyll fluorescence, galactolipid fluidity and lipoxygenase activity. *Plant Physiol Biochem* 35: 573–579.

- Li H.T., Samouilov A., Liu X.P., Zweier J.L., 2004. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. *J. Biol. Chem.* 279: 16939-16946.
- Livne A. & Vaadia U., 1972. Water deficits and hormone relations. In: T. T. Koslowski (Ed), *Water Deficits and Plant Growth*, Vol 3. Academic Press, New York, pp. 255-272.
- Loggini B., Scartazza A., Brugnoli E., Navari-Izzo F., 1999. Antioxidant defense system, pigment composition, and photosynthetic efficiency in two wheat cultivars subjected to drought. *Plant Physiol* 119: 1091–1099.
- Ludewig M., Dörffling K., Siefert H., 1988. Abscisic acid and water transport in sunflowers. *Planta* 175: 325-333.
- Ludlow M.M., 1987. Contribution of osmotic adjustment to the maintenance of photosynthesis during water stress. In: *Progress in Photosynthesis Research*. Vol 4 J. Biggins (Ed), Martinus Nijhoff, Dordrecht, The Netherlands pp. 161-168.
- Machado R.C.R., Rena A.B., Vieira C., 1976. Efeito da desidratação osmótica no acúmulo de prolina livre nos discos foliares de vinte cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres* 13: 55-60.
- Magalhaes J.R., Pedroso M.C., Durzan D., 1999. Nitric oxide, apoptosis and plant stress. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 5: 115-125.
- Magalhaes J.R., Monte D.C., Durzan D., 2000. Nitric Oxide and Ethylene Emission in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Mol. Biol. Plants* 6: 117-127.
- Magalhaes J.R., Silva F.L.I.M., Salgado I., Ferrarese-Filho O., Rockel P., Kaiser W.M., 2005. Nitric oxide produced by Nitrate Reductase in Higher Plants. In: *Nitric Oxide Signaling in Higher Plants* (Magalhaes J.R., Singh R.P. (Eds) Studium Press LLC, Houston Texas, USA, pp 167-181.
- Marcos Filho J., 1986. Germinação de sementes. In: *Semana de Atualização em Produção de Sementes*, 1., Piracicaba, 1986. Trabalhos apresentados. Campinas: Fundação Cargill, pp. 11-39.
- Markeev A.V., Krendeleva T.E., Mokronosov A.T., 1992. Photosynthesis and abscisic acid. *Rev. Soviet Plant Physiol.* 39: 118-127.

- Martinoia E., Schramm M. J., Kaiser G., Kaiser W. M., Heber U., 1986. Transport of anions in isolated vacuoles. 1 . Permeability to anions and evidence for a Cl<sup>-</sup> uptake system. *Plant Physiol* 80: 895-901
- Mata, C. G.; Lamattina, L., 2001. Nitric Oxide Induces Stomatal Closure and Enhances the Adaptive Plant Responses against Drought Stress. *Plant Physiology*, 126 1196-1204
- MeBmer U.K., Ankarcrona M., Nicotera P., Brune B., 1994. Expression in nitric oxide induced apoptosis. *FEBS Lett.* 355(1): 23-26
- Meidner, H. & Mansfield, T. A., 1968. *Physiology of stomata*. McGraw-Hill Publishing Company Limited, Maidenhead, Beckshire England, 96 p.
- Meyer, T.; Hanson, P. I.; Stryer, L.; Schulman, H., 1992. Calmodulin Trapping by Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase. *Science*, 256: 1199-1202
- McCue K.F., Hanson A.D., 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol* 8: 358–363
- Michan, S., Lledias, F., Baldwin, J.D., Natvig, D.O., Hansberg, W., 2002. Regulation and oxidation of two large monofunctional catalases. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 521–532.
- Modolo L. V., Ohara A., Almeida I. M. G., Magalhães J. R., Salgado I., 2005. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett.* 579: 3814–3820
- Moilanen E, Vapaatalo H, 1995. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 27: 359–367
- Moncada S., 1998. Nitric oxide as a biological mediator-A ten year perspective. *Nitric oxide: Basic Research and Clinic Application-Extensive Abstracts*, 1: 6-11.
- Mooney, N. P., 1989. Osmotic Pressure of Aqueous Polyethylene Glycols. Relationship between Molecular Weight and Vapor Pressure Deficit. *Plant Physiology*, 91: 766-769
- Morgan, J. M., 1984. Osmoregulation and water stress in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35 299-319
- Morot-Gaudry-Talarmain Y., Rockel P., Moureaux T., Quilleré I., Leydecker M.T., Kaiser W.M., Morot-Gaudry J.F., 2002. Nitrite accumulation and nitric oxide

- emission in relation to cellular signaling in nitrite reductase antisense tobacco. *Planta* 215: 708-715
- Mott K.A., Buckley T.N., 2000. Patchy stomatal conductance in emergent collective behavior of stomata. *Trends Plant Sci* 5: 258–262
- Muir S.R., Sanders D., 1996. Pharmacology of Ca<sup>2+</sup> release from red beet microsomes suggests the presence of ryanodine receptor homologs in higher plants. *FEBS Lett* 395: 39–42
- Mullet, J. E., Whitsitt, M. S., 1996. Plant cellular responses to water deficit. *Plant Growth Regulation*, 20: 119-124
- Nilsen E. T., Orcutt D., 1996. The physiology of plants under stress: Abiotic factors. John Wiley & Sons. Inc., New York 694pp
- Ninnemann, H., Maier, J., 1996. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photocondiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.*, 64: 393-398
- Norton, C. R., 1986. Germination under flooding: metabolic implications and alleviation of injury. *Hortscience*, 21: 1123-1125
- O'Toole, J. C.; Crookston, R. K.; Therarne, K. J.; Ozbun, J. L., 1976. Mesophyll resistance and carboxylase activity. A comparison under water stress conditions. *Plant Physiology*, 57: 465-468
- Pardossi, A.; Vernieri, P.; Tognoni, F., 1992. Involvement of abscisic acid in regulating water status in *Phaseolus vulgaris* L. during chilling. *Plant Physiology*, 100: 1243-1250
- Parsons, L. R. & Howe, T. K., 1984. Effects of water stress on the water relations of *Phaseolus vulgaris* and the drought resistant *Phaseolus acutifolius*. *Physiologia Plantarum*, 60: 197-202
- Peske, S. T. & Delouche, J. C., 1985. Semeadura de soja em condições de baixa umidade do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 20: 69-85
- Pham Thi, A. T.; Borrel-Flood, C.; Vieira da Silva, J.; Justin, A. M.; Mazliak, P., 1987. Effects of drought on [1-<sup>14</sup>C]-oleic and [1-<sup>14</sup>C]-linoleic acid desaturation in cotton leaves. *Physiologia Plantarum*, 69: 147-150
- Rena, A. B. & Masciotti, G. Z., 1976. Efeito do déficit hídrico sobre o metabolismo do nitrogênio e o crescimento de quatro cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). *Revista Ceres*, 23 (128) 288-301

- Repelin, A.; Laffray, D.; Daniel, C.; Braconnier, S.; Zuilly-Fodil, Y., 1997. Water relations and gas exchange in young coconut palm (*Cocos nucifera* L.) as influenced by water deficit. *Canadian Journal of Botany*, 75 18-27
- Ribeiro E.A., Cunha F.Q., Tamashiro S.C., Martins I.S., 1999. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Lett.*, 445:283-286.
- Ried J.L., Walker-Simmons M.K., 1993. Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiol* 102: 125–131
- Rockel P., Strube F., Rockel A., Wildt J., Kaiser W.M., 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* 53: 103-110.
- Santarius, K. A., 1967. Assimilation of CO<sub>2</sub>, NADP, and PGA reduction and ATP synthesis in intact leaf cells in relation to water content. *Planta*, 73 228-242
- Schwab, K. B. & Gaff, D. F., 1986. Sugar and ion content in leaf tissues of several drought tolerant plants under water stress. *Journal of Plant Physiology*, 125 257-265
- Sharkey, T. D. & Seemann, J. R., 1989. Mid water stress effects on carbon-reduction-cycle intermediates, ribulose biphosphate carboxylase activity, and spatial homogeneity of photosynthesis in intact leaves. *Plant Physiology*, 89 1060-1065
- Silva, W. R., 1989. Relação entre disponibilidade de água, tratamento, fungicida e germinação de sementes de milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 113pp. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo
- Singh, T. N.; Paleg, L. G.; Aspinal, D., 1973. Stress metabolism III. Variations in response to water deficit in the barley plant. *Australian Biology Science*, 26 65-76
- Smirnoff, N., 1993. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytology*, 125 27-58
- Stalfelt, M. G., 1955. The stomata as a hydrophotic regulator of the water deficit of the plant. *Physiologia Plantarum*, 8: 572-593

- Stanler J.S., Singel D., Loscalzo J., 1992. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*. 158 (18): 1898-1901.
- Stewart, C. R., 1972. Effects of proline and carbohydrates on the metabolism of exogenous proline by excised bean leaves in the dark. *Plant Physiology*, 50 551-555
- Subbarao, G. V.; Johansen, C.; Slinkard, A. E.; Nageswara Rao, R. C.; Saxena, N. P., Chauhan, Y. S., 1995. Strategies for improving drought resistance in grain legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 14 469-523
- Swire-Clark G.A., Marcotte W.R. Jr., 1999. The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Mol Biol* 39: 117–128
- SYSTAT Version 8.0 Copyright © SPSS Inc., 1998. All rights reserved. Standard Version
- Tucker S.L., Talbot N.J., 2001. Surface attachment and prepenetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 39, 385–417.
- Turner, N. C. & Jones, M. M., 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment: A review and evaluation. In *Adaptations of Plants to Water and High Temperature Stress*. Turner, N.C. & Kramer, P. J. Eds., Wiley, New York 87-103pp
- Volk T., Mading K., Hensel M., Kox W.J., 1997. Nitric oxide induces transient Ca<sup>2+</sup> changes in endothelial cells independent of cGMP. *J Cell Physiol* 172: 296–305
- Wang J. and Higgins V.J., 2005. Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genetics and Biology* 42: 284–292
- Warwar V., Dickman M.B., 1996. Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, 74–79.
- White, J. W., 1988. Preliminary results of the bean international drought trial (BIDYT). In: *Research on Drought Tolerance in Common Bean*. (White, J. W.; G. Hoogenboom; F. Ibarra; S. P. Singh. Eds.). CIAT, Cali, Colômbia

- Wildt J., Kley D., Rockel A., Rockel P., Segschneider H.J., 1997. Emission of NO from several higher plant species. *J. Geophys. Research.* 102(5): 5919-5927.
- Wink D.A., Hanbauer L., Krishna M.C., DeGraff W., 1993. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9813-9817
- Wright, G. C.; Smith, R. C.; McWilliam, J. R., 1983. Differences between two grain sorghum genotypes in adaptation to drought stress. III Physiological responses. *Australian Journal of Agriculture Resources*, 34 637-651
- Wu Y., Kuzma J., Marechal E., Graeff R., Lee H.C., Foster R., Chua N-H., 1997. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. *Science* 282: 226-230
- Yamasaki H., Sakihama Y., Takahashi S., 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Sci.* 4(4): 128-129.
- Yamasaki H., 2000. Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. In: *NO Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series-B. Biological Sciences.* 355(1402): 1477-1488
- Yang Z., Dickman M.B., 1997. Regulation of cAMP and cAMP dependent protein kinase during conidial germination and appressorium formation in *Colletotrichum trifolii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50, 117-127.
- Young, J. A.; Evans, R. A.; Roundy, B.; Cluff, G., 1983. Moisture stress and seed germination. Oakland, USDA/ARS, 41pp
- Yu X.D., Sukumaran S., Marton L. 1998. Induced nitrate reductase activity is correlated with increased *nia1* transcription and mRNA levels. *Plant Physiol.* 116(3): 1091-1096
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T.D., Wu R., 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol* 110: 249-257
- Zimmer-Prados, L., Ranieri, B. D., Lemos-Filho, J. P., Vale, F. H. A., França, M. G. C., 2007. Drought stress and tolerance mechanisms in *Lavoisiera campos-*

portoana (Melastomataceae) an endemic species from the “campos rupestres” of Brazil. Em preparação

Zhang Z., Naughton D., Winyard P.G., Benjamin N., Blake D.R., Symons M.C.R., 1998. Generation of Nitric Oxide (NO) by a Nitrite Reductase Activity of Xanthine Oxidase: A Potential Pathway for NO Formation in the Absence of NO Synthase Activity. *Biochem. Biophysical Research Communications*. 249 (3): 767-772.

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 Physiol* 144: 206-217