Ilton Yoshio Narita

Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro.

Analysis of nitric oxide produced during the induction of the adventitious organogenesis in basal leaves of pineapple.

São Paulo

2010

Ilton Yoshio Narita

Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro.

Analysis of nitric oxide produced during the induction of the adventitious organogenesis in basal leaves of pineapple.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção de Título de Mestre em Ciências, na Área de Botânica.

Orientadora: Profª Drª Helenice Mercier

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica

Narita, Ilton Yoshio

Análise do óxido nítrico produzido durante a indução da organogênese adventícia em bases foliares de abacaxizeiro.

Número de páginas: 91

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Organogênese vegetal 2. *Ananas comosus* 3. Óxido Nítrico 4. Peróxido de hidrogênio

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

_____ _____

Prof(a). Dr(a). Prof(a). Dr(a).

_____

Profª Drª Helenice Mercier

Orientadora

Dedicatória

Aos meus pais e irmãos pelo apoio

irrestrito em todos os momentos

de minha vida.

Epígrafe

"Life is too short to be interested in everything,

but it is good to be interested in as many things

as are necessary to fill our days."

Bertrand Russell

(The conquest of happiness, p. 160, 1930)

Agradecimentos

À Profª Drª Helenice Mercier, pela oportunidade e por ter acreditado na realização deste trabalho, e também pela orientação, incentivo e amizade durante esses anos de convívio, bem como pelo seu exemplo de dedicação à pesquisa e às pessoas.

Ao Profº Drº Gilberto Barbante Kerbauy, pela amizade e apoio, exemplo de dedicação, humildade, competência profissional e pelo seu entusiasmo pela pesquisa.

Ao Luciano, ex-aluno e atual professor, pela sua amizade e exemplo de dedicação à pesquisa, pela sua ajuda incondicional, criatividade e entusiasmo.

À Aline Bertinatto, Aline Tiemi, Auri, Camila, Cássia, Cíntia, Lia, Lucas, Malka, Paula Natália, pelo apoio, amizade, convívio diário e espírito de colaboração, respeito mútuo, e por tornarem agradável o ambiente de trabalho.

Aos demais integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal/IBUSP: Adriana Grandis, Adriana Yepes, Aline Cavalari, Augusto, Amanda, Bruna, Flavia, Giovanna, Ivan, Leila, Laura, Luis, Maraba, Mari, Patrícia Pinho, Paulo "Perdigão", Priscila, Sandra, Thalita, Tunico. Agradeço pela amizade e pelo agradável convívio diário.

À Alessandra, pela sua amizade, alegria e pelas muitas conversas descontraídas que tivemos.

Ao Paulo, Alejandra, Nielda e Katherine, pela amizade, entusiasmo e pela disposição em sempre ajudar.

Às técnicas Ana Maria, Eglee, Ingrid, Paula, pela amizade, apoio e disposição em ajudar.

A todas as pessoas do Laboratório de Anatomia Vegetal/IBUSP, em especial a Paula e a Gisele pelo apoio técnico e logístico.

Aos docentes do Laboratório de Anatomia Vegetal/IBUSP, em especial a Profª Drª Nanuza, a Profª Drª Gladys, o Profº Drº Gregório e a Profª Drª Verônica, pela disponibilização dos equipamentos e acesso ao Laboratório aos finais de semana.

Aos secretários do Departamento de Botânica (Carlos, Cesário e Norberto) e da Seção de Pós-Graduação (Érika, Helder e Vera) pelo atendimento e pelo auxílio nas questões burocráticas.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado.

São Paulo

2010

I - INTRODUÇÃO

I.1. O Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) foi descoberto pelo químico inglês Joseph Priestly em 1772. Inicialmente identificado como gás nitroso, naquela época nenhuma função foi atribuída a esse radical, exceto a de ser um constituinte da poluição atmosférica, encontrado na fumaça liberada pelas indústrias e cigarros.

Entretanto, a percepção sobre a importância do composto mudou radicalmente em 1992, quando o óxido nítrico foi considerado a molécula do ano pela revista *Science*. Posteriormente, o NO foi considerado a droga da década, quando a sua função sinalizadora foi atribuída a uma série de eventos fisiológicos, dentre eles: vasodilatação, atuando como um fator de relaxamento endotelial; inibição da agregação de plaquetas; distribuição da perfusão renal; broncodilatação; controle do movimento peristáltico; neurotransmissão; armazenamento de memórias e lembranças; citotoxicidade do sistema imune e potência masculina (Konstadt, 1995).

Posteriormente em 1998, o prêmio Nobel de Fisiologia foi concedido aos pesquisadores Ferid Murad, Robert Furchott e Louis Ignarro pela descoberta da função sinalizadora do óxido nítrico para o sistema cardiovascular. Assim, o papel que o óxido nítrico desempenha foi descoberto inicialmente para organismos animais (mamíferos) e desde então tem sido constatado cada vez mais que esse radical é um sinalizador universal, atuando em muitas vias fisiológicas.

O estudo da função do óxido nítrico em plantas teve início no final da década de 70 (Klepper, 1979), quando foi constatado que a sua produção em plantas de soja tratadas com herbicidas era diretamente proporcional à quantidade utilizada do agente químico. Entretanto, a compreensão de que o óxido nítrico participa de um grande número de eventos fisiológicos nas plantas adveio de resultados de pesquisas mais recentes.

O interesse em identificar um sistema de produção de óxido nítrico em plantas levou à identificação da atividade da enzima sintase de óxido nítrico, a qual mostrou ser distinta da encontrada em mamíferos, em raízes e nódulos da leguminosa *Lupinus albus* (Cueto *et al.*, 1996); em *Arabidopsis thaliana* foi identificado o gene *AtNOS1,* responsável pela superprodução de NO em plantas mutantes (Guo *et al.*, 2003). Apesar de vários grupos de pesquisa defenderem a idéia da existência de uma enzima NOS responsável pela rota de síntese de óxido nítrico dependente da L-arginina e de terem observado a sua atividade em vários tecidos e, a nível celular, em organelas como mitocôndrias e perixossomos, até o presente momento não foram identificados nem a enzima e nem o gene homólogo ao da NOS animal em plantas (Besson-Bard et al., 2009). Atualmente, a principal via enzimática comprovada de produção de óxido nítrico é a da redutase do nitrato.

A proposta de um modelo hipotético de atuação do NO no sistema de defesa vegetal envolve a sua atuação intracelular na ativação da transcrição dos genes relacionados à defesa. Acredita-se que o desenvolvimento da resistência sistêmica adquirida envolva a associação do óxido nítrico com moléculas de S-nitroso-glutationa, atuando como sinalizadores a longa distância transportados pelo floema (Durner e Klessig, 1999). Além disso, constatou-se que o óxido nítrico apresenta capacidade de indução à morte celular programada em células de calos e folhas de *Kalanchoe daigremontiana* e *Taxus brevifolia* (Pedroso *et al.*, 2000).

Foi constatado que o óxido nítrico desempenha uma série de funções nas situações de estresse para as plantas, tais como a indução do fechamento estomático em período de seca, reduzindo dessa maneira a perda de água por transpiração (García-Mata e Lamattina, 2001), neutralização do efeito de metais pesados e salinidade em *Lupinus luteus* (Kopyra e Gwózdz, 2003), redução da toxicidade provocada pelo alumínio por meio da redução do estresse oxidativo em raiz de *Cassia tora L.* (Wang e Yang, 2005) e aumento da resistência à injúria mecânica em folhas de tomateiro (París *et al.*, 2007).

Quanto ao crescimento e desenvolvimento das plantas, constatou-se que o NO atua de muitas formas, como, por exemplo, estimulando a germinação de sementes

(Kopyra e Gwózdz, 2003); regulando o crescimento e orientação do tubo polínico (Prado *et al.*, 2004); induzindo a xilogênese, controlando a morte celular programada e a lignificação da parede celular (Gabaldón *et al.*, 2005, Neill, 2005); formando raízes adventícias (Pagnussat *et al.*, 2002) e nódulos em leguminosas (Pii *et al.*, 2007). Foi observada uma correlação negativa entre a produção de óxido nítrico e ácido abscísico durante a senescência de tecidos (Leshem e Pinchasov, 2000); essa mesma correlação foi encontrada em relação ao etileno durante a maturação de frutos (Magalhaes *et al.*, 2000). O óxido nítrico é capaz, ainda, de induzir a fotossíntese CAM em *Ananas comosus* que, sem o estímulo dado por esse radical, apresenta comportamento C3 (Freschi *et al.*, 2010).

Até o estágio atual das pesquisas, há poucos estudos relacionando o óxido nítrico com o processo de organogênese vegetal. Um desses estudos diz respeito à necessidade do óxido nítrico para a organogênese de raízes adventícias em plantas de pepino (Pagnussat *et al.*, 2002). Recentemente, foi constatada a relação dose-dependente entre óxido nítrico e peróxido de hidrogênio na formação de raízes adventícias da *Tagetes erecta* L. 'Marvel' (Liao *et al.*, 2009).

O papel do óxido nítrico como molécula sinalizadora apresentado por diversos grupos mostra o seu envolvimento em uma série de vias metabólicas, variando desde defesa em plantas até vários aspectos do desenvolvimento. No entanto, ainda há uma grande escassez de informação no que concerne à organogênese e esse foi um dos motivos que levou à realização do presente trabalho.

I.2. A Química do Óxido Nítrico

O óxido nítrico é uma molécula diatômica, composta por um átomo de oxigênio e um de nitrogênio. A presença de um elétron desemparelhado no orbital π confere à molécula uma alta reatividade e, geralmente, uma meia-vida que varia de um a dez segundos. Foi demonstrado que a reação do óxido nítrico com o oxigênio no ar é cerca de 300 vezes mais rápida que na fase aquosa, devido à maior concentração de oxigênio (Nagano e Yoshimura, 2002). Além disso, foi estimado que em meio fluido contendo uma concentração de óxido nítrico de 1 μM e de oxigênio inferior a 100 μM, a meia-vida do radical pode chegar a 15 minutos.

Assim, a meia-vida do radical depende do meio que o envolve. Quando o óxido nítrico está dissolvido na água, ele é relativamente estável; por outro lado, na presença de ar, o óxido nítrico reage rapidamente com o oxigênio, formando dióxido de nitrogênio (Konstadt, 1995). As equações a seguir mostram as reações que ocorrem com o óxido nítrico dissolvido em água (1) e no ar (2).

$$^{(1)}\ 4NO + O_2 + 2H_2O \rightarrow 4NO_2^- + 4H^+$$

$$^{(2)}\ NO + \tfrac{1}{2}\, O_2 \rightarrow NO_2$$

A produção de óxido nítrico ocorre tanto pela ação do homem quanto naturalmente. A produção antropogênica do radical tem ocorrido ao longo do tempo desde o início da era industrial. Atualmente, com o desenvolvimento tecnológico, bem como a conscientização das pessoas sobre os impactos provocados pela poluição do ar, medidas têm sido adotadas para se reduzir a emissão de gases para a atmosfera – um exemplo é o tratamento dos gases liberados pelas indústrias e automóveis, através de filtros especiais e uso de catalisadores. Na natureza, a forma mais comum de produção de óxido nítrico ocorre durante a ocorrência de relâmpagos, que provoca a reação do nitrogênio com dióxido de carbono, formando o radical livre. Quando o radical reage com o

oxigênio, ocorre a formação de dióxido de nitrogênio que reage com a água, formando a chuva ácida.

O óxido nítrico é um gás tóxico, corrosivo, inodoro e levemente solúvel em água. A sua solubilidade em meio aquoso livre de oxigênio é de 1,9 mM a 25°C. Trata-se de um radical solúvel em solventes orgânicos, tais como metanol (14 mM), tolueno (11 mM) e n-hexano (18 mM) – assim, sugere-se que o óxido nítrico é lipossolúvel e que pode ser rapidamente transportado através da membrana celular (Nagano e Yoshimura, 2002).

Além da forma molecular, a existência do óxido nítrico pode ocorrer em outras formas, de maneira intercambiável, como: radical ($NO^{\bullet}$); cátion nitrosonium (NO^{+}) e radical nitroxil (NO^{-}) (Neill *et al.*, 2003).

Quanto ao modo de ação, o óxido nítrico pode agir de maneira direta ou indireta: na primeira, o radical pode interagir diretamente com biomoléculas, metais complexos e outros radicais livres; por outro lado, o óxido nítrico pode interagir indiretamente, através da sua reação com oxigênio ou superóxido, formando espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês "reactive nitrogen species") capazes de reagir com DNA, proteínas e lipídios (Wink e Mitchell, 1998).

Altas concentrações de NO resultam na produção do peroxinitrito, o qual exerce efeitos deletérios sobre lipídios, DNA e proteínas, da mesma maneira que as espécies derivadas de oxigênio, como o radical hidroxil.

I.3. A Biossíntese do Óxido Nítrico

A biossíntese do óxido nítrico em mamíferos

O óxido nítrico, em animais (mamíferos), pode ser produzido de forma constitutiva ou indutiva pela enzima sintase de óxido nítrico (NOS – do inglês "*Nitric Oxide Synthase"*). A produção constitutiva de óxido nítrico ocorre na presença de cálcio e das enzimas NOS, as quais estão localizadas no endotélio, plaquetas, neurônios e outros tecidos. A produção é transitória e a concentração do radical produzido é da ordem de picomolar. Por outro lado, a produção indutiva do óxido nítrico independe da presença de cálcio e ela se mantém por horas, na ordem de nanomolar – essa alta produção promove a citotoxicidade pelo radical, que desempenha função na imunidade celular. (Konstadt, 1995).

A produção de óxido nítrico pela enzima NOS não é a única via disponível para os animais. Foi constatado que a produção do radical a partir do nitrito ocorre sob condições específicas e que é importante para a vasodilatação em situação de hipóxia. Adicionalmente, estudos *in vitro* demonstraram que as enzimas óxido-redutases, sob hipóxia, também geram óxido nítrico através da redução do nitrito. O nitrito pode funcionar como um sinal único e significante durante um amplo leque de processos fisiológicos e fisiopatológicos, incluindo a alteração da expressão gênica, modificação da sinalização promovida pelo cGMP, inibição da atividade do citocromo P450 e nitrosilação de proteínas (Bright *et al*., 2009).

A tabela 1 lista os principais genes responsáveis pela codificação da enzima NOS em mamíferos (Palavan-Unsal e Arisan, 2009). Recentemente, foi descoberta também a produção mitocondrial de óxido nítrico.

Tabela 1 - Principais genes responsáveis pela produção de óxido nítrico em mamíferos. NOS: "*Nitric Oxide Synthase*", ou seja, sintase do óxido nítrico.

Genes sintase do óxido nítrico	Tamanho
Endotelial (eNOS)	135 kDa
Neuronal (nNOS)	160 kDa – é a enzima com maior tamanho
Formas induzidas (iNOS)	130 kDa – sua expressão é aumentada na presença de interferon
Mitocondrial (mNOS)	Descoberta recentemente

A biossíntese do óxido nítrico em plantas

Em plantas foram propostas, inicialmente, três vias de produção de óxido nítrico: uma não-enzimática e duas enzimáticas, sendo que uma das vias enzimáticas envolve a participação de enzima com atividade semelhante a NOS e a outra é dependente da atividade da enzima redutase do nitrato (Neill *et al.*, 2003).

A via não-enzimática ocorre sob condições específicas em compartimentos acidificados (pH inferior a 4,5 e pK de aproximadamente 3,2), como é o caso do apoplasto, local onde ocorre a redução do nitrito (Bethke *et al.*, 2004, Planchet e Kaiser, 2006).

A proposta de produção de óxido nítrico em plantas através de uma enzima NOS, a exemplo do que ocorre em animais, tem sido tema muito controverso entre a comunidade científica. Nessa via, a enzima NOS promove a conversão da L-arginina em L-citrulina na presença de O_2 e NADPH, gerando óxido nítrico, água e $NADP^+$como subprodutos.

Em cloroplastos é possível que a produção de NO seja devido a ocorrência de ambas as vias, tanto a da enzima semelhante a NOS quanto a da redutase do nitrato (Jasid *et al.*, 2006).

A proposta de produção de óxido nítrico pela NOS não é a mais aceita atualmente, uma vez que até agora essa enzima não foi detectada em plantas. Além disso, não foi localizada uma seqüência homóloga para o gene *NOS* de mamíferos em *Arabidopsis thaliana*, espécie cujo genoma já se encontra completamente seqüenciado (Planchet e Kaiser, 2006, Yamasaki *et al.*, 1999).

A principal via conhecida de biossíntese de óxido nítrico faz parte do metabolismo do nitrogênio e envolve a participação da enzima nitrato redutase que, além de catalisar a oxidação do nitrato (NO_3^-) em nitrito (NO_2^-) é responsável pela oxidação do nitrito em óxido nítrico (Planchet e Kaiser, 2006, Crawford, 2006). A equação seguinte mostra como ocorre a produção de óxido nítrico pela via da redutase do nitrato.

$$NO^-_3 \xrightarrow{NR} NO^-_2 \rightarrow NO$$

Posteriormente, outros mecanismos de síntese de óxido nítrico pela ação da enzima nitrito redutase foram descobertos. Dentre eles, constatou-se a produção de óxido nítrico pelos cloroplastos de soja - *Glycine max* var ADM 4800 (Jasid *et al.*, 2006). Resumidamente, as principais vias de produção de óxido nítrico em plantas estão listadas na tabela 2.

Tabela 2 - Principais vias conhecidas de produção de óxido nítrico em plantas.

Tipo de produção	Via de produção	Características
Não enzimática	Apoplasto	Redução do nitrito; pH < 4,5; pK ~3,2.
Enzimática	Enzimas semelhantes a NOS	Enzimas ainda não identificadas. Produção de NO em diversos tecidos e organelas (mitocôndria e perixossomo).
	Nitrato/Nitrito redutase	Redução do nitrato em nitrito e do nitrito em óxido nítrico.
	Ni:NOR	A enzima nitrito:NO oxidorredutase promove a redução do nitrato à nitrito no apoplasto em raízes.

I.4. Papel do Óxido Nítrico

O papel do óxido nítrico em mamíferos

O óxido nítrico é a segunda molécula gasosa com função sinalizadora reconhecida pela ciência – antes do NO, apenas o etileno desempenhava tal papel (Wojtaszek, 2000). Desde a sua descoberta, uma série de funções importantes tem sido atribuída ao óxido nítrico, demonstrando a importância universal que o radical possui como molécula sinalizadora. A tabela 3 mostra as principais funções desempenhadas pelo óxido nítrico, em mamíferos.

Tabela 3 - Relação das múltiplas funções que o óxido nítrico (NO) desempenha em mamíferos. Modificado de Wink e Mitchell, 1998.

Papel	Efeitos	
Protetor	Antioxidante	
	Inibição da adesão de leucócitos	
	Proteção contra a toxicidade dada pelos fatores de necrose tumoral	
Regulatório	Tônus vascular	
	Adesão celular	
	Permeabilidade vascular	
	Neurotransmissão	
	Broncodilatação	
	Inibição da adesão de plaquetas	
	Supervisão do sistema imune	
	Função renal	
Deletério	Inibição do funcionamento de enzimas	
	Indução de danos ao RNA	
	Indução da peroxidação de lipídeos	
	Aumento da susceptibilidade à:	Radiação Agentes alcalinizantes Metais tóxicos
	Exaurimento das reservas de antioxidantes	

O óxido nítrico pode atuar de forma direta, como um radical livre, ou de forma indireta, através de compostos resultantes da sua reação com o oxigênio (O_2) ou com o radical superóxido (O_2^-), por exemplo, dando origem às espécies reativas de nitrogênio. No primeiro caso, o óxido nítrico pode interagir diretamente com metais complexos, presentes na hemoglobina/mioglobina, com a enzima guanilato ciclase, com o citocromo P450 e com proteínas responsivas à união com ferro. Além disso, o óxido nítrico pode reagir com radicais de alta energia, tais como radicais baseados em carbono, lipídios e dióxido de nitrogênio. No segundo caso, o óxido nítrico reage com o oxigênio ou o radical superóxido, formando as espécies reativas de nitrogênio, que podem catalizar as seguintes reações: nitrosação, formando como produtos nitrosamina e s-nitrosotiol; oxidação, resultando na quebra de moléculas de DNA, peroxidação de lipídios e hidroxilação; e nitração, formando nitrotirosina.

O papel do óxido nítrico em plantas

Apesar dos estudos relacionando o papel do óxido nítrico em plantas terem começado depois do reconhecimento da importância do radical em muitos processos fisiológicos em mamíferos, uma série de descobertas foi realizada e constatou-se a importância que o NO desempenha em muitos processos do crescimento e desenvolvimento (tabela 4), bem como nas situações de estresses biótico e abiótico.

Tabela 4 - Efeitos do óxido nítrico no crescimento e desenvolvimento das plantas. Modificado de Palavan-Unsal e Arisan, 2009.

	Processo fisiológico	Efeito
Crescimento e Desenvolvimento	Expansão foliar	Indução
	Crescimento radicular	Indução
	Senescência	Retardo
	Germinação de semente	Estimulação
	Desestiolamento	Estimulação
	Alongamento do hipocótilo	Inibição
	Amadurecimento de frutos	Inibição
	Abertura/Fechamento estomático	Estimulação/Inibição

I.5. Metodologia de Pesquisa do NO

As pesquisas sobre o papel que o óxido nítrico desempenha em um determinado processo fisiológico envolvem três abordagens básicas, pré-requisitos para o desenvolvimento de estudos subseqüentes. São elas: emprego de substâncias doadoras ou seqüestradoras de óxido nítrico, a utilização de uma ou mais técnicas para fazer a quantificação do radical e o emprego de algum marcador para a visualização *in situ* dos locais de produção na célula e/ou tecido animal ou vegetal.

I.5.1. Substâncias Doadoras ou Seqüestradoras de NO

Os principais fatores limitantes para a realização de estudos sobre os possíveis papéis que o óxido nítrico desempenha em plantas se devem à falta de mutantes com produção diferencial de NO e ao desconhecimento das moléculas capazes de perceber e traduzir os sinais fornecidos pelo NO (Ederli *et al*., 2009).

Assim, o emprego de substâncias doadoras ou seqüestradoras de óxido nítrico tem sido uma ferramenta amplamente utilizada para realizar estudos de suas funções. Por meio do fornecimento ou seqüestro do radical é possível analisar os efeitos fenotípicos provocados no vegetal em estudo ou, ainda, realizar análises proteômicas e genômicas.

Os reagentes mais utilizados na doação de óxido nítrico são o nitroprussiato de sódio (NPS) e o S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP). Para o sequestro do óxido nítrico, são utilizados o 2-fenil-4,4,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (PTIO) e o sal de potássio (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO).

O cPTIO é um reagente usado como seqüestrador de óxido nítrico, muito utilizado nos mais variados tipos de estudos envolvendo o radical. O seu modo de ação consiste na sua reação com o NO, formando carboxi-PTI e dióxido de nitrogênio (Cao e Reith, 2002). A figura 1 mostra a molécula de cPTIO e a sua reação com o óxido nítrico.

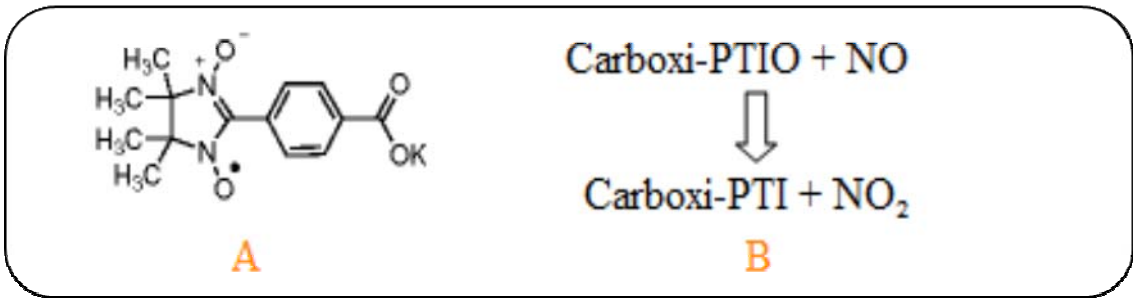


Figura 1 - (A) Molécula de carboxi-PTIO - sal de potássio 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5,-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (Sigma-Aldrich®); (B) Reação do cPTIO com o óxido nítrico, formando carboxi-PTI e NO_2. Fórmula Molecular: $C_{14}H_{16}KN_2O_4$; Peso molecular: 315,39.

I.5.2. Técnicas de Quantificação

Várias técnicas foram desenvolvidas para realizar a quantificação de óxido nítrico e cada uma delas apresenta vantagens e desvantagens em relação ao material que será analisado, que pode ser desde uma planta inteira até um extrato de células, um purificado de mitocôndria ou um purificado da redutase do nitrato (Planchet e Kaiser, 2006).

Há técnicas que permitem quantificar óxido nítrico em tempo real, ou seja, à medida que o radical é liberado pelo material que está sendo analisado. Nesse caso, o material é preservado e permite a sua utilização para outras análises como, por exemplo, quantificação de etileno, dosagem hormonal ou análise proteômica. Entretanto, técnicas que permitem a quantificação de óxido nítrico sem a destruição do material dependem da quantidade do radical produzido, uma vez que é necessário ocorrer a sua difusão para o meio externo, ou seja, para fora das

células e tecidos, de maneira a permitir a sua detecção. Assim, a vantagem de não ter que destruir o material para determinar a quantidade de radical produzido revela uma desvantagem técnica quando o óxido nítrico produzido é liberado em quantidade muito pequena, em concentrações insuficientes para, a partir do local de produção, atravessar organelas, células, tecidos e alcançar o meio externo. Neste caso, as chances de detecção diminuem muito. Uma alternativa a ser adotada é aumentar o número amostral do material, na expectativa de aumentar a concentração de óxido nítrico liberado passível de detecção.

Dentre as técnicas não-invasivas para a detecção de óxido nítrico podemos citar a detecção laser-fotoacústica, a espectrometria de ressonância de spin eletrônico e a quimiluminescência. Por outro lado, há técnicas que exigem um preparo prévio do material a ser analisado para a quantificação de óxido nítrico, como é o caso em que é necessária a obtenção de um extrato para reação com determinados reagentes.

A técnica de quimiluminescência consiste na reação química do NO com o O_3 (ozônio). Dessa reação é formado NO_2 (dióxido de nitrogênio), sendo que uma proporção é formada em um estado eletronicamente excitado (NO_2*) – ao retornar para o estado fundamental, ocorre emissão de luz próximo à faixa do infravermelho, a qual pode ser quantificada por um fotomultiplicador(FEELISCH *et al.*, 2002).

A quantificação por quimiluminescência apresenta uma série de vantagens, dentre elas: alta sensibilidade na detecção de óxido nítrico, alcançando a escala de partes por bilhão ou até mesmo partes por trilhão; alta especificidade para detectar o radical; possibilidade de realizar a quantificação em tempo real (Xu *et al.*, 2004).

A quantificação por quimiluminescência associada a técnicas de cultivo *in vitro* é altamente vantajosa no sentido de não envolver microorganismos, pois bactérias e fungos são grandes produtores de óxido nítrico. Desta maneira, a manutenção de

cultivos em meios de culturas isentos e protegidos de elementos contaminantes permite um maior e melhor controle na detecção do radical.

A tabela 5 relaciona as principais técnicas de quantificação de óxido nítrico, divididas em quantificação direta, quando é o próprio radical que é quantificado, e indireta, quando a quantificação do óxido nítrico é realizada por meio de metabólitos estáveis do radical, tais como nitrato, nitrito ou L-citrulina.

Tabela 5 - Relação das técnicas utilizadas na detecção do óxido nítrico, classificadas de acordo com o tipo de detecção: direta, quando é o próprio radical que é quantificado; ou indireta, quando o produto da quantificação são metabólitos biológicos.

	Técnicas de Quantificação	Princípio
Detecção Direta	Quimiluminescência	Reação do óxido nítrico com ozônio ou luminol.
	Fluorimetria	Utilização de um fluoróforo para óxido nítrico.
	Espectrofotometria	Formação do complexo NO-hemoglobina (NOHb)
	Espectrometria de Ressonância de Spin Eletrônico	Uso de armadilhas para o óxido nítrico, tais como hemoglobina, compostos orgânicos e complexos Fe-ditiol-Carbamato
	Detecção eletroquímica	Detecção através de microeletrodos específicos para óxido nítrico
Detecção Indireta	Fluorimetria	Quantificação de metabólitos biológicos estáveis de óxido nítrico ou L-arginina, como nitrato, nitrito e L-citrulina.
	Espectrofotometria	
	Radiometria	

I.5.3. Bioimagens

A obtenção de bioimagens das células e tecidos produtores de óxido nítrico é feita através da utilização de fluoróforos, que funcionam de maneira ótima sob condições específicas. Três famílias principais de fluoróforos foram desenvolvidas para a detecção de óxido nítrico, sendo elas: DAN – Diaminonaftalenos; DAR – Diaminorodaminas; DAF – diaminofluoresceínas acetato.

A etapa de obtenção de bioimagens está intimamente associada à detecção do óxido nítrico, o que permite a identificação dos sítios produtores do radical.

Um dos fluoróforos mais utilizados é a diaminofluoresceína diacetado (DAF-2 DA). O seu modo de ação pode ser dividido em duas etapas (figura 2): na primeira, ao atravessar a membrana da célula, a molécula DAF-2 DA é hidrolisada pela atividade intracelular das esterases de membrana, formando DAF2; rapidamente, na etapa seguinte, a molécula DAF2, na presença de oxigênio, óxido nítrico e sob pH neutro, é convertida em triazol fluoresceína (DAF-2T), que é a forma fluorescente – nessa condição, quando a molécula é excitada com luz na faixa de 450 nm, ocorre emissão de luz verde-esmeralda a 515 nm que pode ser observada, por exemplo, através de microscopia de fluorescência ou microscopia de varredura a laser confocal.

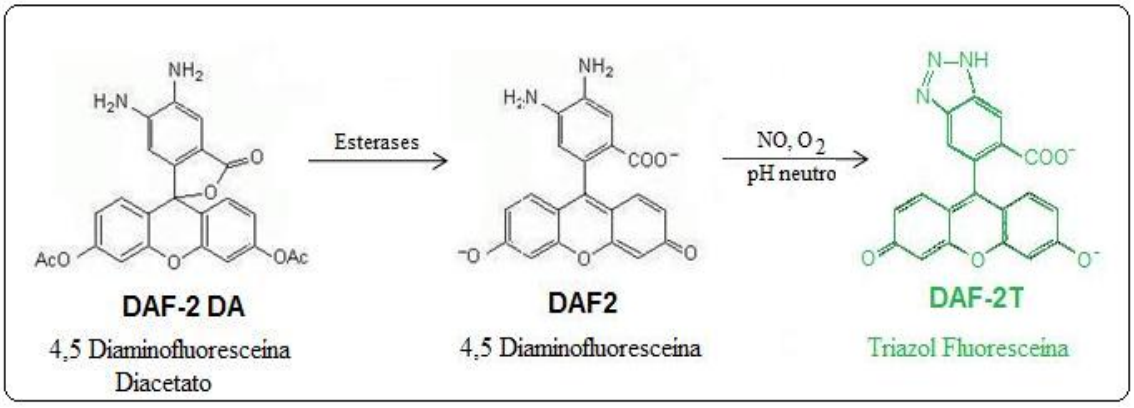


Figura 2 – esquema representativo do modo de ação do marcador para óxido nítrico DAF-2 DA.

Outro fluoróforo bastante utilizado é a diaminorodamina-4M AM (DAR-4M AM). Esse marcador também atravessa a membrana celular e reage com o óxido nítrico, emitindo uma coloração avermelhada a 575 nm quando a molécula é excitada com luz na faixa de 560 nm.

I.6. O Desenvolvimento Vegetal

O desenvolvimento vegetativo de uma planta tem início com a embriogênese, fase na qual se dá o estabelecimento do corpo básico do vegetal e a formação dos meristemas. A capacidade dos meristemas na geração de estruturas altamente repetitivas permite a ocorrência do fenômeno do crescimento indefinido, ou seja, do crescimento aberto. Esse fenômeno é notável em espécies perenes, como é o caso das grandes árvores capazes de crescer por centenas de anos e, em alguns casos, por milhares de anos. Como exemplos da longevidade alcançada por algumas árvores, podemos citar um pinheiro (*Picea abis*) encontrado no Parque Nacional de Fulufjället, província de Dalarna, noroeste da Suécia – a idade da árvore calculada foi de 9.550 anos em 2008. Recentemente, no Condado de Riverside (sul da Califórnia, Estados Unidos), foi encontrada a árvore mais antiga do mundo. Trata-se de um carvalho da espécie *Quercus palmeri* com 13 mil anos, que superou as condições climáticas mais extremas e que tem sobrevivido desde a Era do Gelo (May *et al.*, 2009).

Essa grande longevidade alcançada por algumas espécies se deve ao estabelecimento dos meristemas primários durante a fase de embriogênese. Nesta fase, o padrão axial do embrião, com o estabelecimento da região apical e basal, é determinado logo na primeira divisão do zigoto – posteriormente, depois de algumas divisões celulares, a região apical do embrião dá origem ao meristema apical da parte aérea, enquanto que a região basal dá origem ao meristema da raiz. Logo após a fase de germinação, estes meristemas se tornam ativos, sendo o meristema apical caulinar o responsável pela formação de todos os tecidos e órgãos aéreos e o meristema apical radicular, pela extensão da raiz primária. (Doerner, 2003).

I.7. Meristemas – Regulação Gênica e Hormonal do MAC

Regulação Gênica

A função meristemática é regulada por uma grande rede de sistemas, dinâmicos e interconectados, que incluem as redes de transcrição, sinalização intercelular, transporte polarizado de hormônios (Heisler e Jönsson, 2007).

Os meristemas são caracterizados por serem constituídos de populações de células de pequenas dimensões e isodiamétricas. Estas células são responsáveis pela formação de todos os tecidos e órgãos da planta, de acordo com uma rota de diferenciação pré-determinada. Entretanto, um conjunto das células meristemáticas se autoperpetua indefinidamente, com a manutenção da sua pluripotencialidade – são denominadas células-tronco e estão situadas em um microambiente, o nicho de células-tronco, onde a diferenciação é inibida pela sinalização das células localizadas ao seu redor. Células-filhas que se originam da divisão das células-tronco, e que permanecem na região do nicho, persistem como células-tronco; por outro lado, as células-filhas que se formaram fora do nicho assumem uma rota de diferenciação de órgão em resposta à sinalização posicional (Tucker e Laux, 2007). As células-tronco são responsáveis pelo suprimento das células do meristema e, de modo final, por todas as células que compõem os mais variados tecidos e órgãos da planta (raízes, caule, folhas e demais estruturas).

A manutenção dos nichos de células-tronco é regulada geneticamente e o modelo está bem descrito para *Arabidopsis thaliana.* Nesse modelo, o meristema apical caulinar (MAC) é dividido em zona central e periférica. Enquanto as células-tronco são mantidas na zona central, as suas células descendentes são deslocadas em relação à zona central, fazendo parte da zona periférica. O gene *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* é expresso tanto na zona central quanto na periférica, sendo responsável pela manutenção da divisão celular e retardo na diferenciação em órgãos das células; entretanto, a manutenção das células-tronco é dependente também da expressão do gene *WUSCHEL (WUS)* no centro organizador (CO). O gene CLAVATA (CLV) é responsável pela regulação da expressão do gene

WUSCHEL e, conseqüentemente, pelo tamanho da população das células-tronco. Em linhas gerais, a regulação ocorre a partir da produção do peptídeo CLV3, que inibe o *WUS* através da ativação de um receptor transmembrânico do tipo cinase, composto pelas subunidades CLV1 e CLV2. Uma falha na rota regulatória CLV provoca um grande aumento do número de células na zona central, devido a um aumento da proliferação das células da zona central ou a uma redução da passagem das células da zona central para a zona periférica. Um fato interessante é a conversão das células da zona periférica em células com identidade igual àquelas localizadas na zona central, quando se promove a inibição da função da *CLV3* (Sablowski, 2007).

A rota CLAVATA é uma parte do mecanismo que regula precisamente o número de células-tronco. A rota responsável pela inibição da diferenciação das células-tronco e seus descendentes imediatos é dependente dos genes da classe I *KNOTTED1-like homeobox (KNOX)*, como por exemplo, o STM. Quando há uma inibição da expressão dos genes do tipo *KNOX*, ocorre a ativação de genes que antagonizam as funções meristemáticas e tem-se início a formação de órgãos na periferia do meristema (Castellano e Sablowski, 2005), tais como folhas e flores.

Regulação hormonal do MAC

O surgimento de um primórdio foliar na região do meristema apical caulinar deve se ao transporte/acúmulo de auxina e também à inibição dos genes *KNOX*. Depois do estabelecimento do primórdio do órgão, este funciona como um dreno para a auxina, exaurindo-a das células ao seu redor. Desta maneira, outro primórdio foliar somente poderá se estabelecer a certa distância do primeiro já em desenvolvimento, portanto em uma posição distinta onde a auxina possa se acumular (Castellano e Sablowski, 2005). Além da auxina, foi proposto também que as giberelinas poderiam exercer um papel antagonista na expressão dos genes *KNOX* no processo da organogênese. Além disso, a síntese de citocininas é inibida por altas concentrações de auxina, impedindo a expressão de STM e afetando a distribuição da auxina através do controle da filotaxia, influenciando desta maneira no surgimento de um novo primórdio foliar.

I.7.1. A Organogênese Adventícia Induzida *in vitro*

A organogênese adventícia em plantas cultivadas *in vitro* pode ocorrer a partir de explantes (tecidos ou órgãos) incubados em meio de cultura contendo reguladores de crescimento, ou seja, substâncias sintéticas que mimetizam as auxinas e citocininas endógenas. Esse processo é dependente de um fino balanço entre essas substâncias reguladoras do crescimento, sendo responsável pela indução de uma determinada estrutura, por exemplo, eixos caulinares ou raízes (Christianson e Warnick, 1983).

A organogênese *in vitro* pode ser classificada como direta ou indireta: no primeiro caso, a formação de um novo órgão ocorre sem a formação intermediária de calos; no segundo caso, a formação de calos, que são estruturas compostas por grupos de células pluripotentes crescidas em meio de cultura com reguladores de crescimento, ocorre em um estágio anterior à formação da estrutura adventícia. Um exemplo do primeiro caso é a indução da formação de eixos caulinares a partir de bases foliares de abacaxizeiro incubadas sob concentrações específicas de auxina e citocinina (Wang *et al.*, 2009). No segundo caso, a formação indireta de estruturas adventícias pode ser exemplificada por folhas de tabaco. Em um primeiro instante, induz-se a formação e o crescimento de calos; em um segundo momento, com o uso de balanços específicos de auxina e citocinina, os calos são induzidos a formarem raízes ou eixos caulinares (Skoog *et al.*, 1967).

Entretanto, a organogênese adventícia pode ocorrer sem a indução por reguladores de crescimento. Plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) representam um modelo vegetal que exemplifica o fino controle exercido pelo ápice sobre região radicular – o simples isolamento de pontas de raízes e a incubação em meio de cultura sem reguladores de crescimento resultam na formação de plantas inteiras (Kerbauy, 1984).

I.8. O Abacaxizeiro (*Ananas comosus*)

O *Ananas* comosus *(L.) Merr.* (figura 3), conhecido popularmente como abacaxizeiro, pertence à família *Bromeliaceae*, classe Monocotiledônea, e sua infrutescência é um dos principais produtos comercializados nos países tropicais e subtropicais.

Figura 3 - *Ananas comosus.* A – Plantas adultas e suas infrutescências (fonte: www.vuatkerala.org); B – Planta cultivada *in vitro,* obtida a partir de um segmento nodal do eixo caulinar estiolado de uma planta crescida no escuro. Idade aproximada: 3-4 meses; altura: ~ 10 cm.

Originário das Américas, o abacaxizeiro tem como principais produtores os seguintes países: Tailândia, Brasil, Filipinas, Estados Unidos (Havaí), China, Índia e Nigéria (Souza *et al*., 2009). A sua produção mundial em 2008 chegou a mais de 19 milhões de toneladas, sendo o Brasil responsável pela produção de aproximadamente 13% desse total (HTTP://FAOSTAT.FAO.ORG).

No Brasil, os principais estados produtores de abacaxi são a Paraíba, Minas Gerais, Pará, Bahia e Ceará (HTTP://WWW.IBGE.GOV.BR). Conhecido como ibacati (fruta cheirosa) pelos indígenas brasileiros, possui uma série de outros nomes: em espanhol, o abacaxizeiro é conhecido como "*piña*" e, em inglês, como "*pineapple*"; franceses, italianos, holandeses e alemães chamam-na de "*ananas*".

O abacaxizeiro é uma planta perene, de baixa estatura, cujas raízes pequenas e profusas alcançam até 15 cm de profundidade no solo; as folhas são esverdeadas e apresentam forma de calhas, dispostas em espiral ao redor da haste central. No final do desenvolvimento, as flores dão origem a pequenos frutos, denominados bagas, que ficam próximas umas das outras e dispostas ao redor de um eixo central. A infrutescência apresenta forma cilíndrica ou cônica, composta pela parte consumível localizada na base e uma coroa de folhas no ápice. A polpa do fruto apresenta aroma e sabor, além de ser levemente ácido; aproximadamente 75% da massa fresca é composta por açúcares, além de possuir sais minerais (cálcio, fósforo, magnésio, potássio, sódio, cobre e iodo) e vitaminas (A, B_1, B_2, C e ácido nicotínico) (HTTP://WWW.SEAGRI.BA.GOV.BR).

I.8.1. Organogênese Adventícia em Abacaxizeiro

Estudos sobre a organogênese adventícia em plantas de abacaxizeiro datam desde a década de 70. Nessa época, a busca por técnicas alternativas de propagação assexuada de plantas de importância horticultural resultou na descrição dos fatores que controlam a morfogênese de plantas a partir de eixos caulinares e explantes foliares de abacaxizeiro. Foi constatada a necessidade da aplicação de auxinas e citocininas e suas influências sobre o processo organogenético adventício (Mathews e Rangan, 1979).

Plantas de abacaxizeiro representam um modelo vegetal interessante para o estudo do processo da organogênese adventícia. Plantas crescidas a partir de segmentos nodais estiolados apresentam, na região basal das folhas, células que, quando incubadas em meio de cultura contendo reguladores de crescimento na concentração de 0,53 μM de ácido naftaleno acético para cada 8,87 μM de benzilaminopurina, são capazes de dar início à formação de meristemas adventícios (Souza *et al.*, 2003, Mercier *et al.*, 2003). Além de apresentar uma capacidade intrínseca de formar uma planta diretamente através da indução adventícia do eixo caulinar, o *Ananas comosus* é um modelo vegetal que elimina a necessidade do estabelecimento e manutenção de culturas indiferenciadas (calos) nos laboratórios de pesquisa (Wang *et al.*, 2009).

VI - CONCLUSÕES

Há fortes indícios de que o óxido nítrico está relacionado à indução da formação de meristemas adventícios em bases foliares de *Ananas comosus.* O radical faria parte de uma cascata de sinalização na qual o peróxido de hidrogênio seria um outro componente, vindo em seguida ao NO, logo nas primeiras horas de cultivo *in vitro*.

A via de produção de NO pela redutase do nitrato pareceu não exercer diretamente uma influência na organogênese adventícia, apesar de ter havido uma grande redução na produção desse radical quando foram empregadas substâncias inibidoras dessa rota de síntese, como o tungstato e a glutamina. O número de explantes que formaram eixos caulinares ao final de 60 dias de cultivo *in vitro* foi semelhante ou superior aos resultados obtidos no tratamento controle sem inibidores. Ao contrário, o emprego do L-NAME, substância inibidora da via NOS em mamíferos, exerceu grande influência na organogênese das bases foliares, afetando significativamente a formação de gemas adventícias e no vigor dos poucos eixos caulinares formados pelos explantes, quando comparado ao controle sem a presença desse inibidor.

Quanto à localização do NO nos explantes foliares cultivados em SIM, por meio do emprego do fluoróforo DAR, detectou-se um aumento da fluorescência no parênquima e na região dos feixes vasculares.

VII. RESUMO

O óxido nítrico (NO) tem se mostrado um sinalizador presente em muitas fases do desenvolvimento vegetal e elemento essencial nas respostas aos estresses bióticos e abióticos em plantas. Entretanto, poucos estudos correlacionam esse radical à organogênese vegetal. Folhas de *Ananas comosus* (Bromeliaceae) podem ser consideradas um modelo interessante para o estudo da organogênese, pois sua região basal possui um conjunto de células que, sob cultivo *in vitro* e balanço adequado de certos reguladores de crescimento, dá início à proliferação celular e formação de meristemas adventícios. Primeiramente, formam-se estruturas denominadas protuberâncias que, depois, se desenvolvem em novos eixos caulinares, sem formação intermediária de calos. A relação ótima dos reguladores de crescimento para a indução da organogênese adventícia é 0,53 μM de ácido naftalenoacético e 8,87 μM de benziladeninapurina e sabe-se que o balanço hormonal entre auxinas e citocininas endógenas é alterado nesses explantes, encontrando-se um pico desses hormônios no terceiro dia da indução. Esse trabalho teve como objetivo verificar se o NO participaria da cascata de sinalizações que leva à organogênese adventícia, utilizando bases foliares de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*. A quantificação do NO foi determinada pela técnica de quimiluminescência durante um período de 7 dias a partir da obtenção dos explantes. Essa produção foi dosada em fluxo contínuo com medições feitas a cada 10 segundos. O tratamento indutor de organogênese mostrou um aumento significativo na produção de NO em comparação aos explantes incubados em meio de cultura sem reguladores de crescimento, indicando uma possível participação do óxido nítrico no processo da organogênese. Houve um pico de NO no primeiro dia logo nas primeiras horas de cultivo em meio indutor. Além disso, foi realizada a dosagem de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e foi encontrada uma correlação com a produção de óxido nítrico durante a fase clara do fotoperíodo. A produção de H_2O_2 aumentou em seguida ao incremento de NO no primeiro dia de cultivo no meio de cultura com reguladores de crescimento. Finalmente, o tratamento com L-NAME mostrou ser a enzima NOS uma possível rota de síntese de NO, já que reduziu significativamente o número de novos meristemas adventícios e,

conseqüentemente, de novos eixos caulinares formados após 60 dias de cultivo em meio não indutor da organogênese. A localização *in situ* do NO pareceu indicar que o aumento da produção estaria mais relacionado com células do parênquima foliar e dos feixes vasculares. Assim, esta pesquisa permitiu incluir temporalmente dois novos possíveis sinalizadores (NO e H_2O_2) à cascata de sinalização da organogênese adventícia em folhas de abacaxizeiro. A sinalização parece iniciar-se com o NO e logo em seguida, ainda no primeiro dia, viria o aumento de H_2O_2 e dos hormônios auxinas e citocininas no terceiro dia (resultados anteriores do grupo) do período de indução.

VIII - ABSTRACT

The nitric oxide (NO) was shown to be an ubiquitous molecule for many phases of the development of a plant and an important element for biotic and abiotic stress responses. However, few studies correlate this radical with the organogenesis in plants. Ananas comosus (Bromeliaceae) leaves can be considered an interesting model for the organogenesis studies, because the basal region have a set of cell which, under in vitro cultivation and fine growth regulators balance, start cell division and form adventitious meristems. Firstly, structures named protuberances are formed, which develop forming new buds, without the intermediary formation of callus. The optimum rate of the growth regulators for the induction to organogenesis is 0.53 µM of naphthalene acetic acid and 8.87 µM of benziladeninepurine. It is known that the endogenous hormonal balance between auxins and cytokinins is altered in these explants, and a peak of these hormones is found at the third day of induction. This work intended to verify whether the NO would participate on the signaling cascade that led to the adventitious organogenesis, using basal leaves of pineapple cultivated in vitro. The nitric oxide quantification was made by chemiluminescence for a period of 7 days after the explants obtainment. The production was dosed in continuous flow air with measurements made every 10 seconds. The inductive treatment to organogenesis showed a significant rise in NO production in comparison to the explants incubated in medium culture without growth regulators, indicating a possible participation of NO at the organogenesis process. There was a NO peak at the first day, soon at the first hours of cultivation at inductive medium. Besides, the dosage of hydrogen peroxide (H_2O_2) was done and a correlation was found to the NO production at the light phase of the photoperiod. The H_2O_2 production rose after the increase of NO at the first day of cultivation in medium containing growth regulators. Finally, the treatment with L-NAME showed the NOS enzyme as a possible pathway involved with the NO production, since the number of new adventitious meristems reduced significantly and subsequently, of new shoots after 60 days of cultivation in inductive to organogenesis medium. The in situ localization of NO seemed to indicate that the rise in production could be related

to the cells of the leaf parenchyma and vascular tissues. Thus, this research permitted to include temporally two new possible signals (NO and H_2O_2) to the signalization cascade of the adventitious organogenesis in pineapple leaves. The signalization seems to initiate with NO followed by H_2O_2 at the first day and by the auxins and cytokinins hormones at the third day (previous results of the group) of the induction period.

IX. APÊNDICE A

Meios de cultura

Nas tabelas A-F estão relacionados os reagentes que fizeram parte da composição dos meios de cultura utilizados neste projeto. Em todos os tipos de meio de cultura o pH foi ajustado para 5,8 através da adição de HCl ou NaOH, antes da adição do agente geleificante Phytagel®.

A. Meio de cultura básico de Murashige e Skoog (1962) – MS

Reagentes	1 litro de meio de cultura
$CaCl_2.2H_2O$	8,8 g
Macronutrientes Murashige e Skoog	Item D – 50 mL
Micronutrientes Murashige e Skoog	Item E – 5 mL
Fe-EDTA	Item F – 10 mL
Tiamina	0,1 mg
Mio-Inositol	100 mg
Sacarose	30 g
Ajuste do pH para 5,8 com HCl ou NaOH	
Phytagel ®	2 g

B. Meio de cultura para indução da organogênese – SIM

Reagentes	1 litro de meio de cultura
Macronutrientes Knudson	
1. $(NH_4)_2SO_4$	500 mg
2. $Ca(NO_3)_2$	1000 mg
3. KH_2PO_4	250 mg
4. $MgSO_4$	250 mg
Micronutrientes Murashige e Skoog	Item E – 5 mL
Fe-EDTA	Item F – 10 mL
Sacarose	20 g
Benziladeninapurina (BAP)	2 mg
Ácido Naftaleno-Acético (ANA)	1 mg
Ajuste do pH para 5,8 com HCl ou NaOH	
Phytagel	2 g

C. Meio de cultura de Knudson (1946) modificado – KN

Reagentes	1 litro de meio de cultura
Macronutrientes Knudson	
5. $(NH_4)_2SO_4$	500 mg
6. $Ca(NO_3)_2$	1000 mg
7. KH_2PO_4	250 mg
8. $MgSO_4$	250 mg
Micronutrientes Murashige e Skoog	Item E – 5 mL
Fe-EDTA	Item F – 10 mL
Sacarose	20 g
Ajuste do pH para 5,8 com HCl ou NaOH	
Phytagel	2 g

D. Macronutrientes da formulação de Murashige e Skoog (MS) - 1962

Reagentes	1 litro
KNO_3	38 g
NH_4NO_3	33 g
$MgSO_4.7H_2O$	7,4 g
KH_2PO_4	3,4 g

E. Micronutrientes da formulação de Murashige & Skoog (MS) - 1962

Reagentes	1 litro
$MnSO_4.4H_2O$	4,46 g
$ZnSO_4.7H_2O$	1,72 g
H_3BO_3	1,24 g
KI	0,166 g
$NaMoO_4.2H_2O$	0,05 g
$CuSO_4.5H_2O$	0,005 g
$CoCl_2.6H_2O$	0,005 g

F. Solução-estoque de Fe-EDTA

Reagentes	1 litro de meio de água
Na_2EDTA	3,730 g
$FeSO_4.7H_2O$	2,780 g

Reagentes Para Dosagem de Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2)

Nos itens G-I estão relacionados os reagentes utilizados na dosagem de peróxido de hidrogênio, com as suas respectivas concentrações. O meio de cultura KN, sem a adição do geleificante Phytagel ®, foi utilizado no preparo das suas soluções.

G. Solução de DCHBS (3,5-Dicloro-2-Hidroxibenzenossulfônico)

Solução-estoque de DCHBS foi preparada na concentração de 100 mM e mantida em gelo.

H. Solução-estoque de AAP (4-Aminoantipirina)

Solução-estoque de AAP foi preparada na concentração d 10 mM e mantida em gelo.

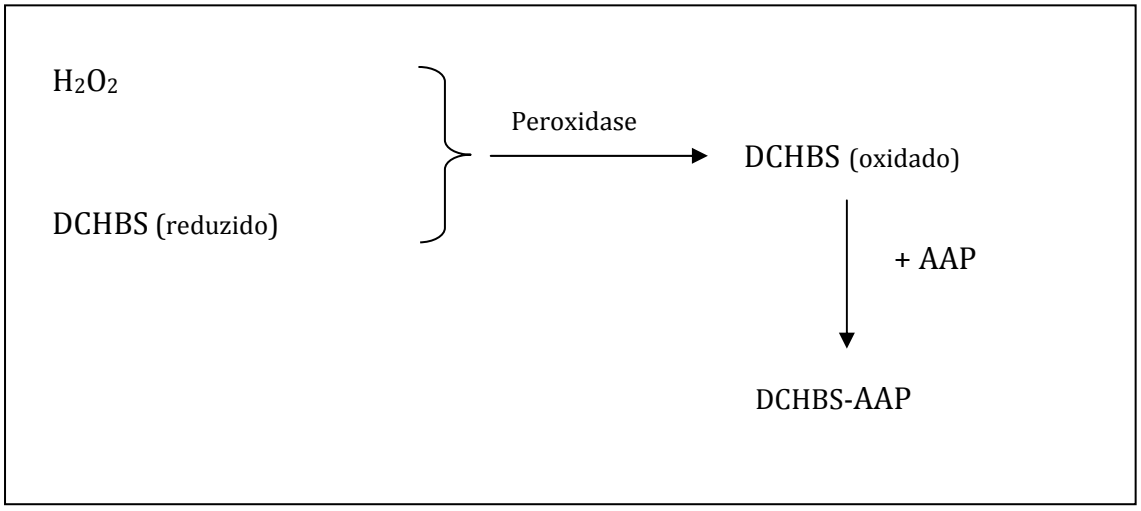
I. Solução de peroxidase

A solução de peroxidase foi preparada na concentração de aproximadamente 1 mg/L, mantida no gelo e protegida da luz.

APÊNDICE B

Princípio Da Técnica de Dosagem de H_2O_2

Protocolo para dosagem de H_2O_2 estabelecido por Van Gestelen *et al.* (1998). O método consiste na oxidação do ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenossulfônico (DCHBS) até a sua forma quinona pela peroxidase. Uma vez oxidada, a quinona reage com a 4-aminoantipirina (AAP) e forma um complexo molecular cuja detecção no espectrofotômetro foi medida no comprimento de onda de 510 nm.



APÊNDICE C

Curva-Padrão Para Dosagem de H_2O_2

A tabela I foi utilizada na elaboração da curva-padrão para o cálculo da produção de peróxido de hidrogênio pelos explantes foliares de *Ananas comosus.* De acordo com o aumento na concentração de H_2O_2 é formado um gradiente de coloração rósea.

Tabela I – Volumes de H_2O_2, meio de cultura KN, soluções de DCHBS, AAP e peroxidase utilizados na determinação da curva-padrão.

Concentração (µM)	H_2O_2 (1 mM)	Meio de cultura (µL)	DCHBS (100 mM)	AAP (10 mM)	Peroxidase (< 1 mg/mL)	Total (µL)
0	0	880	100	10	10	1000
1	1	879	100	10	10	1000
2	2	878	100	10	10	1000
3	3	877	100	10	10	1000
4	4	876	100	10	10	1000
5	5	875	100	10	10	1000
7,5	7,5	872,5	100	10	10	1000
10	10	870	100	10	10	1000
20	20	860	100	10	10	1000
30	30	850	100	10	10	1000
40	40	840	100	10	10	1000
50	50	830	100	10	10	1000
75	75	805	100	10	10	1000
100	100	780	100	10	10	1000

X - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSON-BARD, A.; ASTIER, J.; RASUL, S.; WAWER, I.; DUBREUIL-MAURIZI, C.; JEANDROZ, S. WENDEHENNE, D. 2009. Current view of nitric oxide-responsive genes in plants. *Plant Science,* 177**,** 302-309.

BETHKE, P. C.; BADGER, M. R. JONES, R. L. 2004. Apoplastic Synthesis of Nitric Oxide by Plant Tissues. *Plant Cell,* 16**,** 332-341.

BRIGHT, J.; HISCOCK, S. J.; JAMES, P. E. HANCOCK, J. T. 2009. Pollen generates nitric oxide and nitrite: a possible link to pollen-induced allergic responses. *Plant Physiology and Biochemistry,* 47**,** 49-55.

CAO, B.-J. REITH, M. E. A. 2002. Nitric oxide scavenger carboxy-PTIO potentiates the inhibition of dopamine uptake by nitric oxide donors. *European Journal of Pharmacology,* 448**,** 27-30.

CASTELLANO, M. M. SABLOWSKI, R. 2005. Intercellular signalling in the transition from stem cells to organogenesis in meristems. *Current Opinion in Plant Biology,* 8**,** 26-31.

CHRISTIANSON, M. L. WARNICK, D. A. 1983. Competence and determination in the process of in vitro shoot organogenesis. *Developmental Biology,* 95**,** 288-293.

CRAWFORD, N. M. 2006. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.,* 57**,** 471-478.

CUETO, M.; HERNÁNDEZ-PERERA, O.; MARTÍN, R.; BENTURA, M. L.; RODRIGO, J.; LAMAS, S. GOLVANO, M. P. 1996. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS Letters,* 398**,** 159-164.

DE MICHELE, R.; VURRO, E.; RIGO, C.; COSTA, A.; ELVIRI, L.; DI VALENTIN, M.; CARERI, M.; ZOTTINI, M.; SANITA DI TOPPI, L. LO SCHIAVO, F. 2009. Nitric Oxide Is Involved in Cadmium-Induced Programmed Cell Death in Arabidopsis Suspension Cultures. *Plant Physiol.,* 150**,** 217-228.

DOERNER, P. 2003. Plant Meristems: A Merry-Go-Round of Signals Review. *Current Biology,* 13**,** R368-R374.

EDERLI, L.; REALE, L.; MADEO, L.; FERRANTI, F.; GEHRING, C.; FORNACIARI, M.; ROMANO, B. PASQUALINI, S. 2009. NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. *Plant Physiology and Biochemistry,* 47**,** 42-48.

FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N. S.; JOURD'HEUIL, D. KELM, M. 2002. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.,* 16**,** 1775-1785.

FRESCHI, L.; RODRIGUES, M. A.; DOMINGUES, D. S.; PURGATTO, E.; VAN SLUYS, M.-A.; MAGALHAES, J. R.; KAISER, W. M. MERCIER, H. 2010. Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiol.***,** pp.109.151613.

GABALDÓN, C.; ROS, L. V. G.; PEDREÑO, M. A. BARCELÓ, A. R. 2005. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans. New Phytologist,* 165**,** 121-130.

GARCÍA-MATA, C. LAMATTINA, L. 2001. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptative plant responses against drought stress. *Plant Physiology,* 126**,** 1196-1204.

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.

HAMASAKI, R. M.; PURGATTO, E. MERCIER, H. 2005. Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated in vitro. *Brazilian Journal of Plant Physiology,* 17**,** 383-389.

HEISLER, M. G. JÖNSSON, H. 2007. Modelling meristem development in plants. *Current Opinion in Plant Biology,* 10**,** 92-97.

HOSSAIN, K.; ITOH, R.; YOSHIMURA, G.; TOKUDA, G.; OKU, H.; COHEN, M. YAMASAKI, H. 2010. Effects of nitric oxide scavengers on thermoinhibition of seed germination in Arabidopsis thaliana. *Russian Journal of Plant Physiology,* 57**,** 222-232.

JASID, S.; SIMONTACCHI, M.; BARTOLI, C. G. PUNTARULO, S. 2006. Chloroplasts as a Nitric Oxide Cellular Source. Effect of Reactive Nitrogen Species on Chloroplastic Lipids and Proteins. *Plant Physiol.,* 142**,** 1246-1255.

KERBAUY, G. B. 1984. Regeneration of protocorm-like bodies through *in vitro* culture of roots tips of *Catasetum* (Orchidaceae). *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie,* 113**,** 287-291.

KLEPPER, L. 1979. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO_2) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment,* 13**,** 537-542.

KONSTADT, S. 1995. Nitric oxide: Has it progressed from molecule of the year to wonder drug of the decade? *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia,* 9**,** 625-626.

KOPYRA, M. GWÓZDZ, E. A. 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry,* 41**,** 1011-1017.

KUNDU, S.; TRENT, J. T. HARGROVE, M. S. 2003. Plants, humans and hemoglobins. *Trends in Plant Science,* 8**,** 387-393.

LESHEM, Y. A. Y. PINCHASOV, Y. 2000. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries Fragaria anannasa (Duch.) and avocados Persea americana (Mill.). *J. Exp. Bot.,* 51**,** 1471-1473.

LI, S.-W.; XUE, L.; XU, S.; FENG, H. AN, L. 2009. Hydrogen peroxide acts as a signal molecule in the adventitious root formation of mung bean seedlings. *Environmental and Experimental Botany,* 65**,** 63-71.

LIAO, W.; XIAO, H. ZHANG, M. 2009. Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. *Acta Physiologiae Plantarum,* 31**,** 1279-1289.

MAGALHAES, J. R.; MONTE, D. C. DURZAN, D. 2000. Nitric oxide and ethylene emission in Arabidopsis thaliana. *Physiol. Mol. Biol. Plants,* 6**,** 117-127.

MATHEWS, V. H. RANGAN, T. S. 1979. Multiple plantlets in lateral bud and leaf explant in vitro cultures of pineapple. *Scientia Horticulturae,* 11**,** 319-328.

MAY, M. R.; PROVANCE, M. C.; SANDERS, A. C.; ELLSTRAND, N. C. ROSS-IBARRA, J. 2009. A Pleistocene Clone of Palmer's Oak Persisting in Southern California. *PLoS ONE,* 4**,** e8346.

MERCIER, H.; SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; HAMASAKI, R. M. SOTTA, B. 2003. Endogenous auxin and cytokinin contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured in vitro. *Brazilian Journal of Plant Physiology,* 15**,** 107-112.

MURASHIGE, T. SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.,* 15**,** 473-497.

NAGANO, T. YOSHIMURA, T. 2002. Bioimaging of Nitric Oxide. *Chemical Reviews,* 102**,** 1235-1270.

NEILL, S. 2005. NO way to die - nitric oxide, programmed cell death and xylogenesis. *New Phytologist,* 165**,** 2-5.

NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D. WILSON, I. 2008. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. *J. Exp. Bot.,* 59**,** 165-176.

NEILL, S. J.; DESIKAN, R. HANCOCK, J. T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist,* 159**,** 11-35.

PAGNUSSAT, G. C.; SIMONTACCHI, M.; PUNTARULO, S. LAMATTINA, L. 2002. Nitric Oxide Is Required for Root Organogenesis. *Plant Physiol.,* 129**,** 954-956.

PALAVAN-UNSAL, N. ARISAN, D. 2009. Nitric Oxide Signalling In Plants. *The Botanical Review,* 75**,** 203-229.

PARÍS, R.; LAMATTINA, L. CASALONGUÉ, C. A. 2007. Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. *Plant Physiology and Biochemistry,* 45**,** 80-86.

PEDROSO, M. C.; MAGALHAES, J. R. DURZAN, D. 2000. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. *Journal of Experimental Botany,* 51**,** 1027-1036.

PII, Y.; CRIMI, M.; CREMONESE, G.; SPENA, A. PANDOLFINI, T. 2007. Auxin and nitric oxide control indeterminate nodule formation. *BMC Plant Biology,* 7**,** 1-11.

PLANCHET, E. KAISER, W. M. 2006. Nitric oxide production in plants: facts and fictions. Landes Bioscience.

PRADO, A. M.; PORTERFIELD, D. M. FEIJÓ, J. A. 2004. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. *Development,* 131**,** 2707-1714.

SABLOWSKI, R. 2007. The dynamic plant stem cell niches. *Current Opinion in Plant Biology,* 10**,** 639-644.

SHANI, E.; YANAI, O. ORI, N. 2006. The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology,* 9**,** 484-489.

SKOOG, F.; HAMZI, H. Q.; SZWEYKOWSKA, A. M.; LEONARD, N. J.; CARRAWAY, K. L.; FUJII, T.; HELGESON, J. P. LOEPPKY, R. N. 1967. Cytokinins: Structure/activity relationships. *Phytochemistry,* 6**,** 1169-1192.

SOUZA, B. M.; KRAUS, J. E.; ENDRES, L. MERCIER, H. 2003. Relationships between endogenous hormonal levels and axillary bud development of Ananas comosus nodal segments. *Plant Physiology and Biochemistry,* 41**,** 733-739.

SOUZA, O. P. D.; TEODORO, R. E. F.; MELO, B. D. TORRES, J. L. R. 2009. Qualidade do fruto e produtividade do abacaxizeiro em diferentes densidades de plantio e lâminas de irrigação. *Pesquisa Agropecuária Brasileira,* 44**,** 471-477.

SUGIYAMA, M. 1999. Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Plant Biology,* 2**,** 61-64.

TISCHNER, R.; PLANCHET, E. KAISER, W. M. 2004. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga Chlorella sorokiniana. *FEBS letters,* 576**,** 151-155.

TOSSI, V.; CASSIA, R. LAMATTINA, L. 2009. Apocynin-induced nitric oxide production confers antioxidant protection in maize leaves. *Journal of Plant Physiology,* 166**,** 1336-1341.

TUCKER, M. R. LAUX, T. 2007. Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends in Cell Biology,* 17**,** 403-410.

VALENTOVICOVÁ, K.; HALUSKOVÁ, L. U.; HUTTOVÁ, J.; MISTRÍK, I. TAMÁS, L. 2009. Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *Journal of Plant Physiology,* In Press, Corrected Proof.

VON BOHLEN UND HALBACH, O. 2003. Nitric oxide imaging in living neuronal tissues using fluorescent probes. *Nitric Oxide,* 9**,** 217-228.

WANG, M. L.; URUU, G.; XIONG, L.; HE, X.; NAGAI, C.; CHEAH, K.; HU, J.; NAN, G. L.; SIPES, B.; ATKINSON, H.; MOORE, P.; ROHRBACH, K. PAULL, R. 2009. Production of transgenic pineapple (Ananas cosmos (L.) Merr.) plants via adventitious bud regeneration. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant,* 45**,** 112-121.

WANG, Y. S. YANG, Z. M. 2005. Nitric oxide reduces aluminum toxicity by preventing oxidative stress in the roots of *Cassia tora* L. *Plant Cell Physiol.,* 46**,** 1915-1923.

WINK, D. A. MITCHELL, J. B. 1998. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide - From physiology to diseases. *Free Radical Biology and Medicine,* 25**,** 434-456 85 86.

WOJTASZEK, P. 2000. Nitric oxide in plants: To NO or not to NO. *Phytochemistry,* 54**,** 1-4.

XU, Y. C.; CAO, Y. L.; GUO, P.; TAO, Y. ZHAO, B. L. 2004. Detection of nitric oxide in plants by electron spin resonance. *Phytopathology,* 94**,** 402-407.

YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. TAKAHASHI, S. 1999. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. *Trends in Plant Science,* 4**,** 128-129.

ŹRÓBEK-SOKOLNIK, A.; GÓRSKA, K. GÓRECKI, R. 2007. Heavy Metals-Induced Hydrogen Peroxide Production in Tobacco Cells. *Polish Journal of Natural Science,* 22**,** 196-203.