

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE SOJA (*Glycine*
max L. Merrill) SUBMETIDAS AO LACTOFEN**

LEONARDO CESAR FERREIRA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU – SP

- 2007 -

**UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS**

**AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE SOJA (*Glycine
max* L. Merrill) SUBMETIDAS AO LACTOFEN**

LEONARDO CESAR FERREIRA

**PROF^a DR^a ANA CATARINA CATANEO
ORIENTADORA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências,
Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção
do título de Doutor em Ciências Biológicas
(Botânica), AC: Fisiologia Vegetal.

BOTUCATU – SP

- 2007 –

“O que conta não é o sucesso que se vê, é dar-se
sem reservas, é crescer nesse dom generoso e
sobretudo fazer os outros crescerem”

L. J. LEBRET

Dedico este trabalho a meus pais, **Vladimir**
e Angelina, por terem me transmitido os
melhores valores como ser humano.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, por me guiar em Seus caminhos e permitir que eu possa ser sempre pessoa e profissional a Seu serviço;
- À minha orientadora, **Prof^ª Dr^a Ana Catarina Cataneo**, por todas as contribuições nesses oito anos e meio de orientação, principalmente por ter me ensinado como praticar a ciência de maneira digna, honesta e amigável;
- À CAPES, pela concessão de minha bolsa de estudo;
- A meus amigos do Laboratório de Xenobióticos, pelo auxílio indispensável na execução deste trabalho: **Bruno José Aparecido Soares, Jennifer Búfalo, Joseane Scavroni, Lígia Maria Ramazzini Remaeh, Marina Seiffert Sanine, Natália Corniani e Yara Andréo de Souza**;
- À **Prof^ª Dr^a Inês Cechin**, pela concessão da casa de vegetação para a condução dos experimentos, e à **Prof^ª Dr^a Terezinha de Fátima Fumis**, pelo seu auxílio durante as coletas;
- Aos amigos dos Grupos de Oração Universitários (GOUs), por todos os momentos de partilha e companheirismo;
- A meu irmão, **Alexandre Augusto Ferreira**, e à minha cunhada, **Patrícia da Silva Martins Ferreira**, pela amizade e convivência;
- À minha tia, **Rosa Thomaz Facioli** (*in memoriam*), por todos os momentos felizes compartilhados;
- À minha namorada, **Paula Aiello Tomé de Souza**, pelo carinho, paciência, compreensão, e por todo amor que nos une!

MUITO OBRIGADO!!!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	1
INTRODUÇÃO.....	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
CAPÍTULO I: “ Óxido nítrico em plantas: uma breve abordagem dessa molécula multifuncional ”.....	23
CAPÍTULO II: “ A injúria foliar causada pelo lactofen em soja é reduzida pelo óxido nítrico ”.....	55
CAPÍTULO III: “ Óxido nítrico minimiza o estresse oxidativo gerado pelo lactofen em plantas de soja ”.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	113
CONCLUSÕES.....	115
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	116

RESUMO GERAL

FERREIRA, L.C. **AÇÃO PROTETORA DO ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS DE SOJA (*Glycine max* L. Merrill) SUBMETIDAS AO LACTOFEN.** 2007. 155P. TESE (DOCTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

RESUMO - O lactofen é um herbicida do grupo dos difenil-éteres utilizado na cultura da soja para o controle de plantas daninhas de folhas largas e possui como mecanismo de ação a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox), que catalisa a etapa de oxidação do protoporfirinogênio-IX a protoporfirina-IX (proto-IX) na via de biossíntese das clorofilas e citocromos. A inibição é seguida de um acúmulo de proto-IX, que leva à formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), peroxidação de lipídios das membranas e diminuição dos teores de pigmentos fotossintéticos, caracterizando-se assim o estresse oxidativo. Como consequência, podem ocorrer manchas, enrugamento e queima das folhas, levando à paralisação temporária do crescimento da cultura. Em contrapartida, o óxido nítrico (NO) é uma molécula capaz de eliminar diretamente as ERMO e assim finalizar reações propagadas em cadeia, podendo atuar como um antioxidante. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o pré-tratamento de plantas de soja com solução de nitroprussiato de sódio (SNP), substância doadora de NO, promove proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen. Assim, plantas de soja no estágio fenológico V3, após pré-tratamento com as diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por dois dias consecutivos, foram pulverizadas com lactofen na dose recomendada para esta cultura, equivalente a 0,7 L.ha⁻¹. Às 24, 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação de lactofen (HAAL), folíolos foram coletados para a quantificação dos teores de lipoperóxidos, clorofilas totais e suas frações “a” e “b” e carotenóides totais, bem como para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). Além disso, aos dois, quatro e sete dias após a aplicação de lactofen (DAAL) foram realizadas avaliações visuais de injúria e aos 7 e 14 DAAL, as plantas foram avaliadas quanto à altura, comprimento de raiz e contagem do número de folíolos. Em seguida, foram separadas em lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes, dos quais a matéria seca e os teores de açúcares solúveis totais e redutores foram quantificados. Foi constatado que o NO reduziu os sintomas de injúria causados pelo lactofen nos folíolos jovens, além de manter baixos teores de açúcares solúveis totais e redutores. Além disso, apesar da peroxidação lipídica não ter sido totalmente interrompida, o NO apresentou capacidade de eliminação das ERMO geradas pela ação do herbicida lactofen, impedindo a degradação de pigmentos fotossintéticos. Conseqüentemente, a eliminação das ERMO pelo NO acarretou tanto diminuição de substrato disponível para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD, essenciais na proteção das plantas em situações indutoras de estresse oxidativo, como a ausência de indução da GST pelo H₂O₂. Porém, o NO proporcionou crescimento mais lento das plantas. Diante destes resultados, sugerem-se posteriores estudos que busquem uma maior elucidação dos mecanismos pelos quais o NO pode atuar na sinalização do estresse promovido pelo lactofen na cultura da soja.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, *Glycine max* L. Merrill, lactofen, óxido nítrico.

FERREIRA, L.C. **PROTECTIVE ACTION OF NITRIC OXIDE ON SOYBEAN (*Glycine max* L. Merrill) PLANTS SUBMITTED TO LACTOFEN.** 2007. 155P. TESE (DOUTORADO) – INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA, BOTUCATU.

ABSTRACT – Lactofen is a diphenylether herbicide applied in soybean fields to control broadleaf weeds whose mechanism of action is the inhibition of protoporphyrinogen oxidase (Protox) enzyme, which catalyses oxidation of protoporphyrinogen-IX to protoporphyrin-IX (proto-IX) in the chlorophyll and cytochrome biosynthesis pathway. This inhibition is followed by accumulation of proto-IX, which leads to generation of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation of membranes and decrease of photosynthetic pigment levels, which characterizes oxidative stress. Consequently, spots, wrinkles and leaf burn can occur, which results in transitory cessation of crop growth. However, nitric oxide (NO) is a molecule able to scavenge ROS directly and to end chain reactions, acting as an antioxidant. Thus, the present research aimed to evaluate if the pre-treatment of soybean plants with sodium nitroprusside (SNP) solution, a NO donor substance, promotes protection against oxidative stress generated by lactofen. Thus, soybean plants at V3 phenologic stage were pre-treated with different SNP levels (0, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) for two consecutive days and on the third day were sprayed with lactofen at recommended rate for this crop, equivalent to 0.7 L.ha^{-1} . At 24, 48, 72, 96 and 120 h after application of lactofen (HAAL), leaflets were collected in order to quantify the levels of lipoperoxides, total chlorophylls and their “a” and “b” fractions, total carotenoids, as well as the activity assay of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) antioxidant enzymes. In addition, at two, four and seven days after application of lactofen (DAAL), visual injury evaluations were performed, and at 7 and 14 DAAL, the plants were evaluated for height, root length and leaflets number count. Afterwards, the plants were separated into leaf blades, stems plus petioles and roots, from which dry matter and total and reducing soluble sugar levels were quantified. It was verified that NO decreased the injury symptoms caused by lactofen on young leaflets, and kept low the total and reducing soluble sugar levels. Although lipid peroxidation was not completely prevented, NO was able to scavenge ERMO generated by lactofen herbicide action and obstructed photosynthetic pigment breakdown. Consequently, ERMO scavenging by NO leads to a decrease in the available substrate for antioxidant enzymes SOD, CAT and POD, which are essential in protecting plants under oxidative stress situations, as well as the absence of GST induction by H_2O_2 . However, NO caused slower growth of the plants. From these results, further researches are suggested in order to elucidate the NO action mechanisms on signaling the stress caused by lactofen at soybean crop.

Key-words: Antioxidant enzymes, *Glycine max* L. Merrill, lactofen, nitric oxide, oxidative stress.

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A soja produzida no Brasil tornou-se um carro-chefe dos negócios na agricultura nacional. Pela sua atual facilidade de adaptação ao clima e à topografia, tanto das regiões subtropicais como dos cerrados, essa cultura se difundiu por quase todos os estados brasileiros. A cada ano, a lavoura também incorpora tecnologias que permitem, a curto e médio prazos, ampliar a produtividade e proporcionar novos aproveitamentos ao grão (Vencato et al., 2005).

Porém, a busca por produtividade e economicidade na produção de grandes culturas esbarra na interferência das plantas daninhas, as quais tendem a aumentar o custo de produção, reduzir as margens de lucro e diminuir a qualidade do produto (Rodrigues & Pitelli, 1994).

Deuber (1992) afirma que a descoberta dos herbicidas, como uma nova ferramenta para o controle das plantas daninhas, trouxe um progresso incalculável, abrindo novas possibilidades agrícolas, reduzindo custos, aumentando rendimentos e, sobretudo, possibilitando ao homem do campo realizar com maior facilidade essa tarefa que tem sido penosa por milênios. Assim, o uso de herbicidas em pós-emergência é comum no controle de plantas daninhas em soja e dentre os mais utilizados para o controle de plantas daninhas de folhas largas, encontra-se o lactofen (Constantin et al., 2000).

Em contrapartida, alguns herbicidas, além de outros estímulos ambientais como luz ultravioleta, ataque de patógenos, hiperoxia, ozônio e flutuações de temperatura podem induzir a formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) na maioria dos organismos aeróbicos (Scandalios, 1992, 1993).

As ERMO são produzidas em quantidades significativas em vários compartimentos celulares, tais como cloroplastos, mitocôndrias, glioxissomos e peroxissomos, bem como no citosol. Conseqüentemente, podem promover danos em biomoléculas, tais como ácidos graxos, aminoácidos, proteínas, pigmentos e ácidos nucléicos, o que acarreta em danificações das membranas, perda de função dos compartimentos, redução da eficiência metabólica e da fixação do carbono, extravasamento eletrolítico e mutação das cromátides. Todos esses efeitos podem culminar com a morte celular (Scandalios, 1993). Curiosamente, a primeira evidência de indução de morte celular devido a níveis fitotóxicos de ERMO foi verificada em experimentos utilizando-se culturas de células de soja (Van Breusegem et al., 2001).

Nesse sentido, as células vegetais são equipadas com diversas enzimas que desintoxicam as ERMO e assim proporcionam proteção celular contra os danos oxidativos. Dentre essas enzimas antioxidantes, incluem-se as superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT), peroxidases (PODs) (Foyer et al., 1997; Hung & Kao, 2003) e glutathione S-transferases (GSTs) (Flury et al., 1998; Polidoros & Scandalios, 1999; Davis & Swanson, 2001).

Nas plantas, a atuação do óxido nítrico (NO) como molécula sinalizadora tem atraído muita atenção nos últimos anos (Stöhr & Stremlau, 2006). Tem sido relatado que o NO atua como antioxidante nas plantas, devido a sua capacidade de eliminação das ERMO (Beligni & Lamattina 1999 a, b, 2002; Cheng et al., 2002; Hung et al., 2002; Hung & Kao, 2003). Além disso, o NO está envolvido em outros processos, tais como crescimento vegetativo da parte aérea (Zhang et al., 2003; An et al., 2005), divisão celular (Ötvös et al., 2005), diferenciação do xilema (Gabaldon et al., 2005), desenvolvimento do sistema radicular (Pagnussat et al., 2002, 2003; Guo et al., 2003; Correa-Aragunde et al., 2004), interação planta-rizobactérias (Creus et al., 2005), curvatura gravitropica (Hu et al., 2005), entre outros.

Com base nestas considerações, o presente estudo foi realizado para investigar a ação do NO em plantas de soja submetidas ao tratamento com o herbicida lactofen, comumente utilizado para o controle de plantas daninhas nesta cultura.

Desta forma, o Capítulo I, **“Óxido nítrico em plantas: uma breve abordagem dessa molécula multifuncional”**, objetivou apresentar uma revisão de diversos aspectos referentes ao NO, tais como propriedades químicas, vias de síntese, efeitos bioquímicos e fisiológicos, interação com os hormônios vegetais, ação na sinalização a patogêneses, na expressão gênica, em processos reguladores, seu controle endógeno e o uso de substâncias doadoras dessa molécula.

O Capítulo II, **“A injúria foliar causada pelo lactofen em soja é reduzida pelo óxido nítrico”**, objetivou verificar o efeito do NO em plantas de soja tratadas com o herbicida lactofen, por meio de avaliações fitométricas e bioquímicas, bem como avaliações visuais de injúria. As avaliações fitométricas executadas corresponderam às medidas de altura, comprimento de raiz, número de folíolos, matéria seca total e de lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes das plantas. Em relação às avaliações bioquímicas, quantificaram-se os teores de açúcares solúveis totais e redutores na matéria seca dos diferentes órgãos.

O Capítulo III, **“Óxido nítrico minimiza o estresse oxidativo gerado pelo lactofen em plantas de soja”**, objetivou avaliar o efeito do NO em plantas de soja na presença do herbicida lactofen, por meio da determinação da atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD, CAT e POD, além da quantificação de indicadores de estresse oxidativo, tais como teores de lipoperóxidos, clorofilas totais e suas frações “a” e “b” e carotenóides totais.

REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Produção brasileira de soja: histórico e atualidades

Introduzida na segunda metade do século XIX, na Bahia, a exploração da cultura da soja no Brasil só começou quando ela foi levada para o extremo sul do País, no Rio Grande do Sul, no início do século XX, onde na época encontrou condições climáticas semelhantes às vigentes nas regiões produtoras do mundo. Sua produção comercial no Brasil começou timidamente nos anos 40 e 50, utilizando-se exclusivamente de tecnologias desenvolvidas nos Estados Unidos, local de origem dos materiais genéticos utilizados no início do processo produtivo de soja no Brasil. A produção intensificou-se na Região Sul a partir dos anos 60, mesclando tecnologias importadas com os primeiros desenvolvimentos tecnológicos nacionais (Dall’Agnol, 2006).

A partir dos anos 80, a produção de soja encontrou o caminho do meio oeste brasileiro, nos Cerrados, graças aos avanços tecnológicos conseguidos pelos cientistas brasileiros, destacadamente o desenvolvimento de variedades adaptadas a regiões de baixas latitudes e outras tecnologias vinculadas à correção de deficiências nutricionais dos solos tropicais. Esses avanços permitiram que o principal núcleo de produção dessa oleaginosa se transferisse da Região Sul para a Região Centro Oeste do País. Convém destacar que o cultivo da soja estava restrito anteriormente a latitudes próximas ou superiores a 30°. Hoje, a maior parte da produção nacional se concentra em latitudes inferiores a 30°. É relevante salientar que as inovações geradas pela pesquisa brasileira buscam ampliar a produtividade, minimizar o impacto negativo ao meio ambiente e reduzir os custos de produção. O resultado desse enfoque na pesquisa é o desenvolvimento de alimentos seguros e de qualidade, com sustentabilidade nas dimensões social, ambiental e econômica (Dall’Agnol, 2006).

A cultura da soja representa quase 50% da safra brasileira de grãos, o que coloca o País na condição de segundo maior produtor mundial e principal fornecedor do cereal para o mercado externo. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), foram colhidos 53,4 milhões de toneladas do grão na safra 2005/06, o que representa incremento de 5,4% em relação às 51,4 milhões de toneladas do período anterior (Reetz et al., 2006).

Fonte de proteína, a soja é um grão muito versátil, que dá origem a produtos e a subprodutos muito usados pela agroindústria, indústria química e de alimentos, podendo

substituir a carne na alimentação humana. O farelo de soja é usado intensivamente na produção de proteínas animais, na avicultura, suinocultura e pecuária, proporcionando um crescimento saudável. É a partir do farelo que se produz carne, não apenas no Brasil mas em todo o mundo. Seu uso mais conhecido, no entanto, é como óleo refinado, obtido a partir do óleo bruto. Nesse processo também é produzida a lecitina, que possui ação emulsificante e é muito usada na fabricação de salsichas, maioneses e achocolatados, entre outros produtos (Reetz et al., 2006).

Recentemente, a soja vem crescendo também como fonte alternativa de combustível. Mesmo apresentando um dos menores teores de óleo, juntamente com o algodão (19% e 15%, respectivamente), ainda assim essas duas culturas serão as principais fornecedoras do óleo necessário para a produção do biodiesel e do H-bio (Reetz et al., 2006).

2. Uso do lactofen no manejo de plantas daninhas da cultura da soja

A cultura da soja está sujeita a vários tipos de danos e sua produtividade pode variar em função do ataque de pragas, ocorrência de doenças e convivência com plantas daninhas, sob determinadas condições edafoclimáticas (Carvalho et al., 2000).

Segundo Lorenzi (2000) as plantas daninhas afetam diretamente a produção das culturas, pela competição por luz, umidade e nutrientes minerais, ou indiretamente, pelo aumento de inóculo ou pela manutenção de organismos patogênicos. As plantas daninhas, além da competição pela umidade do solo e por nutrientes essenciais, interferem em práticas culturais, como controle de pragas, fertilização e colheita.

Existem diferentes métodos para o controle das plantas daninhas. Na cultura da soja, devido às extensas áreas cultivadas, o controle químico é o que tem sido mais utilizado, em função de sua eficácia e do alto rendimento operacional que se consegue nas aplicações (Carvalho et al., 2000). Neste aspecto, devido à grande extensão de áreas cultivadas atualmente, considera-se que o uso de herbicidas na cultura de soja é imprescindível.

Os herbicidas são substâncias químicas orgânicas ou inorgânicas capazes de matar ou suprimir o crescimento de espécies específicas (Roman et al., 2007). São ativos em um ou mais locais, como enzimas e proteínas, entre outros, onde se ligam e dificultam alguma função normal da planta (Kissmann, 2003; Carvalho, 2003). Para serem considerados eficazes quando aplicados às folhas de plantas daninhas, eles devem

ser retidos pela folhagem, penetrar e ultrapassar a cutícula, mover-se nos espaços com água ao redor da célula, entrar na célula através da membrana celular, atingir o local de ação, que geralmente é uma enzima, ligar-se à enzima alvo e inibi-la. Para ser considerado seletivo, o herbicida deve afetar o local de ação na planta daninha, mas não na cultura, ser metabolizado ou degradado pela cultura, não pela planta daninha, e atingir somente a planta-alvo (Roman et al., 2007).

Porém, deve ser mencionado que, paralelamente, os herbicidas também podem provocar danos nas plantas cultivadas, geralmente devido ao emprego de doses excessivas, uso de herbicidas não adequados, sobreposição de faixas de aplicação, aplicações não uniformes ou uso de equipamentos mal regulados. Além disso, a cultura pode ser afetada por resíduos de herbicidas aplicados na cultura anterior, cujos efeitos são mais freqüentes em solos leves, com baixo teor de matéria orgânica, e quando as condições climáticas anteriores foram de períodos secos prolongados (Roman, 2000).

O uso de herbicidas em pós-emergência é comum no controle de plantas daninhas em soja. Dentre os mais utilizados para o controle de folhas largas, encontram-se o bentazon, fomesafen, chlorimuron-ethyl, flumiclorac-pentil, acifluorfen-sódico, imazamox, imazethapyr e o lactofen (Constantin et al., 2000).

O lactofen [1'-(carboetoxi)etil 5-(2-cloro-4-(trifluoro-metil)fenoxi)-2-nitrobenzoato] é um herbicida do grupo químico dos difenil-éteres (Rodrigues & Almeida, 1998). Apresenta modo de ação seletivo e não sistêmico, sua formulação química corresponde a do tipo emulsão e pode ser aplicado de forma terrestre ou aérea. Enquadra-se na classe toxicológica I, considerado extremamente tóxico e muito perigoso e de acordo com a classificação ambiental, pertence neste caso ao tipo II. Sua dose recomendada para a cultura de soja varia de 0,625 a 0,750 L.ha⁻¹, e seu intervalo de segurança corresponde à 84 dias (Giagro, 2007). Na soja é aplicado em pós-emergência para o controle de um amplo número de plantas daninhas, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Plantas daninhas da cultura da soja (Embrapa Soja, 2007; Giagro, 2007). *controladas pelo lactofen.

Nome científico	Nome popular	Nome científico	Nome popular
<i>Acanthospermum australe</i> *	carrapicho-rasteiro	<i>Hyptis suaveolens</i>	cheirosa
<i>Acanthospermum hispidum</i> *	carrapicho-de-carneiro	<i>Indigofera hirsuta</i> *	anileira
<i>Ageratum conyzoides</i> *	erva-de-são-joão	<i>Ipomoea aristolochiaefolia</i> *	corda-de-viola
<i>Alternanthera tenella</i> *	apaga-fogo	<i>Ipomoea grandiflora</i>	corda-de-viola
<i>Amaranthus deflexus</i> *	caruru-rasteiro	<i>Ipomoea purpurea</i> *	corda-de-viola
<i>Amaranthus hybridus</i> *	caruru-roxo	<i>Lepidium virginicum</i> *	mastruz
<i>Amaranthus retroflexus</i> *	caruru-gigante	<i>Melampodium perfoliatum</i>	estrelinha
<i>Amaranthus spinosus</i> *	caruru-de-espinho	<i>Mimosa invisa</i>	dormideira
<i>Amaranthus viridis</i> *	caruru-de-mancha	<i>Mitracarpus hirtus</i>	poaia da praia
<i>Bidens pilosa</i> *	picão-preto	<i>Mollugo verticillata</i> *	capim-tapete
<i>Blainvillea latifolia</i> *	picão-grande	<i>Nicandra physaloides</i> *	joá-de-capote
<i>Brachiaria decumbens</i>	capim-braquiária	<i>Panicum maximum</i>	capim-colônio
<i>Brachiaria plantaginea</i>	capim-marmelada	<i>Parthenium hysterophorus</i>	losna branca
<i>Calopogonium mucunoides</i>	calopogônio	<i>Pennisetum americanum</i>	milheto
<i>Cenchrus echinatus</i>	capim-carrapicho	<i>Pennisetum setosum</i>	capim-custódio
<i>Chamaesyce hirta</i>	erva-de-santa-luzia	<i>Pennisetum typhoides</i>	milheto
<i>Commelina benghalensis</i> *	trapoeraba	<i>Portulaca oleracea</i> *	beldroega
<i>Croton glandulosus</i>	gervão branco	<i>Raphanus raphanistrum</i>	nabiça
<i>Cyperus rotundus</i>	tiririca	<i>Richardia brasiliensis</i> *	poaia-branca
<i>Desmodium tortuosum</i>	carrapicho beicho-de-boi	<i>Senna obtusifolia</i>	fedegoso
<i>Digitaria horizontalis</i>	capim-colchão	<i>Setaria geniculata</i>	capim-rabo-de-raposa
<i>Digitaria insularis</i>	capim-amargoso	<i>Sida rhombifolia</i> *	guanxuma
<i>Echinochloa crusgalli</i>	capim-arroz	<i>Solanum americanum</i> *	maria-pretinha
<i>Eleusine indica</i>	capim-pé-de-galinha	<i>Sorghum halepense</i>	capim-massambará
<i>Emilia sonchifolia</i> *	falsa-serralha	<i>Spermacoce latifolia</i> *	erva-quente
<i>Eupatorium pauciflorum</i>	botão-azul	<i>Tagetes minuta</i>	cravo de defunto
<i>Euphorbia heterophylla</i> *	amendoim-bravo	<i>Tridax procumbens</i>	erva-de-touro
<i>Galinsoga parviflora</i>	picão-branco	<i>Vigna unguiculata</i>	feijão-miúdo
<i>Hyptis lophanta</i>	catirina	<i>Zea mays</i>	milho voluntário

O lactofen possui como mecanismo de ação a inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox), que se encontra presente na rota de síntese das clorofilas e de citocromos (Figura 1). Esta rota metabólica também é chamada rota de síntese de porfirinas ou de tetrapirroles (Merotto Junior & Vidal, 2001). A enzima Protox é chave na rota de síntese de porfirinas que acontece no cloroplasto e origina-se a partir de glutamato. O glutamato, após sete reações intermediárias, produz protoporfirinogênio IX, que é oxidado pela enzima Protox produzindo protoporfirina IX (Matringe et al., 1989; Devine et al., 1993).

A protoporfirina IX produz clorofila e citocromos a partir de reações com Mg e Fe, respectivamente. A ação do herbicida acontece por sua competição com o protoporfirinogênio IX pelo sítio ativo da enzima Protox, impedindo a produção de protoporfirina IX e resultando em acúmulo de protoporfirinogênio IX no cloroplasto. A partir deste acúmulo, o protoporfirinogênio IX se difunde do cloroplasto para o citoplasma, onde é transformado em protoporfirina IX, que é um composto altamente fotodinâmico e após oxidação resulta em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), cuja elevada produção tem como efeito final a peroxidação de lipídios, levando à destruição das membranas celulares, acarretando estresse oxidativo (Foote et al., 1984; Tripathy, 1994; Gupta & Tripathy, 1999; Moreland, 1999; Tripathy & Singhal, 1999; Merotto Junior & Vidal, 2001; Scott et al., 2001; Watanabe et al., 2001; Carvalho, 2003; Tripathy et al., 2007).

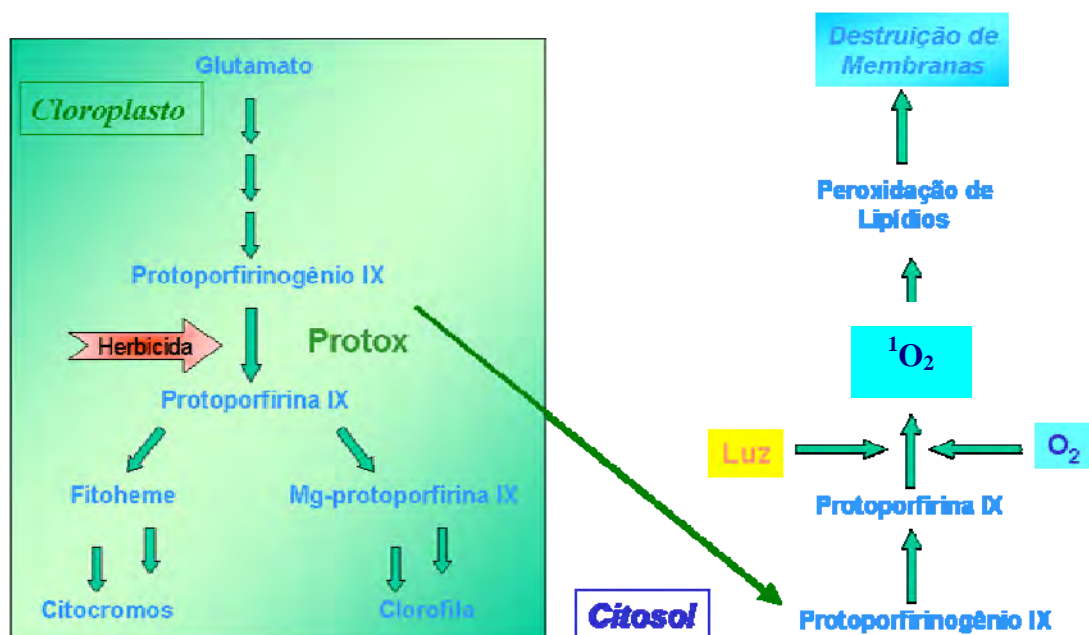


Figura 1. Esquema conceitual do mecanismo de ação dos herbicidas inibidores da Protox (Carvalho, 2003).

Assim, diante do mecanismo de ação do lactofen, torna-se relevante a abordagem de alguns aspectos relativos à produção de ERMO, inclusive de $^1\text{O}_2$, que leva ao estresse oxidativo.

3. Produção de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) e estresse oxidativo

Um amplo âmbito de estresses ambientais como elevadas ou baixas temperaturas, seca, salinidade, radiação ultravioleta, ozônio e infecções patogênicas, são potencialmente prejudiciais às plantas (Van Breusegem et al., 2001). Um aspecto comum de todas essas condições adversas é a produção aumentada das ERMO no interior de diversos compartimentos subcelulares da célula vegetal (Foyer & Mullineaux, 1994; Lamb & Dixon, 1997; Apel & Hirt, 2004; Mittler et al., 2004; Foyer & Noctor, 2005; Gechev et al., 2006). As ERMO também podem ser produzidas devido à ação antrópica pelo uso de diversos xenobióticos, dentre os quais destacam-se o elevado emprego de herbicidas (Devine et al., 1993; Sunohara & Matsumoto, 1997; Grossman et al., 2001; Merotto Junior & Vidal, 2001; Carvalho, 2003; Sunohara et al., 2003; Sunohara & Matsumoto, 2004; Couée et al., 2006).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos, incluindo os vegetais, é resultante de uma superprodução das ERMO, tais como radicais superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1993; Foyer et al., 1994b; Thérond et al., 2000). Como consequência, as ERMO causam peroxidação de lipídios, modificações protéicas, rompimento das cadeias de DNA, destruição de clorofilas e extravasamento iônico, entre outros, de modo que tais eventos podem culminar com a morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1984; Baker & Orlandi, 1995; Giardi et al., 1997; Beligni & Lamattina, 1999b; Moller et al., 2007).

Além da produção induzida por fatores externos, as ERMO também podem ser geradas por reações *in-vivo* (Beligni & Lamattina, 1999b). Assim, o acúmulo de ERMO nas plantas é geralmente atribuído à diversas fontes possíveis: peroxidases ligadas à parede celular, NADPH oxidases localizadas nas membranas, amina oxidases, xantina oxidase, glicolato oxidase, acil-CoA oxidase e cadeia de transporte de elétrons do cloroplasto e da mitocôndria (Klessig & Malamy, 1994; Corpas et al., 2001, Desikan et al., 2001; Blokhina et al., 2003; Couée et al., 2006). Além disso, as ERMO são

continuamente produzidas sob condições normais, como na respiração mitocondrial (Moller, 2001; Doudican et al., 2005) e nos processos ocorrentes nos cloroplastos (Asada, 1999).

Especificamente, nos cloroplastos o principal local de origem de radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é no fotossistema I, na ferredoxina-NADP⁺ redutase, mas a forma reduzida do monodeidroascorbato (MDHAR) também produz $O_2^{\cdot-}$ (Asada, 1999; Corpas et al., 2001). Entretanto, tem sido relatada a geração de radicais $O_2^{\cdot-}$ e OH^{\cdot} pelo fotossistema II, e propõe-se que o P_{680} , a feofitina e a proteína Q_A também sejam responsáveis pela produção de $O_2^{\cdot-}$ (Navari-Izzo et al., 1999). Nas mitocôndrias, os radicais $O_2^{\cdot-}$ são produzidos em dois segmentos da cadeia de transporte de elétrons, na flavoproteína NADH desidrogenase (complexo I) e na região da ubiquinona (Turrens, 1997; Halliwell & Gutteridge, 2000; Corpas et al., 2001).

De acordo com Van Breusegem et al. (2001), as ERMO também podem ser usadas de maneira benéfica pelas plantas, pois desempenham um importante papel na indução de mecanismos de proteção durante estresses bióticos e abióticos. O exemplo mais conhecido está na ativação de respostas de resistência durante interações planta-patógeno incompatíveis. Sob infecção, uma NADPH oxidase da membrana plasmática é ativada, produzindo radicais $O_2^{\cdot-}$ (Desikan et al., 1996) que são convertidos em H_2O_2 via dismutação espontânea ou via atividade da superóxido dismutase (SOD). O H_2O_2 formado apresenta propriedades defensivas situadas em diversas etapas: a) elevados níveis de H_2O_2 são tóxicos tanto para o patógeno quanto para a célula vegetal. Com a morte das células vegetais localizadas ao redor do local da infecção, ocorre a inibição da disseminação do patógeno (Levine et al., 1996); b) o H_2O_2 pode servir como um substrato em reações de peroxidação de precursores de lignina e induzir ligações de proteínas da parede celular. Assim, a parede celular vegetal reforçada diminui a disseminação do patógeno e faz com que dificilmente novas infecções ocorram; c) como o H_2O_2 é relativamente estável e difusível por meio de membranas, em contraste com o $O_2^{\cdot-}$, pode atuar como uma molécula sinalizadora nas respostas a estresses (Lamb & Dixon, 1997; Foyer et al., 1997).

4. Enzimas antioxidantes

As plantas possuem diferentes sistemas de defesa contra os estresses ambientais (Bor et al., 2003), o que lhes permitem adaptar-se para minimizar os danos que podem ocorrer pela ação das ERMO (Radetski et al., 2000).

Nesse contexto, o sistema natural de defesa antioxidante nos vegetais inclui três classes gerais: (a) antioxidantes lipossolúveis associados à membranas, como α -tocoferol e β -caroteno; (b) redutores hidrossolúveis, como o tripeptídeo glutaciona (GSH) e o ascorbato; e (c) enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutases (SODs, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), peroxidases (PODs, EC 1.11.1.7), ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.11), glutaciona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) e glutaciona redutase (GR, EC 1.6.4.2) (Elstner, 1982; Winston, 1990; Smirnoff, 1993; Sies, 1997; Rao & Davis, 1999; Davis & Swanson, 2001; Mittler, 2002; Misra & Gupta, 2006; Sun et al., 2007). As glutaciona S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) atuam na proteção das plantas submetidas a estresses (Droog et al., 1995; Gronwald & Plaisance, 1998), podendo também ser consideradas como enzimas antioxidantes (Flury et al., 1998; Polidoros & Scandalios, 1999; Davis & Swanson, 2001).

Esse sistema encontra-se presente tanto nos compartimentos intra quanto nos extracelulares. Como o estresse oxidativo compreende uma complexa série de fenômenos, um aumento simultâneo em diversos componentes do sistema de defesa antioxidante seria necessário a fim de se obter um aumento substancial na tolerância ao estresse (Foyer et al., 1994a; Radetski et al., 2000).

4.1. Glutaciona S-transferases

As glutaciona S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) são enzimas citosólicas encontradas em todos os eucariontes, que catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos sintéticos com o tripeptídeo glutaciona (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH). Os produtos S-glutacionilados polares são então ativamente removidos do citosol por transportadores ligados ao ATP, sendo exportados das células, no caso dos animais, ou importados para os vacúolos das plantas, antes de serem metabolizados (Sanchez-Fernandez et al., 2001). As GST podem então ser consideradas como sendo parte de uma rota coordenada de desintoxicação de compostos exógenos e nas plantas são

responsáveis pelo metabolismo de um amplo número de herbicidas comercialmente importantes (Edwards & Dixon, 2000).

Enquanto a conjugação de herbicidas com a GSH está comumente associada com o milho e o sorgo (Edwards & Dixon, 2000), estudos sobre o metabolismo têm mostrado que reações similares de desintoxicação ocorrem em culturas de folhas largas, tais como a soja. Na soja, a GSH é substituída pela homoglutationa (γ -glutamil-cisteinil- β -alanina, HGSH), com diversos herbicidas metabolizados para os respectivos derivados de S-homoglutationilação nessa espécie (Breux et al., 1987). Assim como no caso dos cereais, a rápida conjugação de herbicidas à HGSH protege as plantas de soja da toxidez irreversível e permite que esses compostos sejam usados no controle seletivo de plantas daninhas nessa cultura (Owen, 2000). Os herbicidas aplicados na soja que sofrem a conjugação com a HGSH incluem o chlorimuron-ethyl, do grupo químico sulfonilurías (Brown e Neighbors, 1987), diversos cloroacetanilidas (Breux et al., 1987; Lamoureux & Rusness, 1989), o sulfoxida derivado do *s*-triazinone metribuzin (Frear et al., 1985) e os difenil-éteres acifluorfen e fomesafen (Frear et al., 1983; Andrews et al., 1997).

Em soja, tem sido determinado que a S-homoglutationilação de herbicidas das classes dos cloroacetanilidas, difenil-éteres e sulfonilurías é catalisada pelas GSTs e que atividades relativamente menores dessas enzimas em plantas daninhas competidoras são importantes na determinação da seletividade (Andrews et al., 1997). Apesar de sua importância no metabolismo de herbicidas, relativamente pouco tem-se investigado sobre as GSTs atuantes no metabolismo de xenobióticos em plantas de soja (Andrews et al., 2005). Nesse sentido, torna-se relevante mencionar o estudo de Remaeh (2004), que observou ação da GST em plantas de soja na metabolização do herbicida lactofen.

Além disso, há diversos relatos que mencionam ação protetora da GST em diferentes culturas tratadas com herbicidas. Tal fato foi observado por Cataneo et al. (2002) em plantas de milho e trigo tratadas com atrazine, acetochlor e oxyfluorfen, bem como por Cataneo et al. (2003) e Nemat Alla & Hassan (2006) em plantas de milho mantidas sob tratamento com glifosato e atrazine, respectivamente, e também por Knörzer et al. (1996) em células de soja expostas à presença de oxyfluorfen. A GST também pode sofrer um aumento de sua expressão gênica na presença de H₂O₂, fato observado por Desikan et al. (1998) em células de *Arabidopsis*, e por Levine et al. (1994) em plantas de soja.

É válido mencionar que, além de atuar como substrato das GSTs, a GSH também protege as células vegetais contra injúrias induzidas pelas ERMO, por intermédio direto da remoção das espécies químicas reativas ou por bloqueio das reações oxidativas em cadeia por elas iniciadas (De Gara et al., 2003).

4.2. Superóxido dismutases

As superóxido dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) são ubíquas nos organismos aeróbicos, onde desempenham importante função na defesa contra a toxicidade causada pelas ERMO, sendo desta forma consideradas importantes no mecanismo de tolerância ao estresse. O papel biológico das SODs é a desintoxicação dos radicais $O_2^{\cdot-}$ por convertê-los a H_2O_2 e O_2 (Bartosz, 1997; Kim & Han, 2000; Scandalios, 2001).

Há três classes de SODs, diferenciadas de acordo com o metal presente em seu sítio ativo: cobre/zinco (Cu/Zn SODs), ferro (Fe-SODs) e manganês (Mn-SODs). As enzimas Fe-SODs estão presentes nos cloroplastos, enquanto que as Mn-SODs situam-se na matriz mitocondrial. As Cu/Zn SODs são normalmente encontradas no citosol, sendo que algumas plantas contêm uma isoforma nos cloroplastos (Tsang et al., 1991).

Pesquisas mencionam aumentos de atividade dessas enzimas em plantas, promovendo proteção e tolerância das mesmas aos herbicidas. Como exemplos, Iannelli et al. (1999) constataram que um aumento de atividade da SOD promoveu resistência de plantas de milho ao paraquat. Além disso, Cataneo et al. (2005) observaram que a SOD protegeu plantas de soja contra o estresse oxidativo promovido pelo oxyfluorfen, ao passo que Nemat Alla & Hassan (2006) observaram aumentos de atividade da SOD em plantas de milho tratadas com atrazine, fato também relatado por Remaeh (2004) em plantas de soja tratadas com lactofen.

4.3. Catalase

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é considerada juntamente com as SODs como as mais eficientes enzimas antioxidantes. Ambas as enzimas apresentam uma função combinada, de modo que a CAT converte o H_2O_2 , originado em função da atividade da SOD, em H_2O e O_2 (Scandalios, 1993).

Desta forma, nos peroxissomos, a produção de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ deveriam ser adequadamente controladas pela CAT e APX, e pela SOD, respectivamente, sob

condições fisiológicas normais (Corpas et al., 2001). Porém, tem-se conhecimento de que a CAT é sensível à luz (Hertwig et al., 1992; Davis & Swanson, 2001), podendo neste caso ser inativada (Schäfer & Feierabend, 2000). Além disso, esta fotoinibição da CAT pode ocorrer em situações de estresse promovidas por baixas ou elevadas temperaturas (Feierabend et al., 1992). Não obstante, diferentes condições de estresse que suprimem a síntese protéica também podem promover inativação da CAT (Schäfer & Feierabend, 2000).

Tais fatos justificam-se, pois nessas condições de estresse pode ocorrer aumento da geração peroxissomal de H_2O_2 e $O_2^{\cdot-}$ (Del Río et al., 1992, 1996), que podem influenciar a atividade ou a expressão gênica da CAT. Nesse contexto, sabe-se que os radicais $O_2^{\cdot-}$ podem inibir a atividade da CAT (Kono & Fridovich, 1982). Por outro lado, a expressão da CAT em milho pode ser inibida por baixas concentrações de H_2O_2 ou induzida por elevadas concentrações dessa ERMO (Polidoros & Scandalios, 1999). Em folhas de arroz tratadas com ácido abscísico (ABA), Hung & Kao (2003) observaram aumentos concomitantes dos níveis de H_2O_2 e da atividade da CAT.

Em contrapartida, há estudos que mostram inibição da atividade da CAT em plantas na presença de herbicidas, como o de Kraus & Fletcher (1994) em plântulas de trigo expostas ao paraquat, e de Nemat Alla & Hassan (2006) em plantas de milho tratadas com atrazine.

4.4. Peroxidases

As peroxidases (PODs, EC 1.11.1.7) desempenham um importante papel na biossíntese da parede celular, mas também estão envolvidas nas respostas ao estresse. São encontradas em diversas isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em diversos compartimentos celulares (Campa, 1991).

Bolwell et al. (1995) mencionam que as PODs da parede celular estão envolvidas na geração de ERMO em decorrência do ataque de patógenos. Por exemplo, em feijão (*Phaseolus vulgaris*) a produção de ERMO em resposta a um eliciador de parede celular oriundo do patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* foi dependente de uma peroxidase exocelular (Bolwell, 1999).

Além disso, pode haver uma atuação em conjunto entre o H_2O_2 e as PODs na proteção das células vegetais ao ataque de patógenos. Assim, o H_2O_2 facilita reações das PODs na catálise de ligações intra e intermoleculares entre componentes estruturais das

paredes celulares e a polimerização da lignina. Conseqüentemente, ocorre enrijecimento da parede celular, o que dificulta a penetração de microrganismos nos tecidos vegetais (Ros Barceló, 1997). Esse aumento nas barreiras mecânicas torna mais lenta a penetração do patógeno, o que permite às células vegetais organizar defesas que necessitam de mais tempo para serem ativadas (De Gara et al., 2003).

As PODs também apresentam função antioxidante em células vegetais expostas a condições de estresse, conforme observado por Knörzer et al. (1996) em células de soja tratadas com o herbicida oxyfluorfen. Isto se deve ao fato dessas enzimas, assim como a CAT, decomporem o H_2O_2 que foi produzido pela SOD (Bor et al., 2003).

5. Indicadores de estresse oxidativo

A presente abordagem sobre indicadores de estresse oxidativo torna-se relevante por permitir maior elucidação do nível de injúria presente nas plantas submetidas a diferentes xenobióticos. Existem diversos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo, dentre os quais, teores de lipoperóxidos, pigmentos fotossintéticos e açúcares solúveis, além de aspectos fitométricos e fisiológicos, como medidas de altura e avaliações de fitotoxicidade.

5.1. Lipoperóxidos

As ERMO podem promover o início do processo de peroxidação dos lipídios das membranas (Kellogg & Fridovich, 1975; Hung & Kao, 2003). Como conseqüência, pode ocorrer desintegração das membranas, degradação das proteínas, inativação enzimática, degradação dos pigmentos e rompimento das cadeias de DNA (Anderson & Padhye, 2004). Assim, elevações nos teores de lipoperóxidos, como indicativo de estresse oxidativo, têm sido relatadas em plantas submetidas a diversas condições de estresse, tais como estresse hídrico, altas temperaturas, radiação ultravioleta, presença de metais pesados e aplicação de herbicidas.

Desta forma, elevações dos teores de lipoperóxidos foram evidenciados sob condições de estresse hídrico em *Triticum aestivum* L. (Baisak et al., 1994), altas temperaturas em nódulos de leguminosas (Becana et al., 2000) e radiação ultravioleta em *Chlorella vulgaris* (Malanga & Puntarulo, 1995). Também, elevados níveis de metais pesados disponíveis às plantas causam aumento na peroxidação lipídica, como

observado na presença de cádmio em *Oryza sativa* L. (Shah et al., 2001), zinco em *Brassica juncea* (Prasad et al., 1999), ferro em *Hydrilla verticillata* (Sinha et al., 1997), cobre em *Silene cucubalus* (De Vos et al., 1989) e em *Lycopersicon esculentum* Mill. (Ouariti et al., 1997), níquel em *Triticum aestivum* L. (Pandolfini et al., 1992), alumínio em *Glycine max* L. Merrill (Cakmak & Horst, 1991) e cádmio em *Phaseolus vulgaris* L. (Somashekariah et al., 1992).

A peroxidação de lipídios como consequência da ação de alguns herbicidas tem sido comumente detectada, como por exemplo pela ação do lactofen em soja (Remaeh, 2004), oxyfluorfen em trigo e cevada (Choi et al., 1999) e atrazine em milho (Nemat Alla & Hassan, 2006).

A reação de formação de lipoperóxidos (Figura 2) inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular. Tal seqüestro pode ser realizado pelo OH^* ou pelo radical alcóxila (LO^*), com consequente formação do radical lipídico (L^*). Na primeira equação de propagação, o L^* reage rapidamente com o O_2 , resultando em radical peróxila (LOO^*) que, por sua vez, seqüestra novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o L^* na segunda equação de propagação. O término da lipoperoxidação ocorre quando os radicais L^* e LOO^* , produzidos nas etapas anteriores, propagam-se até destruírem a si próprios (Ferreira & Matsubara, 1997).

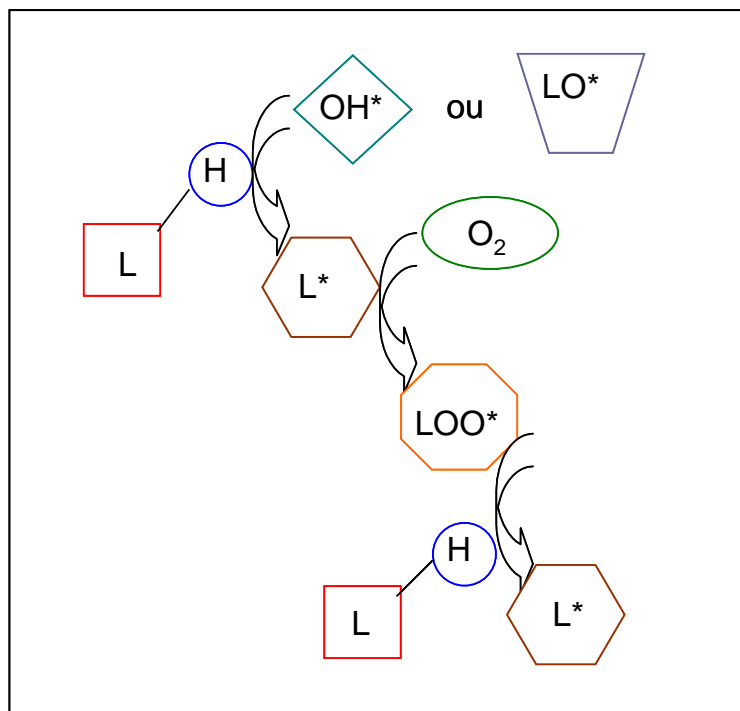


Figura 2. Esquema conceitual da seqüência de reações ocorrentes durante a peroxidação lipídica.

5.2. Pigmentos fotossintéticos

Os carotenóides encontram-se entre os mais abundantes de todos os pigmentos naturais, sendo importantes na fotossíntese por realizarem três importantes funções: a) absorvem a luz em comprimentos de onda compreendidos entre 400 e 550 nm e transferem-na às clorofilas, desempenhando papel acessório na captação luminosa; b) protegem o aparato fotossintético por extinguirem radicais livres prejudiciais que são naturalmente formados durante a fotossíntese, apresentando assim função antioxidante; c) são importantes para a estruturação do fotossistema I e para a estabilidade das proteínas que constituem os complexos coletores de luz, bem como para a estabilização das membranas dos tilacóides, tendo desta forma uma função estrutural (Mayfield & Taylor, 1984; Siefermann-Harms, 1987; Humbeck et al., 1989; Markgraf & Oelmüller, 1991; Trebst & Depka, 1997; Depka et al., 1998; Havaux, 1998; Wrisher et al., 1998; Sujak et al., 1999; Niyogi et al., 2001; Kim et al., 2004).

Portanto, a via de síntese dos carotenóides é considerada como um bom alvo para o desenvolvimento de formulação de herbicidas e muitos diferentes compostos, tais como clomazone, fluridone, norflurazon, diflufenican e flurtamone (Böger, 1996; Kana et al., 2004; Kim et al., 2004). Assim, quando o nível de carotenóides é reduzido por estes herbicidas (Böger, 1996; Jung et al., 1999; Kim et al., 2004), suas funções de proteção exercidas não podem ser mantidas. Conseqüentemente, ocorre degradação oxidativa das clorofilas e rápida destruição das membranas fotossintéticas pelo excesso de ERMO geradas. Isso resulta em descoloração, necrose, dessecação e morte dos tecidos (Böger, 1996; Foyer et al., 1994b; Bartosz, 1997; Hess, 2000; Kim et al., 2004). Esse processo, que caracteriza o estresse oxidativo, explica a morte dos tecidos verdes diferenciados causada pelos inibidores da biossíntese de carotenóides (Kim et al., 2004).

Desta forma, os pigmentos fotossintéticos têm sido freqüentemente usados como biomarcadores em relação à exposição das plantas a herbicidas (Blaise, 1993; Geoffroy et al., 2001). Isto é válido com a utilização de herbicidas que promovem a inibição das enzimas protoporfirinogênio oxidase, participante da rota de síntese das clorofilas, e da fitoeno dessaturase, componente da via sintética dos carotenóides, o que diretamente afeta a biossíntese desses pigmentos (Sandmann, 1993) ou induzem estresse oxidativo como conseqüência de seu mecanismo de ação (Couderchet & Vernet, 2003).

Assim, diversos estudos relatam a ação de herbicidas na degradação de pigmentos fotossintéticos em plantas. Em clorofilas, tal fato foi observado nos trabalhos

de Beligni & Lamattina (1999c) em plantas de batata tratadas com diquat e paraquat, Choi et al. (1999) em plantas de trigo e cevada tratadas com oxyfluorfen, Remaeh (2004) em plantas de soja tratadas com lactofen, Geoffroy et al. (2004) em algas tratadas com flumioxazin e por Bigot et al. (2007) em uva também na presença de flumioxazin. Além disso, a degradação tanto de clorofilas quanto de carotenóides foi observada por Couderchet & Vernet (2003) na alga verde *Scenedesmus obliquus* tratada com flazasulfuron e por Kana et al. (2004) em plantas de cevada tratadas com clomazone.

5.3. Açúcares solúveis

Os açúcares solúveis, que são comumente definidos como mono e dissacarídeos, desempenham um papel central na estrutura e função de todas as células vivas. Sua origem parece ser estreitamente ligada à evolução pré-biótica e ao início da evolução biótica (Hirabayashi, 1996). Assim, a glicose e a frutose são fontes ubíquas de carbono e energia para as células eucarióticas (Salerno & Curiatti, 2003).

Numa condição de elevada atividade fotossintética, que consiste em importante situação de produção de ERMO, ocorre um acúmulo de açúcares solúveis, o que regula negativamente a expressão gênica relacionada à fotossíntese (Koch, 1996; Pego et al., 2000; Rolland et al., 2002), inclusive a expressão de genes do ciclo de Calvin. Isso pode causar, pelo menos temporariamente, uma baixa reciclagem de NADP^+ e uma excessiva transferência de elétrons, o que pode levar à produção de ERMO, mesmo sob condições normais de iluminação (Couée et al., 2006).

Há relatos descritos na literatura que mencionam o fato de aplicações exógenas de açúcares solúveis protegerem plantas contra o estresse promovido pelo herbicida atrazine. Assim, tratamentos exógenos com sacarose e, em menor grau, com glicose, promoveram em plântulas de *Arabidopsis* uma tolerância muito maior ao atrazine (Sulmon et al., 2004, 2005). Tal proteção pelos açúcares solúveis é dependente de sua concentração. É válido mencionar que tratamentos com manitol não conferem qualquer proteção em relação ao atrazine, assim mostrando que o efeito protetor não pode ser atribuído a efeitos osmóticos. As plantas tratadas com açúcares são capazes de manter a atividade do fotossistema II e o crescimento fototrópico na presença de atrazine, ao passo que na ausência do açúcar ocorre total destruição por branqueamento de cotilédones emergentes e de folhas (Couée et al., 2006).

Em células de cianobactérias, Ryu et al. (2004) mostraram que, no escuro, a glicose induziu a expressão de genes de síntese de carotenóides, tendo o mesmo efeito da alta luminosidade sobre os genes de síntese de carotenóides.

No tabaco transgênico, Shen et al. (1997) verificaram que o acúmulo de manitol nos cloroplastos promove aumento da resistência dessas plantas ao estresse oxidativo, possivelmente pelo fato de ter capacidade de remover os radicais OH^* , evitando que estes reajam com componentes celulares vitais.

Também existem relatos de que os açúcares solúveis podem interagir com os hormônios vegetais. Assim, podem participar de sinalizações promovidas pelas giberelinas (Moalem-Beno et al., 1997), auxinas e citocininas (Rolland et al., 2002), salicilatos (Thibaud et al., 2004) e jasmonato (Berger et al., 1995). Além disso, a indução promovida pela glicose de genes de resposta a estresses abióticos tem sido interpretada como uma ligação com as respostas ao estresse dos hormônios ABA e etileno (Price et al., 2004).

5.4. Aspectos fitométricos e fisiológicos

Os herbicidas do grupo dos difenil-éteres, como o lactofen, podem causar na cultura da soja sintomas de injúria correspondentes a enrugamento e manchas nas folhas, as quais apresentam coloração vermelho-alaranjada. O coalescimento das manchas e a desidratação levam à necrose dos tecidos. O sintoma final é de queima da folhagem, ocorrendo paralisação temporária do crescimento da cultura. Condições de elevada temperatura e umidade relativa do ar, com luminosidade intensa durante o período de aplicação, potencializam os danos. A cultura, geralmente, retoma o crescimento dentro de três a quatro semanas (Roman, 2000).

Esses sintomas podem ser observados em poucas horas após a aplicação do herbicida. Condições de elevada umidade no solo, temperatura e umidade relativa do ar fazem com que a cutícula foliar torne-se fina, possibilitando maior absorção do herbicida pelas plantas, causando maiores efeitos fitotóxicos tanto na cultura quanto nas plantas daninhas. A fitotoxicidade pode também ser aumentada por aditivos, como surfactantes, espalhantes e pela aplicação em horários com luminosidade solar intensa (Roman, 2000).

Além dos sintomas previamente citados, Damiano Filho et al. (1992) mencionam que o lactofen também pode causar nas plantas de soja o enrugamento dos folíolos que

se encontram em desenvolvimento na época da aplicação, além de redução na altura das plantas.

6. Efeito protetor do óxido nítrico contra o estresse oxidativo

Desde sua descoberta como radical livre endógeno, o óxido nítrico (NO) tem sido considerado tanto citotóxico quanto citoprotetor (Stamler, 1994; Beligni e Lamattina, 1999a). Tal citoproteção é baseada na capacidade do NO em regular o nível e a toxicidade das ERMO (Halliwell & Gutteridge, 1984). Assim, o NO pode exercer um efeito protetor contra o estresse oxidativo promovido por uma elevação dos níveis de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e peróxidos alquilas (Wink et al., 1995). Além disso, diversos estudos também demonstram que o NO pode ter ação antioxidante por interromper as reações em cadeia que promovem a peroxidação lipídica (Hogg et al., 1993; Rubbo et al., 1994).

Sob condições oxidativas induzidas tanto por estresses bióticos quanto abióticos, os efeitos citoprotetores do NO nas plantas foram observados em culturas celulares, tecidos e órgãos e em diferentes moléculas, tais como DNA, RNA, proteínas, clorofilas e lipídios (Beligni & Lamattina, 1999b, c, 2002). Como exemplos, tem-se a citoproteção contra danos fotooxidativos em folhas de batata (Beligni & Lamattina, 2002) e contra o aumento de ERMO promovido pelo ácido giberélico na camada de aleurona de cevada durante a germinação (Beligni et al., 2002). Apesar da existência de pesquisas que mostram que o NO pode promover a ativação de enzimas antioxidantes (Rotzinger et al., 1995; Dobashi et al., 1997), bem como sua expressão gênica (Nunoshiba et al., 1993; White et al., 1995), há relatos de que o efeito protetor do NO ocorre não por ativação de enzimas antioxidantes e expressão de genes que codificam agentes oxidantes (Beligni et al., 2002; Beligni & Lamattina, 2002).

Embora o NO exerça efeito citoprotetor durante o estresse oxidativo, sua reação com o radical $O_2^{\cdot-}$ pode levar à formação de peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$), que pode promover efeitos tóxicos tais como oxidação de DNA, lipídios, tióis protéicos e grupos férricos, resultando em diminuição da atividade de enzimas, além de danos celulares (Beligni & Lamattina, 1999a; Van Breusegem et al., 2001; Lamattina et al., 2003).

Uma abordagem mais ampla de alguns aspectos relativos ao NO será apresentada no Capítulo 1, como artigo de revisão.

CAPÍTULO I

ÓXIDO NÍTRICO EM PLANTAS: UMA BREVE ABORDAGEM DESSA MOLÉCULA MULTIFUNCIONAL

RESUMO - Recentemente, diversos estudos vêm sendo realizados com a finalidade de aumentar o conhecimento sobre a ocorrência e a atividade do óxido nítrico (NO) nas plantas. Nesse sentido, a presente revisão objetivou abordar alguns aspectos referentes ao NO nos vegetais, como propriedades químicas, vias de síntese, efeitos bioquímicos e fisiológicos, interação com os hormônios vegetais, ação na sinalização a patogêneses, na expressão gênica, em processos reguladores, seu controle endógeno e o uso de substâncias doadoras dessa molécula. Assim, sua síntese pode se dar por ação da óxido nítrico sintase (NOS), tão bem como por reações que utilizam NO_2^- , pela desnitrificação e assimilação de NO_2^- e pela nitrificação do NH_4^+ . Além disso, é de conhecimento o efeito protetor do NO em plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos, tais como seca, aquecimento, estresse salino, metais pesados, herbicidas e ataque de patógenos. O NO também participa de processos como germinação e superação de dormência de sementes, senescência celular, crescimento, organogênese radicular e apoptose / morte celular programada. Na sua interação com os hormônios vegetais, o NO participa da emissão de etileno, do fechamento estomático induzido pelo ácido abscísico e da ação da citocinina, além de exercer o mesmo efeito da giberelina sobre a germinação de sementes. Seu controle endógeno ocorre por ação das hemoglobinas, por eliminação não enzimática pelo $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou por grupos tiol, ou por ação das enzimas xantina oxidase, glutathione peroxidase e S-nitrosoglutationa redutase. Dentre as substâncias exógenas doadoras de NO comumente utilizadas, encontram-se o nitroprussiato de sódio (SNP), a S-nitrosoglutationa (GSNO) e o S-nitroso-N-acetil-D-penicilamina (SNAP), entre outros. Mediante todos esses aspectos, um amplo leque se abre para que estudos mais avançados, especialmente vinculados à área de expressão gênica, sejam realizados visando maior elucidação dos mecanismos pelos quais a síntese do NO é modulada nos diferentes órgãos e compartimentos vegetais, bem como maior detalhamento dos alvos moleculares das sinalizações promovidas pelo NO.

Palavras-chave: Espécies reativas do metabolismo do oxigênio, nitrato redutase, óxido nítrico, óxido nítrico sintase.

ABSTRACT - Recently, several researches have been done in order to improve the knowledge about the occurrence and activity of nitric oxide (NO) in plants. Thus, this review aimed to discuss some aspects related to NO in plants such as chemical properties, synthesis pathways, biochemical and physiological effects, interaction with plant hormones, action in pathogenesis signaling, gene expression, regulator processes, endogenous control and use of NO donor substances. So, NO synthesis can occur by action of nitric oxide synthase (NOS), as well as reactions using NO_2^- , by denitrification and NO_2^- assimilation, and by nitrification of NH_4^+ . Besides, the protective effect of NO in plants submitted to biotic and abiotic stresses, as well as drought, warming, salt stress, heavy metals, herbicides, and pathogen attack is known. NO also participates in processes such as seed germination and dormancy breaking, cellular senescence, growth, root organogenesis and apoptosis / programmed cellular death. In its interaction with plant hormones, NO participates in ethylene emission, stomatal closure induced by abscisic acid and cytokinin action, and plays the same role as gibberelin on seed germination. Its endogenous control occurs by action of hemoglobin, through non-enzymatic elimination by $\text{O}_2^{\cdot-}$ or thiol groups, and by xanthine oxidase, glutathione peroxidase and S-nitrosoglutathione reductase enzymatic action. There are exogenous substances which are commonly used as NO donor, such as sodium nitroprusside (SNP), S-nitrosoglutathione (GSNO) and S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine (SNAP), etc. Due to all these aspects, there is a wide-scenario in order to develop more advanced studies, mainly those related to gene expression, which will clarify the mechanisms of NO synthesis modulation in several plant organs and organelles, as well as a better understanding of molecular targets of signaling performed by NO.

Key-words: Reactive oxygen species, nitrate reductase, nitric oxide, nitric oxide synthase.

1. Introdução

Por mais de 50 anos, a única molécula de sinalização conhecida pela ciência era o hormônio vegetal etileno. Em 1998, o Prêmio Nobel de Medicina anunciou o estabelecimento de outra molécula, até mesmo menor, desempenhando essa função em células de mamíferos – o óxido nítrico (NO). Esse radical livre relativamente estável foi inicialmente denominado como “fator de relaxamento derivado do endotélio”, e

posteriormente envolvido nas vias de transdução de sinal que controlam a neurotransmissão, a proliferação celular, a morte celular programada e nas respostas à infecções (Wink & Mitchell, 1998; Wojtaszek, 2000).

Extensivas pesquisas sobre o papel do NO nos animais têm demonstrado seu papel chave na sinalização, participando de uma ampla variedade de processos fisiológicos (Schmidt & Walter, 1994; Kopyra & Gwózdź, 2003). Assim, devido ao fato de o NO ser um potente agente de processos biológicos, uma renovada atenção tem sido dada aos mecanismos de síntese do NO nas plantas (Bethke et al., 2004a). Porém, é válido mencionar que a emissão de NO a partir das plantas foi observada primeiramente por Klepper em 1975 em plantas de soja tratadas com herbicidas, antes mesmo do que em animais (Klepper, 1979).

Mesmo assim, a história dos estudos sobre o NO em animais é consideravelmente muito mais avançada do que nas plantas (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007). Os reinos animal e vegetal, por serem sistematicamente distantes, têm de exibir uma certa diferenciação funcional. Assim, os sistemas vegetais são mais abertos ao ambiente e ao NO do que os vertebrados (Yamasaki, 2005). Conseqüentemente, a rede de sinalização do NO nas plantas é mais sensível à emissão exógena do NO, promovida por bactérias do solo (nitrificação / desnitrificação), fertilização do solo ou poluentes atmosféricos, ao passo que os sistemas animais são fechados e localizados em tecidos específicos (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007).

Nesse sentido, a presente revisão objetivou abordar alguns aspectos referentes ao NO nas plantas, tais como propriedades químicas, vias de síntese, efeitos bioquímicos e fisiológicos, interação com os hormônios vegetais, ação na sinalização a patogêneses, na expressão gênica, em processos reguladores, seu controle endógeno e o uso de substâncias doadoras dessa molécula.

2. Propriedades químicas

O NO é uma das menores moléculas diatômicas com elevada difusibilidade ($4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ em H_2O), exibindo propriedades hidrofóbicas, assim pode não somente migrar facilmente nas regiões hidrofílicas da célula, tal como o citoplasma, mas também difundir-se livremente pela fase lipídica das membranas (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007).

Estima-se que a meia-vida do NO em tecidos biológicos seja menor que seis segundos (Thomas et al., 2001; Bethke et al., 2004a), o que reflete a natureza altamente reativa do NO. Esta molécula reage diretamente com complexos metálicos e outros radicais e indiretamente como uma espécie reativa de óxido nitrogenado com DNA, proteínas e lipídios (Wink & Mitchell, 1998; Bethke et al., 2004a).

O NO reage prontamente com o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), formando peroxinitrito ($ONOO^-$), que em pH fisiológico é instável. Porém, devido à sua meia-vida relativamente longa, de aproximadamente um segundo, o $ONOO^-$ pode difundir-se a consideráveis distâncias na célula, reagindo com grupos tiol das proteínas e com radicais polinsaturados dos ácidos graxos dos lipídios de membrana, causando sérios danos às estruturas celulares. Além disso, os ânions $ONOO^-$ podem protonar-se, formando o ácido peroxo-dioxonítrico, uma fonte de dióxido de nitrogênio ($NO_2^{\cdot-}$) e um radical hidroxila (HO^{\cdot}) (Wendehenne et al., 2001; Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007).

Sob condições fisiológicas, a forma de radical livre do NO pode ser transformada em outras formas redox. Assim, a oxidação de um elétron do NO leva à formação do cátion nitrosônio (NO^+), enquanto que o produto da redução de um elétron do NO forma o radical nitroxila (NO^{\cdot}) (Garcia-Mata & Lamattina, 2003; Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007).

3. Síntese

Nas plantas, o NO pode ser sintetizado de diferentes maneiras (Figura 1): (i) a partir da ação da óxido nítrico sintase (NOS); (ii) a partir de reações que utilizam nitrito (NO_2^-) por reduções não-enzimáticas, em pH ácido ou na presença de luz por ação dos carotenóides, ou por ação enzimática da nitrato redutase (NR) ou da nitrito redutase (NiR); (iii) como subproduto da desnitrificação e da assimilação de nitrato (NO_3^-); (iv) como consequência da nitrificação do íon amônio (NH_4^+), que é a maior fonte de óxido nitroso (N_2O) emitido para a atmosfera onde posteriormente é oxidado a NO e NO_2 (Wojtaszek, 2000).

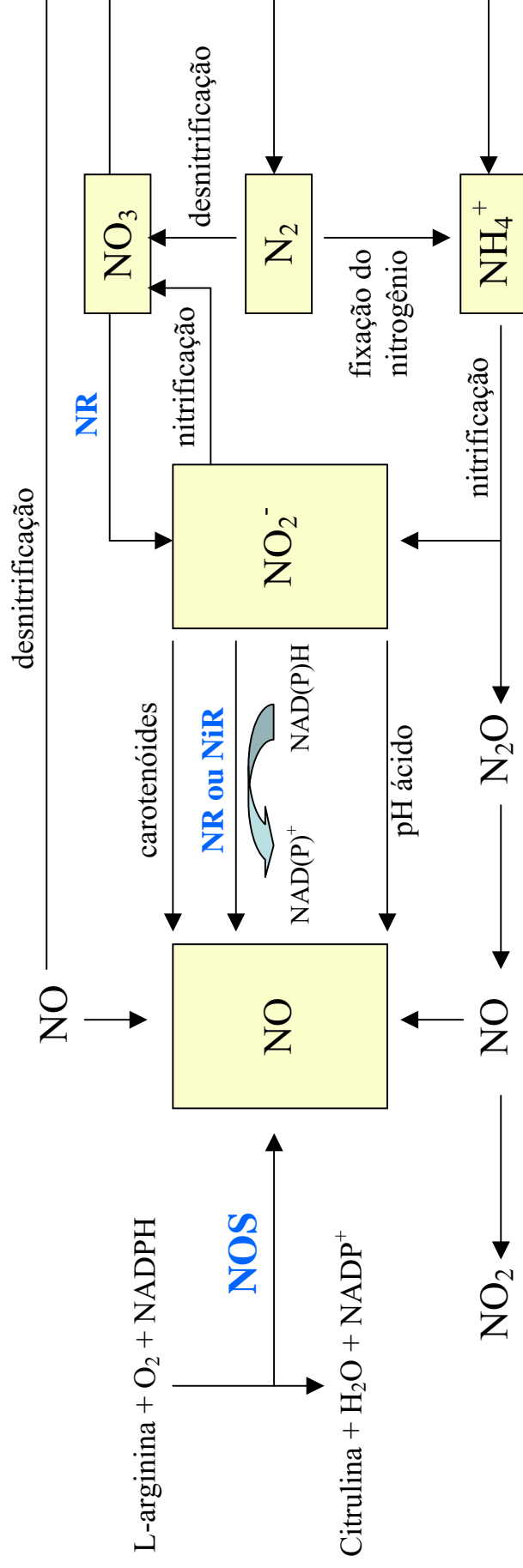


Figura 1. Esquema conceitual representando as fontes possíveis de NO nas plantas (adaptado de Wojtaszek, 2000).

3.1. Ação da óxido nítrico sintase (NOS, EC 1.14.13.39)

O NO é um radical livre gasoso lábil produzido a partir da L-arginina por ação da enzima NO sintase (NOS) em várias células de mamíferos (Schmidt & Walter, 1994; Kopyra & Gwózdź, 2003) e também nas células vegetais (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Van Camp et al., 1998; Yamasaki et al., 1999).

A NOS cataliza a oxidação da L-arginina, na presença de oxigênio e NADPH, a NO e citrulina, numa reação complexa que necessita de FAD, FMN, tetrahidrobiopterina (BH₄), cálcio e calmodulina (Knowles & Moncada, 1994; Wojtaszek, 2000; Alderton et al., 2001; Del Río et al., 2004).

Há diversas fontes potenciais de NO nas plantas, provavelmente dependendo do órgão vegetal e da situação fisiológica do organismo (Tischner et al., 2004). Desta forma, o NO é sintetizado principalmente em tecidos em crescimento, tais como eixos embrionários e cotilédones, de modo que seus níveis diminuem em órgãos maduros e em senescência (Cueto et al., 1996; Leshem et al., 1998; Caro & Puntarulo, 1999; Beligni & Lamattina, 2001).

A existência da NOS em plantas foi inferida a partir de ensaios de imunoreatividade de extratos protéicos (Sen & Cheema, 1995), bem como em tecidos (Cueto et al., 1996; Ninnemann & Maier, 1996). Subseqüentemente, foram demonstradas a indução da NOS durante interações planta-patógeno (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998), sendo que a localização da enzima é dependente da fase de crescimento (Ribeiro et al., 1999). Porém, a similaridade entre a NOS de origem vegetal e a presente nos mamíferos ainda não foi comprovada. Embora tanto a proteína quanto os genes codificadores da enzima ainda não tenham sido identificados nas plantas, um mutante de *Arabidopsis*, identificado como *AtNOS1*, foi identificado por ter prejudicado a produção de NO, o crescimento e os movimentos estomáticos induzidos pelo ABA (Guo et al., 2003; Simontacchi et al., 2004). Assim, desde que a expressão do *AtNOS1* nas plantas mutantes com um promotor viral resultou numa superprodução de NO, foi sugerido que o *AtNOS1* codifica uma NOS distinta, que regula o crescimento e a sinalização hormonal em plantas (Guo et al., 2003; Wendehenne et al., 2003; Simontacchi et al., 2004).

3.2. Ação da nitrato redutase (NR, EC 1.6.6.1)

Nas plantas, o NO também pode ser produzido a partir do NO_2^- por ação da enzima nitrato redutase (NR), na presença de um redutor, como o ascorbato (Yamasaki et al., 1999). Como essa reação direta requer a forma ácida não dissociada do NO_2^- (HNO_2 , $\text{pK} = 3,2$), a produção química de NO é virtualmente insignificante acima de pH igual a 4. Assim, normalmente o NO não pode ser produzido não-enzimaticamente a partir de NO_2^- em pH fisiológico, mas essa síntese pode ocorrer sob condições ácidas em tecidos e compartimentos (Weitzberg & Lundberg, 1998). Como exemplo, Beligni et al. (2002) observaram que o NO pode ser sintetizado pela redução do NO_2^- pelo ascorbato em pH ácido em células de aleurona em cevada. É válido mencionar que nas plantas a nitrato redutase catalisa a redução do NO_2^- até mesmo acima do pH fisiológico (Yamasaki et al., 1999).

A NR é uma flavoproteína formada por duas subunidades idênticas, com três grupos – FAD, heme e um complexo constituído entre o molibdênio (Mo) e uma molécula orgânica, a pterina (Campbell, 1999). Dean & Harper (1988) relataram que em soja uma outra forma da NR, chamada NR constituinte (cNR, EC 1.6.6.2) converte NO_2^- a NO provavelmente no centro Mo-pterina. As raízes também podem apresentar outra forma especial de NR ligada à membrana plasmática e associada ao NO_2^- (Tischner et al., 2004).

Em homogeneizados de folhas de *Arabidopsis thaliana* com carência de dois genes estruturais (*nia1* e *nia2*) para a enzima NR, há a produção de ^{15}NO quando $^{15}\text{NO}_2^-$ é fornecido, de maneira similar ao observado nas plantas não-transformadas (Modolo et al., 2005). Além disso, a produção endógena de NO detectada em homogeneizados foliares das plantas não-transformadas contrastaram-se com os níveis detectáveis nos homogeneizados das plantas deficientes em NR. Esses resultados indicam que embora a NR não tenha sido essencial para a síntese de NO a partir de NO_2^- , a enzima foi uma fonte importante de NO_2^- para a subsequente produção de NO nos homogeneizados foliares de *A. thaliana* (Modolo et al., 2006).

Estudos prévios mencionam que a produção de NO é exclusiva de leguminosas da tribo *Phaseolus*, que possuem NR (Dean & Harper, 1988). Porém, sugere-se que outras espécies vegetais além das leguminosas potencialmente produzam NO em reação catalisada pela NR (Yamasaki et al., 1999). Nas células vegetais, o NO_2^- , o NO_3^- , a NR e o NADH encontram-se presentes no mesmo compartimento, isto é, no citosol. Sob

condições ótimas, o NO_2^- é translocado aos cloroplastos e reduzido a NH_4^+ pela nitrito redutase. Porém, o NO_2^- poderia estar presente no citosol em uma significativa concentração quando o transporte de elétrons fotossintéticos não está operacional (Shingles et al., 1996). De fato, elevadas emissões de NO foram observadas em plantas tratadas com herbicida (Klepper, 1979) ou quando uma solução nutritiva rica em NO_3^- foi aplicada na ausência de luz em plantas de diversas espécies como girassol, cana de açúcar, milho, espinafre e tabaco (Wildt et al., 1997). Essas observações sugerem que as plantas são capazes de produzir NO como um subproduto do metabolismo do nitrogênio (Yamasaki et al., 1999).

A NR gera NO sob condições aeróbicas (Yamasaki & Sakihama, 2000), enquanto que a xantina oxidase também tem sido considerada como uma fonte de NO, pelo menos em condições isoladas ou sob condições anaeróbicas (Millar et al., 1997). Porém, ainda faltam evidências da atividade desta última na produção de NO nos tecidos vegetais (Hancock et al., 2002).

3.3. Ação da desnitrificação e nitrificação

O NO e o óxido nitroso (N_2O) são formados no solo durante os processos biológicos de desnitrificação e nitrificação (Firestone & Davidson, 1989). As bactérias desnitrificantes produzem ambos os gases durante a redução de NO_3^- e NO_2^- a nitrogênio molecular (N_2), enquanto que as nitrificantes produzem-nos durante a oxidação do NH_4^+ a NO_3^- . Além disso, o NO e o N_2O podem ser formados durante a quimiodesnitrificação do NO_2^- (Haynes & Sherlock, 1986). Uma vez formados no solo, pequenas quantidades desses gases podem escapar para a atmosfera (Williams et al., 1998).

4. Efeitos bioquímicos e fisiológicos

O NO parece exercer função protetora durante estresses abióticos, devido ao aumento da tolerância de algumas espécies à seca por indução do fechamento estomático (Garcia-Mata & Lamattina, 2001; Neill et al., 2002), ao estresse salino e por aquecimento em arroz (Uchida et al., 2002), estresse salino em *Lupinus luteus* (Zhao et al., 2004), estresse por cádmio em arroz (Hsu & Kao, 2004) e *Lupinus luteus* (Kopyra & Gwózdź, 2003).

Além disso, o NO neutraliza a toxidez das espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) geradas pelos herbicidas diquat e paraquat em batata e arroz (Beligni & Lamattina, 1999c, Hung et al., 2002). Publicações recentes demonstram que o NO também neutraliza o estresse oxidativo induzido pelo ácido abscísico (ABA) (Hung & Kao, 2003), metil jasmonato (Hung & Kao, 2004), excesso de cádmio (Hung & Kao, 2004) e estresse salino (Zhao et al., 2007). Orozco-Cárdenas & Ryan (2002) demonstraram que o NO bloqueia a produção de H_2O_2 induzida pelo ácido jasmônico em folhas de tomate.

O NO também neutraliza outros fenômenos como morte celular, extravasamento iônico e a fragmentação do DNA, que ocorrem nas plantas devido à geração de ERMO durante a interação planta-patógeno. Deve-se mencionar que o efeito do NO sobre os diferentes tipos de células pode ser tanto citoprotetores quanto citotóxicos, dependendo de sua concentração e condição experimental (Beligni & Lamattina, 1999b).

Por ser um radical livre altamente reativo, o NO pode eliminar outros intermediários reativos e finalizar reações propagadas em cadeia. A rápida reação entre o radical superóxido ($O_2^{\cdot*}$) e o NO para formar um dos mais poderosos oxidantes, o peroxinitrito ($ONOO^-$), tem sido sugerido como um mecanismo deletério (Leshem, 2000). Isto torna-se evidente pelo fato do $ONOO^-$ oxidar DNA, lipídios, tióis protéicos e grupos férricos, resultando em deterioração da atividade de enzimas e danos celulares (Beligni & Lamattina, 1999a; Van Breusegem et al., 2001).

Porém, em sistemas onde a toxidez é decorrente predominantemente dos peróxidos, esses compostos são muito mais tóxicos que o NO e o $ONOO^-$, fazendo do NO um agente protetor contra eles (Wink et al., 1993). Assim, a interação do NO com radicais lipídicos alcóxila ou peróxila interrompe a reação em cadeia que ocorre durante a peroxidação de lipídios (Beligni & Lamattina, 1999a; Van Breusegem et al., 2001).

Por outro lado, a inibição de algumas enzimas pelo NO pode ser benéfica. Por exemplo, a inibição da aconitase promovida pelo NO pode reduzir o fluxo de elétrons pela cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, assim diminuindo o estresse oxidativo mitocondrial (Van Breusegem et al., 2001).

O NO pode atuar na indução da apoptose em espécies vegetais (Magalhães et al., 1999) e durante a morte celular programada induzida por patógenos em *Arabidopsis* (Neill et al., 2003). Assim, propõe-se que a indução da morte celular programada é determinada pela interação entre NO e as ERMO $O_2^{\cdot*}$ e H_2O_2 (Delledonne et al., 2001). Na mitocôndria vegetal o NO inibe a atividade da citocromo oxidase e a concomitante

síntese de ATP, de modo que a atividade mitocondrial alterada estimula a morte celular programada nas células vegetais (Yamasaki et al., 2001). É suposto que a morte celular programada induzida pelo NO ocorre por inibição da respiração e liberação de citocromo c mitocondrial (Zottini et al., 2002; Neill et al., 2003; Del Río et al., 2004).

Também tem sido constatado que o NO pode reagir rapidamente com proteínas contendo grupos tiol ou metais de transição, incluindo um amplo espectro funcional de proteínas, tais como receptores, fatores de transcrição e mensageiros celulares (Stamler et al., 2001), como é o caso da ativação da guanilato ciclase promovida pelo NO por ligação ao ferro heme, o que permite sua atuação na transdução do sinal (Murad, 1986). O NO pode reagir com a glutatona para formar S-nitrosoglutatona (GSNO), que pode funcionar como um reservatório móvel de NO (Feechan et al., 2005) ou um agente de S-nitrosilação, que é representada pela ligação de um grupo NO à cadeia lateral tiol de um resíduo de cisteína (Hess et al., 2005).

Muito pouco se conhece sobre a S-nitrosilação em plantas, embora numerosas proteínas tenham sido obtidas a partir do proteoma de *Arabidopsis*, que tem uma forma degenerada de S-nitrosilação (Huber & Hardin, 2004). Recentemente, foram identificadas 63 proteínas a partir de extratos de culturas celulares de *Arabidopsis* tratados com GSNO e 52 proteínas a partir de folhas de *Arabidopsis* tratadas com NO como alvos reconhecidos para a S-nitrosilação em plantas (Lindermayr et al., 2005).

De acordo com Perazzoli et al. (2006), a caracterização dos mecanismos que regulam a S-nitrosilação / desnitrosilação auxiliarão indiscutivelmente para melhorar o conhecimento das conseqüências funcionais e a relevância da S-nitrosilação em plantas, e seria possível a identificação de possíveis mecanismos para controlar os níveis de NO e as espécies a ele relacionadas.

Embora as funções fisiológicas do NO nas plantas sejam bem menos documentadas, tem sido relatado seu envolvimento na inibição da expansão foliar, no acúmulo de fitoalexinas e na ativação de respostas de defesa contra o ataque de patógenos (Pfeiffer et al., 1995; Sen & Cheema, 1995; Leshem & Haramaty, 1996; Noritake et al., 1996; Beligni et al., 1997; Laxalt et al., 1997; Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Beligni & Lamattina, 1999c; Klessig et al., 2000). Dentre outros processos fisiológicos, o NO também está envolvido na germinação (Beligni & Lamattina, 2000; Neill et al., 2003) e superação de dormência (Bethke et al., 2006) de sementes, senescência celular (Neill et al., 2003), crescimento (Leshem & Haramaty,

1996), organogênese radicular (Pagnussat et al., 2002), e apoptose / morte celular programada (Pedroso et al., 2000a, Beligni et al., 2002).

A ação do NO em diferentes vias do processo de reprodução sexuada também tem sido detectada. A primeira evidência para o envolvimento do NO na reprodução vegetal sexuada foi demonstrada por análise de plantas de *Arabidopsis* deficientes em *AtNOS1*, que florescem anteriormente às plantas não transformadas, porém apresentam redução na inflorescência e baixa fertilidade (Guo et al., 2003). Comparando-se com essa linhagem mutante de *Arabidopsis*, plantas que produzem NO em excesso (nox1) floresceram posteriormente às plantas não transformadas (He et al., 2004). Essa superprodução é resultante do acúmulo de L-arginina, substrato da *ATNOS1* (Grün et al., 2006). O NO está também envolvido na regulação do crescimento dos tubos polínicos (Prado et al., 2004).

5. Interação entre NO e hormônios vegetais

Há muitos processos nos quais os hormônios vegetais e os fitocromos interagem ou atuam separadamente para dar as mesmas respostas, de modo que diversas dessas respostas podem ser iniciadas por ação do NO. Essa sobreposição de papéis aumenta a questão se a luz e os hormônios compartilham de componentes comuns nas vias de transdução de sinal para resultar na mesma resposta ou se o NO desempenha um papel nessa cascata de sinalização (Lamattina et al., 2003).

O NO pode participar da emissão de etileno (Leshen, 2000; Neill et al., 2003), do fechamento estomático induzido pelo ácido abscísico (ABA) (Garcia-Mata & Lamattina, 2002; Neill et al., 2002, 2003), e da ação da citocinina (CK) (Scherer & Holk, 2000). Além disso, o NO apresenta o mesmo efeito da giberelina (GA) sobre a germinação de sementes (Beligni & Lamattina, 2000; Lamattina et al., 2003).

O NO pode influenciar a biossíntese de etileno e, conseqüentemente, na maturação e na senescência do tecido vegetal (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007). A aplicação de NO exógeno às plantas modula a geração de etileno (Zhu & Zhou, 2007), sugerindo-se que ambos os gases atuem antagonisticamente. Um recente trabalho mostrou que o NO atua diretamente na inibição da síntese de etileno pela S-nitrosilação da metionina adenosiltransferase (MAT1) em plantas de *Arabidopsis*, em virtude da redução do precursor do etileno, o S-adenosilmetionina (SAM) (Lindermayr et al., 2006).

Por ser uma molécula com importantes funções nas plantas, o NO compartilha muitos componentes de sinalização com o ABA, principalmente aqueles das cascatas de sinalização acoplados à proteína G, que inclui cGMP, Ca^{2+} , cADP-ribose e a própria proteína G (Wu et al., 1997; Durner et al., 1998; Durner & Klessig, 1999; Wang et al., 2001). Assim, supõe-se um intercâmbio entre o NO e o ABA (Xing et al., 2004). Como evidências desta afirmativa, verificou-se em *Vicia faba* que o NO atua como um componente das vias de sinalização do fechamento estomático induzido pelo ABA (Garcia-Mata & Lamattina, 2001, 2002).

As CKs podem estimular respostas fotomorfogênicas, principalmente aquelas relacionadas com processos de destioloação e síntese de pigmentos (Thomas et al., 1997). Em plântulas cultivadas na ausência de luz, a aplicação exógena de CKs inibe a alongação do hipocótilo de maneira similar ao tratamento sob iluminação (Chory et al., 1994; Su e Howell, 1995). Da mesma forma, o NO significativamente reduz a alongação do hipocótilo em plântulas de *Arabidopsis* e de alface cultivadas na ausência de luz (Beligni & Lamattina, 2000).

Foi demonstrado que doadores de NO são capazes de promover a germinação, na ausência de luz, de alface cv. Grand Rapids, cujas sementes são consideradas fotoblásticas, na mesma proporção que o tratamento com GA ou um pulso de cinco minutos de luz branca (Beligni & Lamattina, 2000). Entretanto, ainda não está esclarecido se o GA e o NO promovem a germinação pelas mesmas vias ou por vias diferentes (Lamattina et al., 2003).

6. Sinalização em patogêneses

Diversos relatos na literatura indicam que as ERMO e o NO atuam como moléculas chave de sinalização nas plantas (Foyer et al., 1997; Durner & Klessig, 1999; Dat et al., 2000). A primeira descrição deste fato ocorreu na patogênese, onde a resposta de defesa inicial é freqüentemente manifestada como resposta hipersensível, cujos primeiros eventos são o rápido acúmulo de ERMO – chamado de “burst” oxidativo – e de NO (Baker & Orlandi, 1995; Lamb & Dixon, 1997; Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Van Camp et al., 1998). Essas espécies ativadas estão envolvidas na regulação da expressão gênica durante a resposta hipersensível e desempenham um papel chave na coordenação das respostas das plantas ao ataque de patógenos (Durner & Klessig, 1999; Delledonne et al., 2002; Hérouart et al., 2002; Huang et al., 2002a).

O NO também pode participar do início da resistência sistêmica adquirida (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007). Em tabaco, tal processo pode ocorrer devido ao acúmulo de ácido salicílico induzido pelo NO exógeno. A ativação da proteína *PR-I*, obtida via NO, ocorre com a participação do ácido salicílico, porém, um efeito similar não foi observado em plantas transgênicas (*NahG*) incapazes de acumulá-lo (Durner et al., 1998).

Song & Goodman (2001) relatam que a doença causada pelo vírus do mosaico do tabaco foi consideravelmente mais reduzida em folhas pré-tratadas com NO, em comparação àquelas das plantas transgênicas e que a aplicação de inibidores específicos para a NOS animal ou de eliminadores de NO reduziram a resistência sistêmica adquirida. Assim, é sugerido um importante papel do NO na indução de uma rede de sinalização à distância levando ao aumento da resistência sistêmica adquirida em tabaco (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007).

7. Expressão gênica

Assim como as ERMO, o NO também modula a expressão de genes quando adicionado às células vegetais (Hancock et al., 2002). Por exemplo, o NO aumenta a expressão de genes relacionados a respostas de defesa ao ataque de patógenos, tais como da proteína relacionada à patogênese (*PR-I*), e das enzimas fenilalanina amônia-liase (*PAL*) e glutathione S-transferase (*GST*) em soja e tabaco (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998).

Em *Arabidopsis thaliana*, o NO pode ativar a expressão dos genes da chalcona sintase (*CHS*), glutathione peroxidase (*GPX*), *GST*, oxidase alternativa (*AOX1a*), e inibir a expressão gênica da ascorbato peroxidase tilacoidal (*tAPX*) (Mackerness et al., 2001; Huang et al., 2002b; Murgia et al., 2004). Além disso, diversas pesquisas mencionam a participação do NO na indução da expressão de genes como *CHS*, *AtNOS1*, além daqueles referentes às peroxidases, ferritina e enzimas-chave da biossíntese de ácido jasmônico (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Murgia et al., 2002; Huang et al., 2002b, 2004; Guo et al., 2003; Neill et al., 2003; Del Río et al., 2004).

8. Função reguladora

Embora possua multiplicidade de potenciais alvos, apenas poucas proteínas têm sido descritas como sendo reguladas devido a interações com o NO (Wojtaszek, 2000). Como exemplo, tem-se a guanilato ciclase e a resultante ativação da via de sinalização dependente do cGMP, relação demonstrada no tabaco infectado com o vírus do mosaico do tabaco, e também a cADP-ribose (Durner et al., 1998). Além disso, como o NO facilmente forma complexos ferro-nitrosil com o ferro heme, Ferrer & Ros Barcelo (1999) mencionam que o NO exerce efeito no funcionamento de peroxidases vegetais que participam da lignificação da parede celular.

O NO também pode participar da regulação de respostas de defesa das plantas à infecção por patógenos (Noritake et al., 1996; Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Wojtaszek, 2000), aparentemente por um intercâmbio regulatório entre o NO, as ERMO e o ácido salicílico. Assim, reações diretas ou indiretas do NO e das ERMO poderiam estar envolvidas por meio de ativação / repressão das respectivas vias de sinalização levando a mudanças na expressão gênica e nos níveis de atividade das proteínas (Bolwell, 1999; Durner & Klessig, 1999; Wojtaszek, 2000).

Em células de tabaco, o NO contribui para um aumento no nível de cálcio (Ca^{2+}) citosólico como uma consequência da aplicação de estresse hiperosmótico e do tratamento com um eliciador fúngico, a criptogeína (Gould et al., 2003; Lamotte et al., 2004). De maneira similar, durante o fechamento estomático induzido pelo ABA nas células-guarda, a participação do NO correlacionou-se com um aumento da concentração de Ca^{2+} citosólico (Neill et al., 2002; Garcia-Mata & Lamattina, 2003). Uma importante evidência de que o NO regula a homeostase citosólica do Ca^{2+} nas células vegetais foi recentemente constatada por Lamotte et al. (2006). Em células de *Nicotiana plumbaginifolia*, os autores verificaram que o NO foi capaz de ativar canais permeáveis ao Ca^{2+} , tanto intracelulares quanto da membrana plasmática, via cascatas de sinalização envolvendo despolarização da membrana plasmática, cADPR e proteínas quinases. Eles caracterizaram primeiramente o alvo do NO, que aparentemente foi uma proteína quinase de 42 kDa pertencente às famílias SnRK2, ativadas em resposta ao NO.

O tratamento com NO pode causar aumentos temporários nos níveis de cGMP em *Picea* (Pfeiffer et al., 1994). Em sementes de *Paulownia tomentosa*, o NO participa

do controle da germinação, como consequência de seu efeito estimulador da produção de cGMP (Giba, 1998).

9. Controle endógeno

Níveis elevados de NO podem exercer efeitos benéficos, como por exemplo participar de respostas de defesa, mas também podem ser nocivos à célula vegetal. Isto se deve ao fato de o NO ter elevada reatividade com o oxigênio, as ERMO e metais (Beligni & Lamattina, 1999a; Stöhr & Stremlau, 2006). Entre os efeitos deletérios, estão a peroxidação de lipídios, a oxidação da tirosina, assim como a S-nitrosilação (Millar & Day, 1997; Yamasaki et al., 2001; Stöhr & Stremlau, 2006).

A interação do NO com proteínas que contêm ferro pode levar à inibição de enzimas, tais como a citocromo c oxidase da respiração mitocondrial (Millar & Day, 1997; Yamasaki et al., 2001; Stöhr & Stremlau, 2006).

Perazzolli et al. (2006) mencionam que as hemoglobinas regulam os níveis endógenos de NO. Sob condições aeróbicas, as hemoglobinas vegetais reagem com o NO formando NO₃, assim modificando o nível de NO nas plantas (Perazzolli et al., 2004).

Além da desintoxicação de NO pelas hemoglobinas e a eliminação não enzimática do NO pelo O₂^{-*} ou por grupos tiol, as plantas podem possuir mecanismos adicionais para a metabolização e controle dos níveis de NO sob diferentes condições (Perazzolli et al., 2006). Nesse sentido, algumas enzimas tais como a xantina oxidase, glutathiona peroxidase e GSNO redutase (GSNOR) podem romper espécies relacionadas ao NO (Sies et al., 1997; Trujillo et al., 1998; Díaz et al., 2003).

10. Substâncias doadoras de NO

Doadores de óxidos nitrogenados são compostos que produzem NO quando aplicados a sistemas biológicos e são capazes ou de imitar uma resposta relacionada ao NO endógeno ou substituir o NO endógeno quando deficiente. As vias que levam à formação de NO diferem-se amplamente entre os vários grupos de compostos, alguns dos quais requerem catálise enzimática, enquanto outros o produzem não-enzimaticamente (Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

Os complexos NO - metais de transição representam uma importante classe de doadores de NO. O mais comumente usado é o nitroprussiato de sódio (SNP). Ele atua como um poderoso ligante, em que o nitrogênio liga-se ao metal em maior proporção do que o oxigênio. O mecanismo de liberação do NO a partir do SNP não é claro, embora seja conhecido e usado na terapia clínica por mais de 70 anos. A solução de SNP é extremamente fotossensível e sua degradação pode ser promovida pelo oxigênio e por elevada temperatura (Wang et al., 2002; Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

A liberação de NO do doador requer iluminação ou uma redução eletrônica simples, que sob condições fisiológicas pode depender de muitos agentes redutores presentes nos sistemas biológicos, tais como ascorbato, tióis, hemeproteínas, assim como NADH e NADPH (Wang et al., 2002; Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

De acordo com Modolo et al. (2002) é necessário o conhecimento do mecanismo e da cinética de liberação de NO do doador, o que depende de fatores externos e da toxidez de produtos acumulados.

Assim como os hormônios vegetais, o efeito do NO é dependente de sua concentração. Desse modo, concentrações muito elevadas do doador podem promover inibição de um determinado processo, ao contrário de estímulo, de modo que os resultados obtidos não refletirão a ação do NO endógeno na célula. As concentrações de doador comumente aplicadas variam de 10 a 500 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, embora existam relatos de concentrações muito maiores, no máximo iguais a 10 mmol.L^{-1} (Modolo et al., 2002; Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

A aplicação de NO exógeno às plantas ou culturas celulares permite a obtenção de informações valiosas de como essa molécula afeta alguns processos fisiológicos e bioquímicos (Del Río et al., 2004).

Em folhas de arroz foi demonstrado que doadores de NO reduziram a toxidez do paraquat por meio da diminuição da peroxidação de lipídios (Hung et al., 2002). Mais recentemente, Cheng et al. (2002) relataram que a promoção da senescência foliar causada pelo polietileno glicol e pela desidratação, que induzem peroxidação de lipídios, pode ser neutralizada por doadores de NO.

Além disso, a aplicação de NO às plantas tem proporcionado evidências de seu papel mediador na inibição das atividades da catalase, ascorbato peroxidase e da aconitase (Clark et al., 2000; Navarre et al., 2000), lignificação da parede celular (Ferrer & Ros Barcelo, 1999), regulação de canais iônicos das células-guarda (Garcia-Mata et al., 2003), funcionalidade do cloroplasto e da mitocôndria (Yamasaki et al., 2001;

Takahashi & Yamasaki, 2002; Zottini et al., 2002); morte celular (Pedroso et al., 2000b; Saviani et al., 2002; Pinto et al., 2002), senescência (Leshem, 1996; Hung & Kao, 2003), acúmulo de ferritina (Murgia et al., 2002) e sinalização de ferimentos (Orozco-Cárdenas & Ryan, 2002).

Em relação às sementes, pesquisas relatam a capacidade do SNP em reduzir a dormência em diversas espécies, tais como *Arabidopsis* (Batak et al., 2002; Bethke et al., 2004b), cevada (Bethke et al., 2004b), alface (Beligni & Lamattina, 2000) e *Paulownia tomentosa* (Giba et al., 1998). Assim, propõe-se que o NO atue na superação de dormência ou na germinação das sementes dessas espécies (Bethke et al., 2006).

Além do SNP, os S-nitrosotióis (RSNOs) pertencem a um importante grupo de doadores de NO. Os doadores mais freqüentemente aplicados desse grupo são a nitrosoglutationa (GSNO) e o S-nitroso-*N*-acetil-D-penicilamina (SNAP) (Floryszak-Wieczorek et al., 2006).

11. Perspectivas

Embora pesquisas relacionadas aos efeitos do NO sob diferentes aspectos nos vegetais sejam relativamente recentes, constata-se que esta molécula, mesmo apresentando estrutura molecular bastante simples, encontra-se envolvida em diversos mecanismos bioquímicos e fisiológicos em plantas submetidas a múltiplas condições de estresses bióticos e abióticos.

Assim, um amplo espectro se abre para que estudos mais avançados, especialmente vinculados à área de expressão gênica, sejam realizados, visando maior elucidação dos mecanismos pelos quais a síntese do NO é modulada nos diferentes órgãos e compartimentos vegetais, bem como maior detalhamento dos alvos moleculares das sinalizações promovidas pelo NO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v.357, p.593-615, 2001.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Sci.**, v.172, p.876-87, 2007.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.33, p.299-321, 1995.

BATAK, I., DEVIC, M., GIBA, Z., GRUBISIC, D., POFF, K.L., KONJEVIC, R. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Seed Sci. Res.**, v.12, p.253-259, 2002.

BELIGNI, M.V., FATH, A., BETHKE, P.C., LAMATTINA, L., JONES, R.L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiol.**, v.129, p.1642-50, 2002.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? **Trends Plant Sci.**, v.4, p.299-300, 1999a.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-44, 1999b.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v.3, p.199-208, 1999c.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-221, 2000.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.508-509, 2001.

BELIGNI, M.V., LAXALT, A., LAMATTINA, L. Putative role of nitric oxide in plant-pathogen interactions. In: INTERNATIONAL MEETING ON THE BIOLOGY OF NITRIC OXIDE, 5, 1997, Kyoto. **Proceedings...** London: Portland Press, 1997. p.250.

BETHKE, P.C., BADGER, M.R., JONES, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, v.16, p.332-41, 2004a.

BETHKE, P.C., GUBLER, F., JACOBSEN, J.V., JONES, R.L. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, v.219, p.847-55, 2004b.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L., JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.517-26, 2006.

BOLWELL, G.P. Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.287-94, 1999.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.50, p.277-303, 1999.

CARO, A., PUNTARULO, S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. **Free Radic. Res.**, v.31, S205-S212, 1999.

CHENG, F.Y., HSU, S.Y., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of detached rice leaves induced by dehydration and polyethylene glycol but not by sorbitol. **Plant Growth Regul.**, v.38, p.265-72, 2002.

CHORY, J., REINECKE, D., SIM, S., WASHBURN, T., BRENNER, M. A role for cytokinins in de-etiolation of *Arabidopsis.det* mutants have an altered response to cytokinins. **Plant Physiol.**, v.104, p.339-47, 1994.

CLARK, D., DURNER, J., NAVARRE, D.A., KLESSIG, D.F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.13, p.1380-4, 2000.

CUETO, M., HERNANDEZ-PERERA, O., MARTIN, R., BENTURA, M.L., RODRIGO, J., LAMAS, S., GOLVANO, M.P. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. **FEBS Lett.**, v.398, p.159-64, 1996.

DAT, J.F., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell Mol. Life Sci.**, v.57, p.779-95, 2000.

DEAN, J.V., HARPER, J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiol.**, v.88, p.389-95, 1988.

DEL RÍO, L.A., CORPAS, F.J., BARROSO, J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, v.65, p.783-92, 2004.

DELLEDONNE, M., MURGIA, I., EDERLE, D., SBICEGO, P.F., BIODANI, A., POLVERARI, A., LAMB, C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p. 605-10, 2002.

DELLEDONNE, M., XIA, Y., DIXON, R.A., LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-8, 1998.

DELLEDONNE, M., ZEIER, J., MAROCCO, A., LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13454-9, 2001.

DÍAZ, M., ACHKOR, H., TITARENKO, E., MARTÍNEZ, M.C. The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. **FEBS Lett.**, v.543, p.136-9, 2003.

DURNER, J., KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.369-74, 1999.

DURNER, J., WENDEHENNE, D., KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-3, 1998.

FEECHAN, A., KWON, E., YUN, B.W., WANG, Y., PALLAS, J.A., LOAKE, G.J. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.22, p.8054-9, 2005.

FERRER, M.A., ROS BARCELO, A. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. **Plant Cell Environ.**, v.22, p.891-7, 1999.

FIRESTONE, M.K., DAVIDSON, E.A. Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: ANDREAE, M.O., SCHIMEL, D.S. (Eds). **Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere**. Chichester: Wiley, 1989. p.7-21.

FLORYSZAK-WIECZOREK, J., MILCZAREK, G., ARASIMOWICZ, M., CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v.224, p.1363-72, 2006.

FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F., SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiol. Plant.**, v.100, p.241-54, 1997.

GARCIA-MATA, C., GAY, R., SOKOLOVSKI, S., HILLS, A., LAMATTINA, L., BLATT, M.R. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.11116-21, 2003.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? **Trends Plant Sci.**, v.8, p.20-6, 2003.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.790-2, 2002.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.**, v.126, p.1196-204, 2001.

GIBA, Z. The effect of NO-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seed. **Plant Growth Regul.**, v.26, p.175-81, 1998.

GIBA, Z., GRUBISIC, D., TODOROVIC, S., SAJC, L., STOJAKOVIC, D., KONJEVIC, T. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regul.**, v.26, p.175-81, 1998.

GOULD, K.S., LAMOTTE, O., KLINGUER, A., PUGIN, A., WENDEHENNE, D. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? **Plant Cell Environ.**, v.26, p.1851-62, 2003.

GRÜN, S., LINDERMAYR, C., SELL, S., DURNER, J. Nitric oxide and gene regulation in plants. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.507-16, 2006.

GUO, F.Q., OKAMOTO, M., CRAWFORD, N.M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. **Science**, v.302, p.100-3, 2003.

HANCOCK, J.T., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R.D., NEILL, S.J. Cell signaling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.611-7, 2002.

HAYNES, R.J., SHERLOCK, R.R. Gaseous losses of nitrogen. In: HAYNES, R.J. (Ed). **Mineral nitrogen in the plant-soil system**. Academia Press, 1986. p.242-302.

HE, Y., TANG, R.H., HAO, Y., STEVENS, R.D., COOK, C.W., AHN, S.M., JING, L., YANG, Z., CHEN, L., GUO, F., FIORANI, F., JACKSON, R.B., CRAWFORD, N.M.,

PEI, Z.M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. **Science**, v.305, p.1968-71, 2004.

HÉROUART, D., BAUDOIN, E., FRENDO, P., HARRISON, J., SANTOS, R., JAMET, A., VAN DE SYPE, G., TOUATI, D., PUPPO, A. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p.619-24, 2002.

HESS, D.T., MATSUMOTO, A., KIM, S.O., MARSHALL, H.E., STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.2, p.150-66, 2005.

HSU, Y.T., KAO, C.H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul.**, v.42, p. 227-38, 2004.

HUANG, X., KIEFER, E., VON RAD, U., ERNST, D., FOISSNER, I., DURNER, J. Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.625-31, 2002a.

HUANG, X., STETTMAIER, K., MICHEL, C., HUTZLER, P., MUELLER, M.J., DURNER, J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.218, p.938-46, 2004.

HUANG, X., VON RAD, U., DURNER, J. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. **Planta**, v.215, p.914-23, 2002b.

HUBER, S.C., HARDIN, S.C. Numerous post-translational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.3, p.318-22, 2004.

HUNG, K.T., CHANG, C.J., KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-66, 2002.

HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.161, p.43-52, 2004.

HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. **J. Plant Physiol.**, v.160, p.871-79, 2003.

KLEPPER, L. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. **Atmos. Environ.**, v.13, p.537-42, 1979.

KLESSIG, D.F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J.M., SHAH, J., ZHAUD, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E., SILVA, H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.8849-55, 2000.

KNOWLES, R.G., MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v.298, p.249-58, 1994.

KOPYRA, M., GWÓZDZ, F.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-7, 2003.

LAMATTINA, L., GARCIA-MATA, C., GRAZIANO, M., PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.54, p.109-36, 2003.

LAMB, C., DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.48, p.251-75, 1997.

LAMOTTE, O., COURTOIS, C., DOBROWOLSKA, G., BESSON, A., PUGIN, A., WENDEHENNE, D. Mechanism of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v.40, p.1369-76, 2006.

LAMOTTE, O., GOULD, K., LECOURIEUX, D., SEQUEIRA-LEGRAND, A., LEBRUN-GARCIA, A., DURNER, J., PUGIN, A., WENDEHENNE, D. Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. **Plant Physiol.**, v.135, p.516-30, 2004.

LAXALT, A., BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.73, p.643-51, 1997.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regul.**, v.18, p.155-9, 1996.

LESHEM, Y.Y. **Nitric oxide in Plants. Occurrence, Function and Use.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 154p.

LESHEM, Y.Y., HARAMATY, E. Plant ageing: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. **J. Plant Physiol.**, v.148, p.258-63, 1996.

LESHEM, Y.Y., WILLIS, R.B.H., KU, V.V.V. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.825-33, 1998.

LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., BAHNWEG, G., DURNER, J. Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.4285-91, 2006.

LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., DURNER, J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v.137, p.921-30, 2005.

MACKERNESS, S.A.H., JOHN, C.F., JORDAN, B., THOMAS, B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Lett.**, v.489, p.237-42, 2001.

MAGALHÃES, J.R., PEDROSO, M.C., DURZAN, D.J. Nitric oxide, apoptosis and plant stresses. **Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 5, p.115-25, 1999.

MILLAR, A.H., DAY, D.A. Alternative solutions to radical problems. **Trends Plant Sci.**, v.2, p.289-90, 1997.

MILLAR, T.M., STEVENS, C.R., BLAKE, D.R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. **Biochem. Soc. Trans.**, v.25, p.528, 1997.

MODOLO, L.V., AUGUSTO, O., ALMEIDA, I.M.G., MAGALHÃES, J.R., SALGADO, I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. **FEBS Lett.**, v.579, p.3814-20, 2005.

MODOLO, L.V., AUGUSTO, O., ALMEIDA, I.M.G., PINTO-MAGLIO, C.A.F., OLIVEIRA, H.C., SELIGMAN, K., SALGADO, I. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. **Plant Sci.**, v.171, p.34-40, 2006.

MODOLO, L.V., CUNHA, F.Q., BRAGA, M.R., SALGADO, I. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* elicitor. **Plant Physiol.**, v.130, p.1288-97, 2002.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J. Clin. Invest.**, v.78, p.1-5, 1986.

MURGIA, I., DELLEDONNE, M., SOAVE, C. Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. **Plant J.**, v. 30, p.521-8, 2002.

MURGIA, I., TARANTINO, D., VANNINI, C., BRACALE, M., CARRAVIERI, S., SOAVE, C. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylacoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photo-oxidative stress to nitric oxide-induced cell death. **Plant J.**, v.38, p.940-53, 2004.

NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., DURNER, J., NOAD, R., KLESSIG, D.F. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. **Plant Physiol.**, v.122, p.573-82, 2000.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HANCOCK, J.T. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-6, 2002.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytol.**, v.159, p.11-35, 2003.

NINNEMANN, H., MAIER, J. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. **Photochem. Photobiol.**, v.64, p.393-398, 1996.

NORITAKE, T., KAWAKITA, K., DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant Cell Physiol.**, v.37, p.113-6, 1996.

OROZCO-CÁRDENAS, M., RYAN, C.A. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. **Plant Physiol.**, v.130, p.487-93, 2002.

PAGNUSSAT, G.C., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiol.**, v.129, p.954-6, 2002.

PEDROSO, M.C., MAGALHÃES, J.R., DURZAN, D. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. **J. Exp. Bot.**, v.51, p.1027-36, 2000a.

PEDROSO, M.C., MAGALHÃES, J.R., DURZAN, D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. **Plant Sci.**, v.157, p.173-80, 2000b.

PERAZZOLLI, M., DOMINICI, P., ROMERO-PUERTAS, M.C., ZAGO, E.D., ZEIER, J., SONODA, M., LAMB, C., DELLEDONNE, M. *Arabidopsis* non-symbiotic haemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. **Plant Cell**, v.16, p.1-10, 2004.

PERAZZOLLI, M., ROMERO-PUERTAS, M.C., DELLEDONNE, M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.479-88, 2006.

PFEIFFER, S., JANISTYN, B., JESSNER, G., PICHORNER, H., EBERMANN, R. Gaseous nitric oxide stimulates guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) formation in spruce needles. **Phytochemistry**, v.36, p.259-62, 1994.

PFEIFFER, S., JANISTYN, B., SOJA, G., KOESLING, D., MAYER, B., EBERMANN, R. Detection of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in higher plants. **J. Endothel. Cell Res.**, v.3, [Abstract 66], 1995.

PINTO, M.C., TOMMASI, F., GARA, I. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. **Plant Physiol.**, v.130, p.698-708, 2002.

PRADO, A.M., PORTERFIELD, D.M., FEIJO, J.A. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. **Development**, v.131, p.2707-14, 2004.

RIBEIRO, E.A., CUNHA, F.Q., TAMASHIRO, W.M.S.C., MARTINS, I.S. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. **FEBS Lett.**, v.445, p.283-6, 1999.

SAVIANI, E.E., ORSI, C.H., OLIVEIRA, J.F.P., PINTO-MAGLIO, C.A.F., SALGADO, I. Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide induced plant cell death. **FEBS Lett.**, v.510, p.136-40, 2002.

SCHERER, G.F.E., HOLK, A. NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. **Plant Growth Regul.**, v.32, p.345-50, 2000.

SCHMIDT, H.H.W.H., WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, p.919-25, 1994.

SEN, S., CHEEMA, I.R. Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. **Biochem. Arch.**, v.11, p.221-7, 1995.

SHINGLES, R., ROH, M.H., McCARTY, R.E. Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles. **Plant Physiol.**, v.112, p.1375-81, 1996.

SIES, H., SHAROV, V.S., KLOTZ, L.O., BRIVIBA, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.27812-7, 1997.

SIMONTACCHI, M., JASID, S., PUNTARULO, S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. **Plant Sci.**, v.167, p.839-47, 2004.

SONG, F., GOODMAN, R.M. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.12, p.1458-1462, 2001.

STAMLER, J.S., LAMAS, S., FANG, F.C. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, v.6, p.675-83, 2001.

STÖHR, C., STREMLAU, S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.463-70, 2006.

SU, W., HOWELL, S.H. The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. **Plant Physiol.**, v.108, p.1423-30, 1995.

TAKAHASHI, S., YAMASAKI, H. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. **FEBS Lett.**, v.512, p.145-8, 2002.

THOMAS, D.D., LIU, X., KANTROW, S.P., LANCASTER, J.R. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.355-60, 2001.

THOMAS, T.H., HARE, P.D., VAN STADEN, J. Phytochrome and cytokinin responses. **Plant Growth Regul.**, v.23, p.105-22, 1997.

TISCHNER, R., PLANCHET, E., KAISER, W.M. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. **FEBS Lett.**, v.576, p.151-5, 2004.

TRUJILLO, M., ALVAREZ, M.N., PELUFFO, G., FREEMAN, B.A., RADI, R. Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.7828-34, 1998.

UCHIDA, A., JAGENDORF, A.T., HIBINO, T., TAKABE, T., TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-23, 2002.

VAN BREUSEGEM, F., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci.**, v.161, p.405-14, 2001.

VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M., INZE, D. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. **Trends Plant Sci.**, v.3, p.330-4, 1998.

WANG, P.G., XIAN, M., TANG, X., WU, X., WEN, Z., CAI, T., JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem. Rev.**, v.102, p.1091-1134, 2002.

WANG, X.Q., ULLAH, H., JONES, A.M., ASSMANN, S.M. G proteins regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. **Science**, v.292, p.2070-2, 2001.

WEITZBERG, E., LUNDBERG, J.O.N. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. **Nitric Oxide**, v.2, p.1-7, 1998.

WENDEHENNE, D., LAMOTTE, O., PUGIN, A. Plant iNOS: conquest of the Holy Grail. **Trends Plant Sci.**, v.8, p.465-8, 2003.

WENDEHENNE, D., PUGIN, A., KLESSIG, D.F., DURNER, J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.177-83, 2001.

WILDT, J., KLEY, D., ROCKEL, A., ROCKEL, P., SEGSCHNEIDER, H.J. Emission of NO from several higher plant species. **J. Geo. Res.**, v.102, p.5919-28, 1997.

WILLIAMS, P.H., JARVIS, S.C., DIXON, E. Emission of nitric oxide and nitrous oxide from soil under field and laboratory conditions. **Soil Biol. Biochem.**, v.30, p.1885-93, 1998.

WINK, D.A., HANBAUER, I., KRISHNA, M.C., DE GRAFF, W., GAMSON, J., MITCHEL, J.B. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.9813-7, 1993.

WINK, D.A., MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v.25, p.434-56, 1998.

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

WU, Y., KUZMA, J., MARÉCHAL, E., GRAEFF, R., LEE, H.C., FOSTER, R., CHUA, N.H. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. **Science**, v.278, p.2126-30, 1997.

XING, H., TAN, L., AN, L., ZHAO, Z., WANG, S., ZHANG, C. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. **Plant Growth Regul.**, v.42, p.61-8, 2004.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS Lett.**, v.468, p.89-92, 2000.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y., TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. **Trends Plant Sci.**, v.4, p.128-9, 1999.

YAMASAKI, H., SHIMOJI, H., OHSHIRO, Y., SAKIHAMA, Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v.5, p.261-70, 2001.

YAMASAKI, H. The NO world for plants: achieving balance in an open system. **Plant Cell Environ.**, v.28, p.78-84, 2005.

ZHAO, L., ZHANG, F., GUO, J., YANG, Y., LI, B., ZHANG, L. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Physiol.**, v.134, p.848-57, 2004.

ZHAO, M., ZHAO, X., WU, Y., ZHANG, L. Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. **J. Plant Physiol.**, v.164, p.737-45, 2007.

ZHU, S.H., ZHOU, J. Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage. **Food Chem.**, v.100, p.1517-22, 2007.

ZOTTINI, M., FORMENTIN, E., SCATTOLIN, M., CARIMI, F., LOSCHIAVO, F., TERZI, M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. **FEBS Lett.**, v.515, p.75-8, 2002.

CAPÍTULO II

A INJÚRIA FOLIAR CAUSADA PELO LACTOFEN EM SOJA É REDUZIDA PELO ÓXIDO NÍTRICO

RESUMO - O lactofen é um herbicida do grupo dos difenil-éteres recomendado para o controle de plantas daninhas de folhas largas na cultura da soja e possui como mecanismo de ação a inibição da enzima protoporfirinogênio-IX oxidase (Protox), que catalisa a etapa de oxidação do protoporfirinogênio-IX a protoporfirina-IX (proto-IX) na via de biossíntese das clorofilas e citocromos. Essa inibição é acompanhada por um acúmulo de proto-IX, que leva à formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), gerando estresse oxidativo. Como consequência, podem ocorrer manchas, enrugamento e queima das folhas, o que leva à paralisação temporária do crescimento da cultura. Em contrapartida, o óxido nítrico (NO) é uma molécula capaz de eliminar intermediários reativos e assim finalizar reações propagadas em cadeia, podendo atuar como um antioxidante, por eliminar diretamente as ERMO. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o pré-tratamento de plantas de soja com solução de nitroprussiato de sódio (SNP), substância doadora de NO, promove proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen. Assim, plantas de soja no estágio fenológico V3, após pré-tratamento com as diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por dois dias consecutivos, foram pulverizadas com lactofen na dose recomendada para esta cultura, equivalente a 0,7 L.ha⁻¹. Aos dois, quatro e sete dias após a aplicação de lactofen (DAAL) foram realizadas avaliações visuais de injúria, e aos 7 e 14 DAAL as plantas foram avaliadas quanto à altura, comprimento de raiz e contagem do número de folíolos. Em seguida, foram separadas em lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes, dos quais se quantificou a matéria seca. O material seco foi utilizado para a quantificação dos teores de açúcares solúveis totais e redutores, indicadores bioquímicos de estresse oxidativo. O pré-tratamento com SNP foi benéfico para as plantas de soja, pelo fato de o NO ter reduzido os sintomas de injúria causados pelo lactofen nos folíolos jovens, além de manter baixos teores de açúcares solúveis totais e redutores. Porém, o NO proporcionou crescimento mais lento das plantas. Diante destes resultados, sugerem-se posteriores estudos que busquem uma maior elucidação dos mecanismos pelos quais o NO pode atuar na sinalização do estresse promovido pelo lactofen na cultura da soja.

Palavras-chave: Açúcares solúveis, crescimento vegetal, estresse oxidativo, *Glycine max* L. Merrill, lactofen, óxido nítrico.

ABSTRACT - Lactofen is a diphenylether herbicide recommended for control of broadleaf weeds in soybean fields and its mechanism of action is the inhibition of protoporphyrinogen-IX oxidase (Protox), which catalyses oxidation of protoporphyrinogen-IX to protoporphyrin-IX (proto-IX) in the chlorophyll and cytochrome biosynthesis pathway. This inhibition is followed by an accumulation of proto-IX, which leads to production of reactive oxygen species (ROS) and generates oxidative stress. Consequently, spots, wrinkles and leaf burn can occur, which results in transitory cessation of crop growth. However, nitric oxide (NO) is a molecule able to scavenge reactive intermediaries and to end chain reactions, thus acting as an antioxidant in the direct ROS scavenging. So, this research aimed to evaluate if the pre-treatment of soybean plants with sodium nitroprusside (SNP) solution, a NO donor substance, promotes protection against oxidative stress generated by lactofen. Thus, soybean plants at V3 phenologic stage were pre-treated with different SNP levels (0, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) for two consecutive days and on third day they were sprayed with lactofen at recommended rate for this crop, equivalent to 0.7 L.ha⁻¹. At two, four and seven days after application of lactofen (DAAL), visual injury evaluations were performed and at 7 and 14 DAAL the plants were evaluated for height, root length and leaflets number count. Afterwards, the plants were separated into leaf blades, stems plus petioles and roots, from which dry matter was determined. Dry matter was used for quantification of total and reducing soluble sugar levels, which are oxidative stress biochemical indicators. Pre-treatment with SNP was beneficial to soybean plants, because NO decreased the injury symptoms caused by lactofen on young leaflets, and kept low the total and reducing soluble sugar levels. However, NO caused slower growth of the plants. From these results, further researches are suggested in order to elucidate the NO action mechanisms on signaling the stress caused by lactofen at soybean crop.

Key-words: *Glycine max* L. Merrill, lactofen, nitric oxide, oxidative stress, plant growth, soluble sugars.

INTRODUÇÃO

Intermediários químicos reativos derivados de várias substâncias têm sido considerados como agentes causadores de muitos mecanismos toxicológicos (Halliwell & Gutteridge, 1984). Dentre tais compostos, as espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), representadas pelos radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2), são as mais importantes dos sistemas biológicos, devido sua abundância e interconvertibilidade (Scandalios, 1993; Beligni & Lamattina, 1999b).

Níveis excessivos de ERMO resultam em danos ao aparato fotossintético através da fotoinibição, levando a severos danos celulares e à clorose nas folhas (Van Breusegem et al., 2001). Assim, o controle dos níveis endógenos de ERMO tem aberto ampla possibilidade de serem usadas como moléculas sinalizadoras no crescimento, desenvolvimento, respostas a estresses e interações bióticas (Ryter & Tyrrel, 1998; Mittler et al., 2004). A formação de ERMO pode ser induzida por diversos xenobióticos, tais como irradiação, poluição atmosférica, ozônio ou patógenos (Scandalios, 1993; Beligni & Lamattina, 1999b).

Alguns herbicidas apresentam como mecanismo de ação a geração de ERMO, tendo como consequência o estresse oxidativo nas plantas, como é o caso do lactofen, herbicida do grupo dos difenil éteres que é recomendado para a cultura de soja no controle de plantas daninhas (Rodrigues & Almeida, 1998). Os herbicidas deste grupo são conhecidos por inibirem a enzima protoporfirinogênio-IX oxidase (Protox, EC 1.3.3.4), que catalisa a etapa de oxidação do protoporfirinogênio-IX a protoporfirina-IX (proto-IX) na via de biossíntese das clorofilas (Matringe et al., 1989). Essa inibição é acompanhada por um acúmulo anormal de proto-IX e finalmente leva à formação de hidrocarbonetos de cadeia curta, como o etano, e como resultado dessas reações, as plantas perdem a coloração e morrem. A formação de hidrocarbonetos ocorre devido à ação das ERMO, que são originadas a partir do oxigênio molecular pelo acúmulo de proto-IX na presença de luz, levando à destruição fotooxidativa das membranas vegetais (Watanabe et al., 2001).

Entretanto, o lactofen pode causar na cultura da soja redução de altura das plantas, bem como sintomas de injúria correspondentes a enrugamento dos folíolos em desenvolvimento e manchas nas folhas, as quais apresentam coloração vermelho-alaranjada. O coalescimento das manchas e a desidratação levam à necrose dos tecidos.

O sintoma final é de queima da folhagem, ocorrendo paralisação temporária do crescimento da cultura, que geralmente retoma o crescimento dentro de três a quatro semanas (Damião Filho et al., 1992; Roman, 2000).

Por outro lado, tem sido detectado que o óxido nítrico (NO), produzido enzimaticamente em células vegetais, protege as plantas das ERMO geradas por alguns herbicidas. Assim, foi verificado que o NO neutralizou a toxidez das ERMO quando plantas de batata (Beligni & Lamattina, 1999c) e arroz (Hung et al., 2002) foram tratadas com os herbicidas diquat e paraquat.

É considerado que o NO, por ser um radical livre altamente reativo, pode eliminar outros intermediários reativos e finalizar reações propagadas em cadeia (Beligni & Lamattina, 1999a; Leshem, 2000; Van Breusegem et al., 2001). Há também evidências de que o NO esteja envolvido no crescimento e desenvolvimento vegetal (Durner & Klessig, 1999; Wojtaszek, 2000; Beligni & Lamattina, 2001; Lamattina et al., 2003). É relatado que tal controle exercido pelo NO nas plantas possa ocorrer por todo o ciclo, iniciando-se com a germinação (Beligni & Lamattina, 2000) e concluindo-se com o florescimento, amadurecimento de seus frutos e senescência de seus órgãos (Leshem et al., 1998; Floryszak-Wieczorek et al., 2006). Além disso, Del Río et al. (2004) mencionam que o NO pode atuar em processos como organogênese radicular, movimentos estomáticos, senescência, morte celular programada, lignificação da parede celular e no metabolismo nodular.

Beligni & Lamattina (2001) mencionam diversos efeitos fisiológicos promovidos pelo NO de acordo com o órgão vegetal, em diferentes espécies. Assim, em ervilha o NO promoveu atraso da senescência e expansão foliar. Em caules de batata, o NO promoveu inibição da alongação internodal sob baixa luminosidade e também indução da destiolação em trigo e cevada. Os autores também mencionam que o NO atuou na alongação de raízes de milho e induziu a formação de raízes laterais e adventícias em pepino e lavanda.

Existem diversos indicadores bioquímicos para a detecção de estresse oxidativo nas plantas, dentre os quais, a quantificação de açúcares solúveis. Estas moléculas podem exercer sinais e respostas de defesa que são úteis para as plantas, não somente por controlar a atividade fotossintética, mas também por controlar o nível das ERMO. Conseqüentemente, os açúcares solúveis podem regular a defesa contra vários estresses produtores de ERMO, como os xenobióticos (Couée et al., 2006). Além disso, a glicose,

um açúcar solúvel redutor, é o principal precursor carbônico inicial para a síntese de carotenóides (Pallet & Young, 1993) e de ascorbato (Foyer, 1993; Smirnov et al., 2001) e para os esqueletos carbônicos dos aminoácidos, incluindo cisteína, glutamato e glicina, que são componentes da glutathione (Noctor & Foyer, 1998). Todos esses compostos estão envolvidos nas defesas contra o estresse oxidativo, por meio dos ciclos ascorbato-glutathione, na homeostase das reações de óxido-redução ou na desintoxicação de peróxidos (Couée et al., 2006). Além disso, aminoácidos específicos como histidina, metionina e triptofano podem ser oxidados pelo $O_2^{\cdot -}$ (Knox & Dodge, 1985; Van Breusegem et al., 2001).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo verificar o efeito protetor do NO em plantas de soja tratadas com o herbicida lactofen, por meio de avaliações fitométricas e bioquímicas. As avaliações fitométricas executadas foram: medidas de altura, comprimento de raiz, número de folíolos, matéria seca de lâminas foliares, caules mais pecíolos, raízes e total das plantas. Em relação aos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo, quantificaram-se os teores de açúcares solúveis totais e redutores na matéria seca dos diferentes órgãos.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi conduzido entre janeiro e março de 2006 em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, situado na Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Bauru-SP, até a realização das coletas e das medidas de altura, comprimento de raiz e contagem do número de folíolos das plantas de soja. Posteriormente, as medidas de matéria seca bem como as avaliações bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Xenobióticos, pertencente ao Departamento de Química e Bioquímica, no Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

Material vegetal

No presente experimento foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) cv. Pintado. Quinze sementes foram colocadas para germinar em vasos de 8 L

de capacidade preenchidos com substrato da marca Rendimax Floreiras[®], de seguinte composição: a) em porcentagem na matéria seca: 1,08 de N; 0,40 de P₂O₅; 0,21 de K₂O; 14,00 de umidade; 58,00 de matéria orgânica; 32,23 de C; 0,59 de Ca; 1,04 de Mg; 0,25 de S; b) em mg.kg⁻¹ de matéria seca: 240 de Na; 54 de Cu; 8150 de Fe; 88 de Mn e 112 de Zn. A relação C/N correspondeu a 29/1, enquanto que o pH (CaCl₂) foi de 4,94. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação a temperatura entre 31 - 35°C e com umidade relativa igual a 52,8%. Antes do início dos tratamentos, realizou-se um desbaste, de modo que cada vaso passou a conter dez plantas de soja.

Delineamento experimental

Os vasos foram distribuídos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial quatro x dois, isto é, quatro doses de nitroprussiato de sódio (SNP) x duas épocas de coleta, com quatro repetições, num total de 32 vasos. As doses de SNP, utilizado como doador de NO, foram equivalentes a 0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹. As épocas de coleta corresponderam aos 7 e 14 dias após a aplicação de lactofen (DAAL).

Aplicações das doses de SNP e lactofen

Os tratamentos das plantas de soja foram realizados quando estas encontravam-se no estágio fenológico V3. As plantas foram pulverizadas com as doses de SNP acima mencionadas por dois dias consecutivos, a um intervalo de 24 h. Aquelas não tratadas com SNP (0 µmol.L⁻¹) receberam aplicação de água destilada. No terceiro dia, após 24 h da última aplicação de SNP, todas as plantas receberam a aplicação de lactofen na dose recomendada para a cultura de soja, equivalente a 0,7 L.ha⁻¹. Para tais procedimentos, utilizou-se um pulverizador manual com capacidade de 250 mL, cuja vazão correspondeu a 6,3 mL.s⁻¹.

Coletas

Aos 7 e 14 dias após a aplicação de lactofen (DAAL), as plantas de soja de cada vaso dos respectivos tratamentos foram coletadas, lavadas para a remoção do substrato, e avaliadas quanto à altura, comprimento de raiz e contagem do número de folíolos. Em seguida, foram separadas em lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes, com

posterior acondicionamento em sacos de papel e mantidos em estufa com circulação forçada de ar a uma temperatura de 60°C durante sete dias. Após a quantificação da matéria seca, o material foi finamente moído e armazenado para as posteriores avaliações dos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo.

Altura de plantas, comprimento de raiz e número de folíolos

A altura das plantas de soja foi definida como a distância, expressa em centímetros, do colo até o ápice caulinar. O comprimento de raiz foi definido como a distância, expressa em centímetros, do colo até a extremidade inferior das raízes. Os resultados destes parâmetros correspondeu aos valores médios de dez plantas. Por sua vez, o número de folíolos foi definido como a somatória de todas as unidades.

Matéria seca

A matéria seca, expressa em gramas, de lâminas foliares foi definida como a somatória de todas as unidades, secas em conjunto, das dez plantas de cada vaso. O mesmo procedimento foi adotado para a quantificação da matéria seca de caules mais pecíolos e de raízes. A matéria seca total correspondeu à soma das matérias secas dos diferentes órgãos, para cada vaso.

Extração e quantificação de açúcares solúveis totais e redutores

Para a extração dos açúcares solúveis, foi utilizado 100 mg de matéria seca de cada amostra. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de água fervente, os quais foram mantidos em banho-maria a 35°C por 30 minutos. Após filtração em algodão esterilizado, o volume do extrato foi completado para 25 mL com água destilada e utilizado para a quantificação dos teores de açúcares solúveis totais e redutores (Crepaldi et al., 2001). A quantificação de açúcares solúveis totais foi feita pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956), ao passo que a quantificação dos açúcares solúveis redutores foi realizada pelo método do Somogy-Nelson (1945), com leituras de absorbância realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 490 e 500 nm, respectivamente. Em ambos os casos, utilizou-se glicose para a construção da curva de referência, e os resultados foram expressos em percentagem de açúcares solúveis totais ou redutores na matéria seca.

Avaliações visuais de injúria

Aos dois, quatro e sete DAAL, fotografaram-se vasos de modo que as repetições escolhidas foram as que visualmente melhor representaram o comportamento observado nos respectivos tratamentos. Por terem sido observadas diferenças visuais em relação às folhas trifolioladas jovens, estas também foram fotografadas, com base nos mesmos critérios utilizados anteriormente.

Análise estatística dos resultados

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SAS. Em seguida, modelos de regressão polinomial foram construídos, quando verificada interação significativa entre doses de SNP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) + lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$) x DAAL. Nas épocas de coleta onde tal interação não foi observada, somente os pontos foram plotados nos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos mostram a participação do NO em diversos processos durante o crescimento e o desenvolvimento vegetal, tais como fotomorfogênese, expansão foliar, crescimento radicular, senescência, entre outros (Noritake et al., 1996; Beligni & Lamattina, 2000; Huang et al., 2002a). Além disso, pesquisas demonstram a ação protetora do NO em plantas submetidas a tratamento com herbicidas, em virtude da sua capacidade de neutralizar a toxidez das ERMO geradas nessas condições. Tal fato foi observado em plantas de batata e arroz tratadas com os herbicidas diquat e paraquat (Beligni & Lamattina, 1999c, Hung et al., 2002).

No presente estudo, observou-se interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL em relação à altura, comprimento de raiz e número de folíolos das plantas de soja (Tabela 1).

Tabela 1. Análise de variância referente à altura, comprimento de raiz e número de folíolos de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP, seguido de lactofen (X), em duas épocas de coleta (Y).

variáveis	interação	F	Pr > F	CV%
altura	X*Y	30,11	<0,0001*	7,85
comprimento de raiz	X*Y	3,88	0,0058*	7,46
número de folhas	X*Y	7,91	<0,0001*	16,31

*Significativo a 5% de probabilidade.

No presente estudo, não foi observado efeito do pré-tratamento com SNP sobre a altura das plantas de soja tratadas com lactofen (Figura 1). Foi detectado que as plantas de todos os tratamentos apresentaram aumento dessa variável aos 14 DAAL. Similarmente, Barros et al. (2000) verificaram que a aplicação de lactofen na dose de 150 g.ha⁻¹, praticamente equivalente à utilizada no presente trabalho, não causou redução da altura de plantas de soja cv. Conquista. Entretanto, Damião Filho et al. (1992) relatam que o lactofen pode promover redução na altura em plantas de soja.

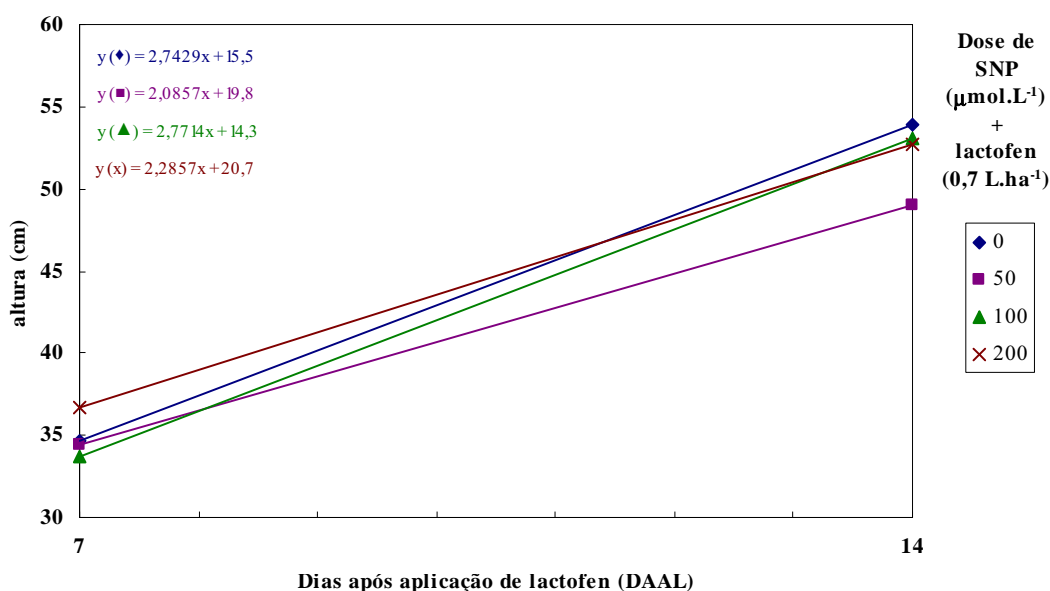


Figura 1. Altura (cm) de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), aos 7 e 14 DAAL. Médias de quatro repetições. DAAL: dias após aplicação de lactofen.

Considerando o intervalo de avaliação entre 7 e 14 DAAL, observou-se maior crescimento radicular das plantas que não receberam pré-tratamento com SNP (Figura 2). Aumentos menos pronunciados foram verificados nas plantas pré-tratadas com 50 e 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP, enquanto que naquelas pré-tratadas com a maior dose (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) não houve aumento desta variável. Tais resultados permitem sugerir que o NO causa retardamento do crescimento do sistema radicular das plantas de soja, de maneira dependente da dose de SNP utilizada em pré-tratamento.

É válido ressaltar que os herbicidas inibidores da Protox, como o lactofen, são não sistêmicos. Como consequência, a necrose nas plantas por eles promovida é observada somente nas áreas que receberam o herbicida (Merotto Junior & Vidal, 2001). Tais informações justificam o fato de no presente estudo o lactofen não ter sido prejudicial ao crescimento radicular das plantas de soja.

Entretanto, esperava-se maior crescimento radicular como efeito da aplicação de SNP, pois na literatura constata-se que o NO está envolvido na indução do alongamento celular de maneira similar à auxina, sugerindo sua mediação na resposta à auxina nesse processo (Gouvêa et al., 1997). Similarmente, Pagnussat et al. (2002) relatam que o NO é necessário para a formação radicular em pepino, de modo que um aumento temporário na concentração de NO está envolvido no desenvolvimento de raízes adventícias induzido pelo ácido indol acético.

Outras pesquisas também mencionam a importância do NO para o crescimento radicular. Desta forma, Hu et al. (2005) descreveram a participação do NO na curvatura gravitrópica em raízes de soja, de modo que houve um acúmulo de NO na raiz primária em resposta a estímulos gravitacionais. Kopyra & Gwózdź (2003) constataram que o NO diminuiu a influência negativa promovida pela presença dos metais pesados chumbo e ferro, da salinidade, do etileno e do herbicida paraquat no crescimento radicular em *Lupinus luteus*.

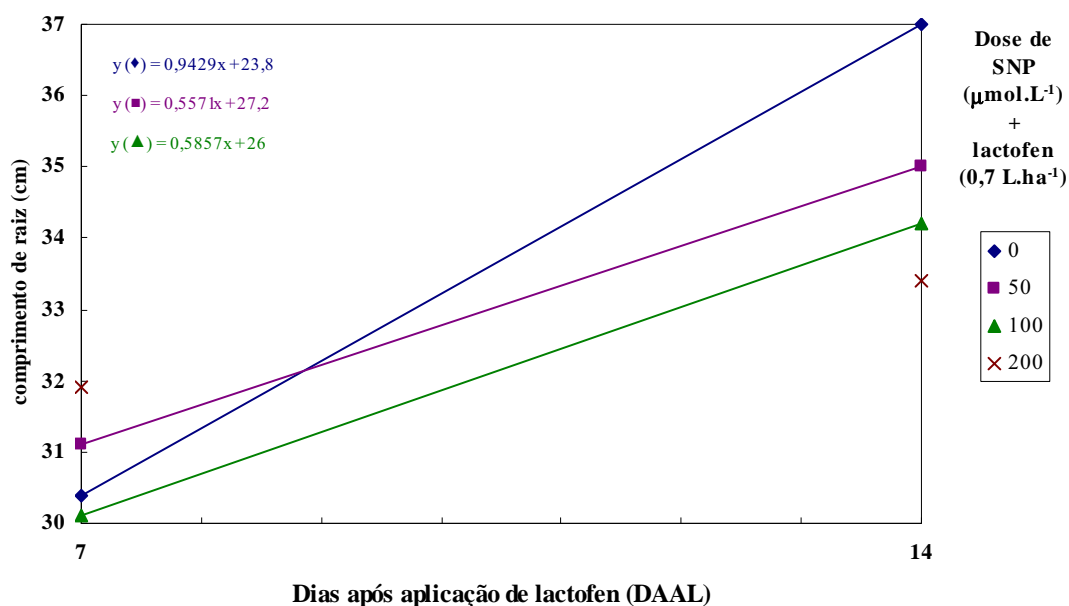


Figura 2. Comprimento de raiz (cm) de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha^{-1}), aos 7 e 14 DAAL. No pré-tratamento com 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. DAAL: dias após aplicação de lactofen.

Pode ser verificado na Figura 3 que as plantas pré-tratadas com SNP apresentaram maior número de folíolos nos períodos avaliados, principalmente aos 7 DAAL. Deste modo, fica evidenciado que o NO amenizou a abscisão foliar promovida pelo lactofen.

Este herbicida pode causar na cultura da soja enrugamento dos folíolos em desenvolvimento (Damião Filho et al., 1992). Roman (2000) afirma que os difenil-éteres promovem nessa cultura, em poucas horas após a aplicação, enrugamento e manchas nas folhas, que podem culminar em necrose dos tecidos e queima da folhagem. Além disso, condições de elevada umidade no solo, temperatura e umidade relativa do ar fazem com que a cutícula foliar torne-se fina, possibilitando maior absorção do herbicida pelas plantas, causando maiores efeitos fitotóxicos tanto na cultura, quanto nas plantas daninhas.

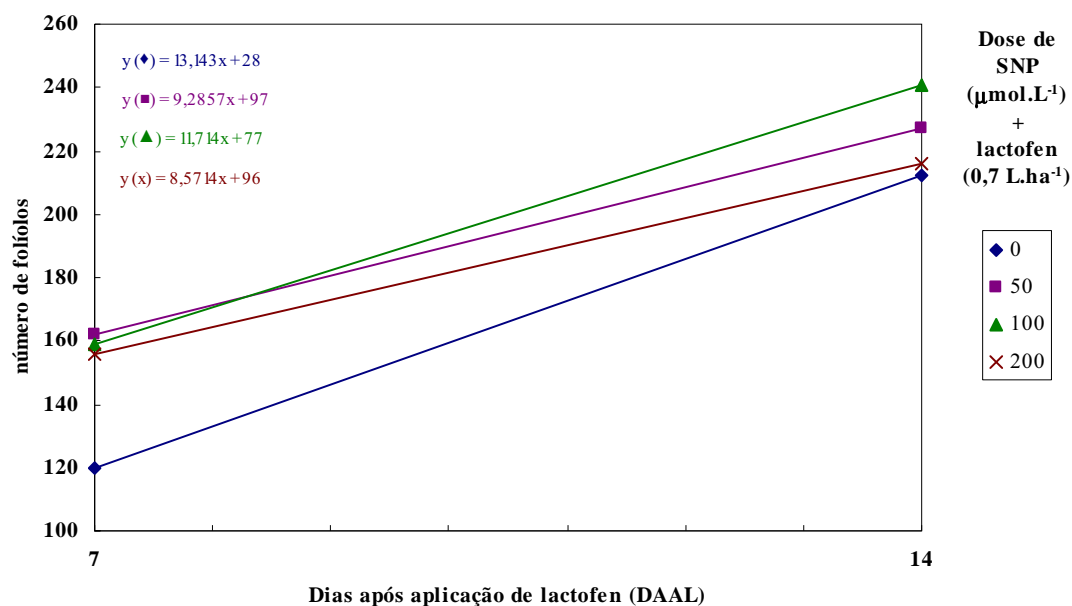


Figura 3. Número de folíolos de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), aos 7 e 14 DAAL. Médias de quatro repetições. DAAL: dias após aplicação de lactofen.

No presente estudo, pôde-se visualizar que o lactofen causou alteração nas folhas trifolioladas jovens de soja, que apresentaram aspecto enrugado e coloração escura, observado aos dois, quatro e sete DAAL (Figura 4). Tais injúrias foram reduzidas gradativamente conforme se aumentou a dose de SNP aplicada em pré-tratamento. Porém, observando o aspecto geral das plantas, não foram detectadas diferenças visuais de fitotoxicidade (Figura 5).

Assim, pode-se sugerir que o NO teve efeito protetor contra a injúria promovida nas folhas pela aplicação do herbicida lactofen. Similarmente, Beligni & Lamattina (1999c) observaram que o pré-tratamento de plantas de batata com 100 µmol.L⁻¹ de SNP protegeu-as contra clorose, necrose e desfolha produzidas pela aplicação do herbicida diquat.

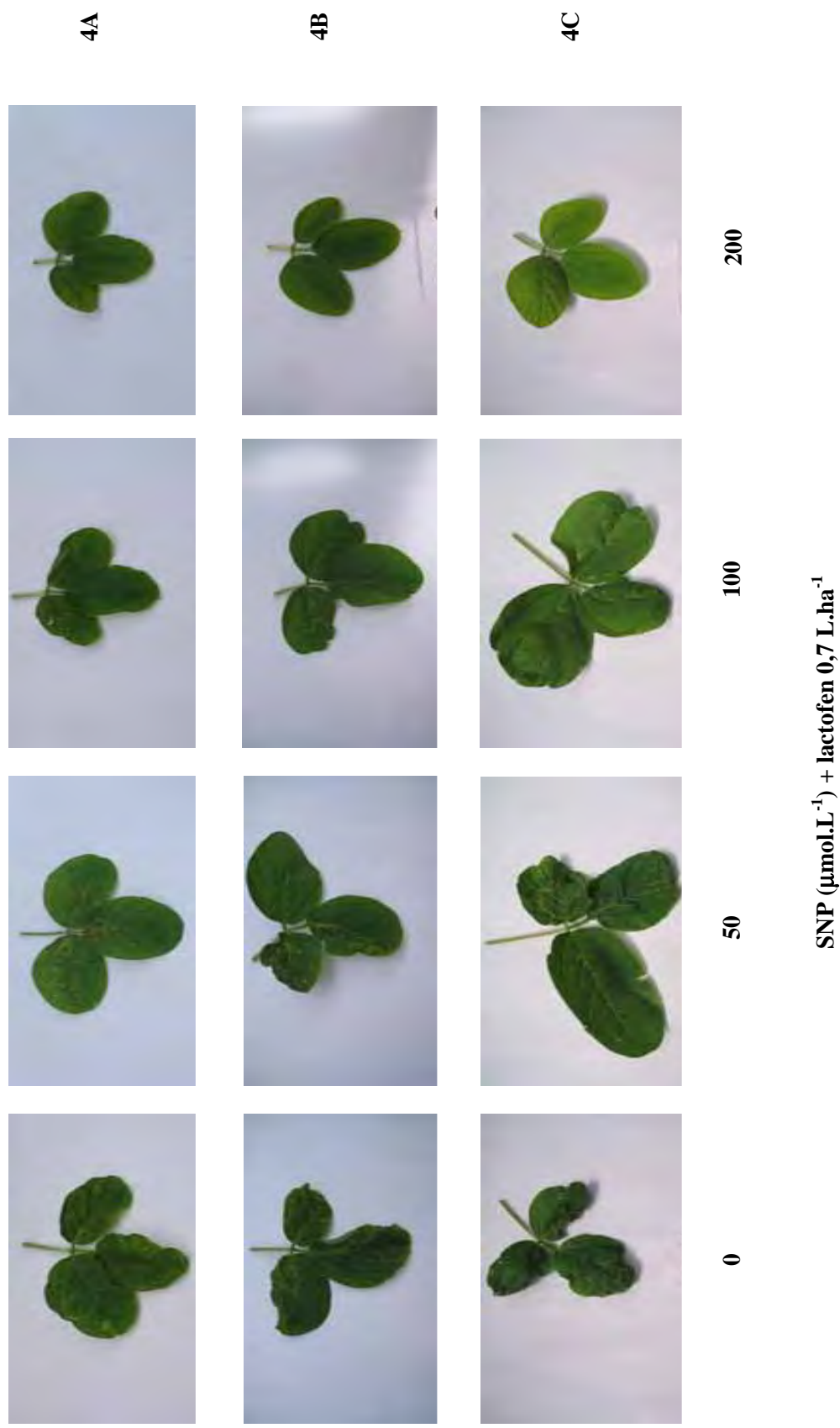


Figura 4. Aspecto geral das folhas trifolioladas jovens de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP ($0, 50, 100$ e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), aos dois (4A), quatro (4B) e sete (4C) dias após aplicação de lactofen (DAAL).



SNP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) + lactofen 0,7 L.ha⁻¹

Figura 5. Aspecto geral das plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), aos dois (5A), quatro (5B) e sete (5C) dias após aplicação de lactofen (DAAL).

A interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL foi observada em relação aos teores de açúcares solúveis totais nas lâminas foliares e nos caules mais pecíolos, e em todos os órgãos avaliados considerando-se os teores de açúcares solúveis redutores (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância referente aos teores de açúcares solúveis totais e redutores de lâminas foliares, caules mais pecíolos e raízes em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP, seguido de lactofen (X), em duas épocas de coleta (Y).

variáveis	interação	F	Pr > F	CV%
açúcares solúveis totais				
lâminas foliares	X*Y	8,03	<0,0001*	20,05
caules mais pecíolos	X*Y	4,50	0,0025*	20,00
raízes	X*Y	3,03	0,4306 ^{NS}	20,05
açúcares solúveis redutores				
lâminas foliares	X*Y	10,64	<0,0001*	18,38
caules mais pecíolos	X*Y	55,49	<0,0001*	23,69
raízes	X*Y	8,35	<0,0001*	21,50

*Significativo a 5% de probabilidade. NS: não significativo.

Nas lâminas foliares ocorreu redução dos teores de açúcares solúveis totais entre 7 e 14 DAAL nas plantas tratadas somente com lactofen e naquelas pré-tratadas com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP (Figura 6A). Quando se aplicou em pré-tratamento as maiores doses de SNP (100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), não houve alteração desta variável entre os dois períodos de avaliação. Nos caules mais pecíolos (Figura 6B), a redução desses teores entre os 7 e 14 DAAL foi observada somente nas plantas que não foram pré-tratadas com SNP. Entretanto, os teores de açúcares solúveis totais foram menores nas plantas na presença do doador de NO aos 7 DAAL e não sofreram alterações entre as duas coletas.

É válido ressaltar que, aos 14 DAAL, as plantas que foram tratadas somente com lactofen apresentaram os menores teores de açúcares solúveis totais, tanto nas lâminas foliares, quanto nos caules mais pecíolos. De maneira oposta, tais plantas apresentaram os maiores teores desta variável nas raízes, no mesmo período mencionado (Figura 6C).

Assim, embora a redução dos teores de açúcares solúveis totais tenha sido bastante pronunciada nas plantas que não foram pré-tratadas com SNP, pode-se constatar que, na presença de NO, baixos teores foram mantidos aos 7 e 14 DAAL.

Houve similaridade de comportamento entre os teores de açúcares solúveis totais e redutores, tanto nas lâminas foliares, como nos caules mais pecíolos. Assim, redução dos teores de açúcares solúveis redutores foi observada nas plantas que não foram pré-tratadas com SNP (Figuras 7A e 7B) e naquelas pré-tratadas com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 7A). Nas raízes (Figura 7C), observou-se como efeito isolado redução dos teores de açúcares solúveis redutores nas plantas pré-tratadas com 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP.

Torna-se relevante mencionar que, de maneira geral, maiores teores de açúcares solúveis redutores foram observados nas plantas que não receberam pré-tratamento com SNP, nas lâminas foliares, em caules mais pecíolos e em raízes. Tais resultados permitem constatar que, na presença de NO, baixos teores de açúcares solúveis redutores foram mantidos, assim como observado em relação aos teores de açúcares solúveis totais.

Os açúcares solúveis parecem assumir um papel dúbio em relação às ERMO. Primeiramente, podem estar relacionados às vias metabólicas de produção dessas espécies tóxicas. Por outro lado, podem alimentar as vias metabólicas de produção de NADPH, tais como a via oxidativa das pentoses-fosfato, que podem contribuir para a eliminação das ERMO (Couée et al., 2006). Porém, pesquisas mencionam que diferentes situações de estresse que causam, direta ou indiretamente, acúmulo de ERMO, tais como ataque de patógenos, seca, estresse salino, estresse hídrico, tratamento com ácido abscísico, baixas temperaturas ou excesso de excitação energética, são também associadas ao acúmulo de açúcares solúveis, o que geralmente tem sido considerado como uma resposta adaptativa das plantas à estas condições (Roitsch, 1999; Taji et al., 2002; Bartels & Sunkar, 2005; Seki et al., 2007).

Além disso, como o NO pode eliminar ERMO produzidas em situações adversas, bem como finalizar reações propagadas em cadeia (Beligni & Lamattina, 1999a; Leshem, 2000; Van Breusegem et al., 2001), no presente estudo os baixos teores de açúcares solúveis observados em função do pré-tratamento com SNP indica que o NO teve efeito protetor nas plantas de soja pela eliminação das ERMO geradas pelo lactofen.

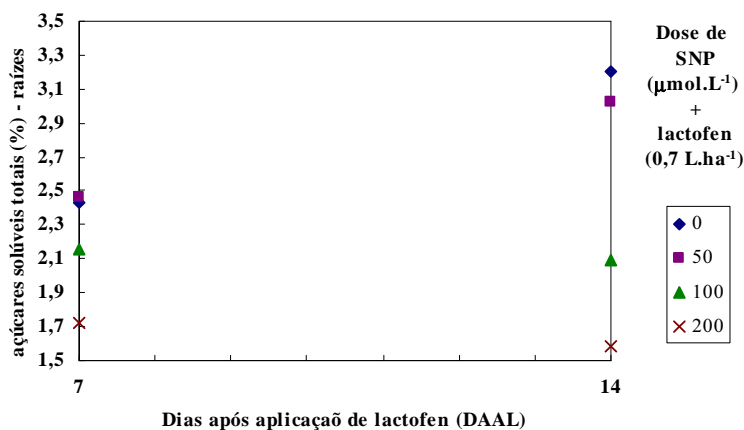
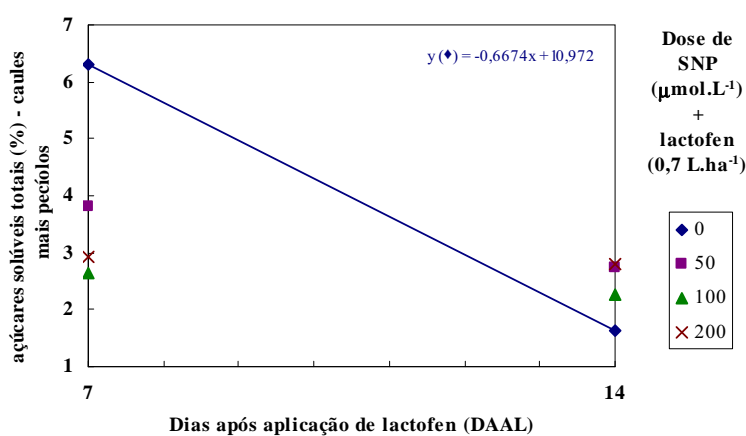
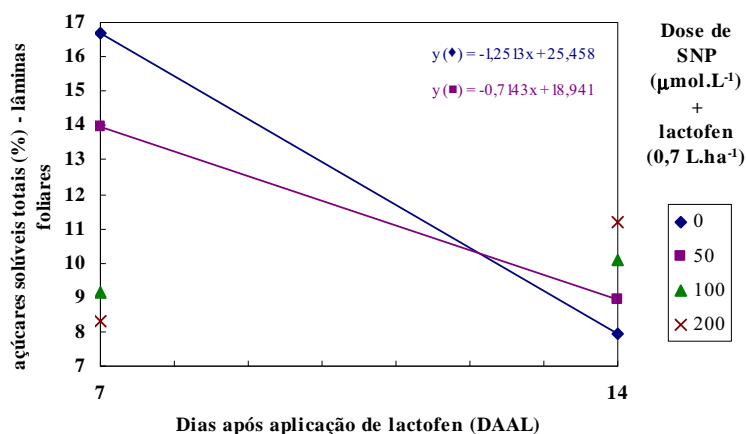


Figura 6. Teores de açúcares solúveis totais (%) de lâminas foliares (6A), caules mais pecíolos (6B) e raízes (6C) de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), aos 7 e 14 DAAL. Na ausência de SNP (Figura 6C) e no pré-tratamento com 50 (Figuras 6B e 6C), 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP (Figuras 6A, 6B e 6C), não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. DAAL: dias após aplicação de lactofen.

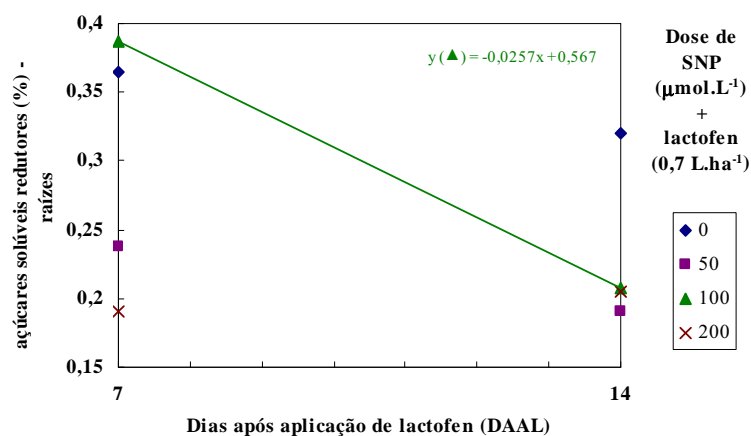
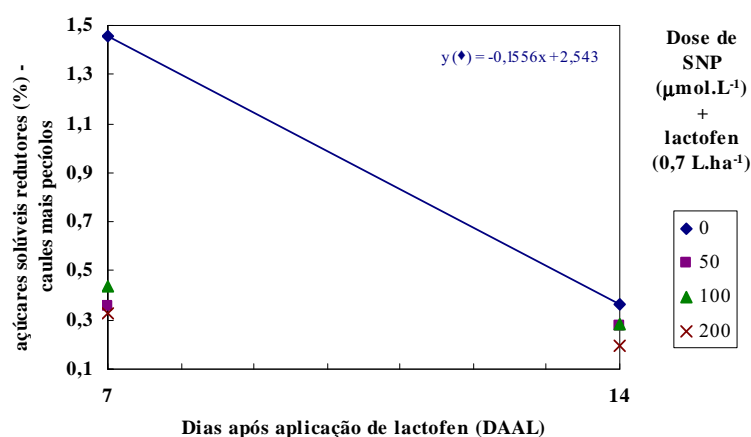
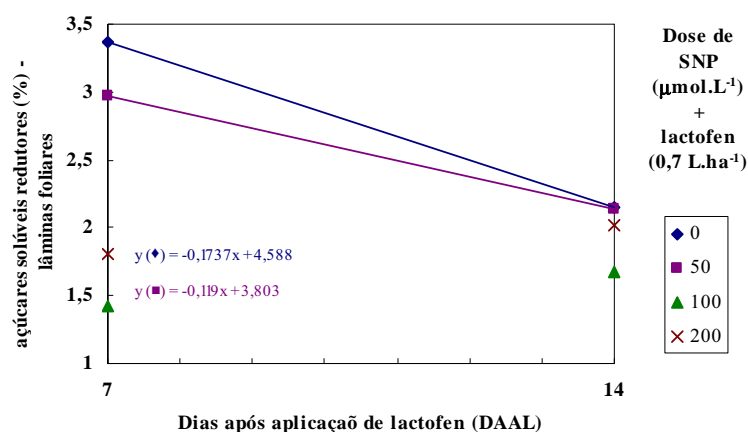


Figura 7. Teores de açúcares solúveis redutores (%) de lâminas foliares (7A), caules mais pecíolos (7B) e raízes (7C) de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), aos 7 e 14 DAAL. Na ausência de SNP (Figura 7C) e no pré-tratamento com 50 (Figuras 7B e 7C), 100 (Figuras 7A e 7B), e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP (Figuras 7A, 7B e 7C), não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. DAAL: dias após aplicação de lactofen.

A interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL foi observada em relação à matéria seca de lâminas foliares, caules mais pecíolos, raízes e matéria seca total das plantas de soja (Tabela 3).

Tabela 3. Análise de variância referente à matéria seca de lâminas foliares, caules mais pecíolos, raízes e matéria seca total em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP, seguido de lactofen (X), em duas épocas de coleta (Y).

variável	interação	F	Pr > F	CV%
matéria seca				
lâminas foliares	X*Y	9,15	<0,0001*	15,33
caules mais pecíolos	X*Y	23,76	<0,0001*	14,10
raízes	X*Y	11,59	<0,0001*	16,48
total	X*Y	15,91	<0,0001*	14,36

*Significativo a 5% de probabilidade.

De maneira geral, aos 7 DAAL maiores valores de matéria seca foram observados nas plantas pré-tratadas com SNP (Figura 8). Porém, tais plantas apresentaram a menor matéria seca total e dos diferentes órgãos aos 14 DAAL. Tais resultados permitem novamente sugerir que o NO promoveu crescimento mais lento das plantas de soja, assim como verificado em relação ao comprimento radicular.

Roman (2000) afirma que os herbicidas difenil-éteres promovem poucas horas após a aplicação na cultura da soja paralisação temporária do crescimento devido a injúrias, como enrugamento e manchas nas folhas, que podem culminar com a necrose dos tecidos e queima da folhagem. Porém, as plantas geralmente retomam o crescimento dentro de três a quatro semanas. Similarmente, Ross & Lembi (1999) mencionam que, embora a sintomatologia em espécies tolerantes ao lactofen seja caracterizada pelo bronzeamento ou clorose, com evolução para necrose em locais das folhas atingidas pela aplicação, ocorre posterior recuperação das plantas.

Tal fato também foi constatado no presente estudo, onde as plantas tratadas somente com lactofen apresentaram maior comprimento radicular, número de folíolos e matéria seca total e dos diferentes órgãos entre 7 e 14 DAAL. A recuperação das plantas de soja na presença do herbicida também foi evidenciada pela redução dos teores de açúcares solúveis totais e redutores nas lâminas foliares e nos caules mais pecíolos entre

7 e 14 DAAL, o que indica menor grau de estresse nessas plantas no período final da avaliação.

Pode ser constatado que o pré-tratamento com SNP foi benéfico para as plantas de soja. Tal afirmativa se evidencia pelo fato de o NO ter reduzido os sintomas visuais de injúria causados pelo lactofen nos folíolos jovens pela eliminação das ERMO, evidenciado pela manutenção de baixos teores de açúcares solúveis totais e redutores proporcionados pelo NO.

Diante dos resultados de todos os aspectos fitométricos avaliados, pôde-se observar que o NO proporcionou crescimento mais lento das plantas de soja. Este fato, associado à recuperação das plantas após a aplicação de lactofen, sugere posteriores estudos que busquem uma maior elucidação dos mecanismos pelos quais o NO pode atuar na sinalização do estresse promovido pelo lactofen na cultura da soja.

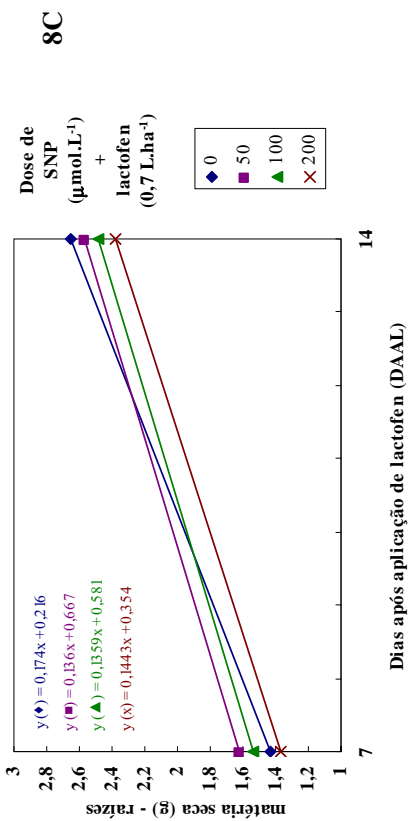
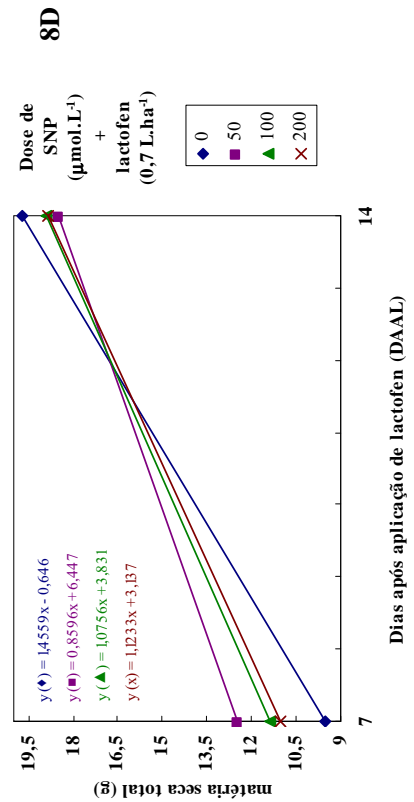
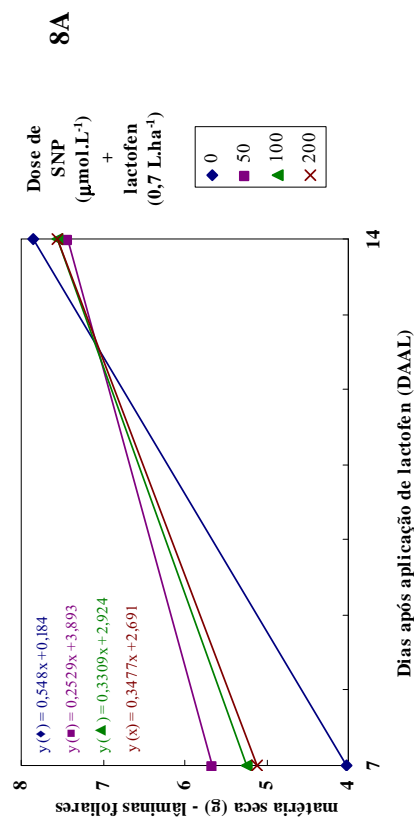
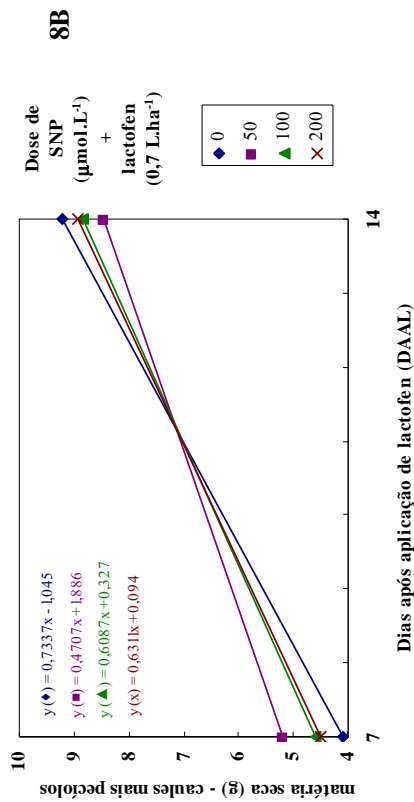


Figura 8. Matéria seca (g) de lâminas foliares (8A), caules mais pecíolos (8B), raízes (8C) e matéria seca total (8D) de plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), aos 7 e 14 DAAL. Médias de quatro repetições. DAAL: dias após aplicação de lactofen.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, A.C., UEDA, A., SCHUMM, K.C. Eficiência e seletividade do lactofen em mistura com outros latifolicidas, no controle de plantas daninhas na cultura da soja. **Rev. Bras. Herb.**, v.1, p.79-84, 2000.

BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.24, p.23-58, 2005.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? **Trends Plant Sci.**, v.4, p.299-300, 1999a.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-44, 1999b.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-78, 2001.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v.3, p.199-208, 1999c.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-21, 2000.

COUÉE, I., SULMON, C., GOUESBET, G., EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.449-59, 2006.

CREPALDI, I.C., ALMEIDA-MURADIAN, L.B., RIOS, M.D.G., PENTEADO, M.V.C., SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Rev. Bras. Bot.**, v.24, p.155-159, 2001.

DAMIÃO FILHO, C.E., CORSO, G.M., ANDRADE, V.M.M. Efeitos do herbicida lactofen sobre três cultivares de soja. I. Alterações morfológicas externas e internas das folhas. **Planta Daninha**, v.10, p.17-24, 1992.

DEL RÍO, L.A., CORPAS, F.J., BARROSO, J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, v.65, p.783-92, 2004.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REDERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-6, 1956.

DURNER, J., KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.369-74, 1999.

FLORYSZAK-WIECZOREK, J., MILCZAREK, G., ARASIMOWICZ, M., CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v.224, p.1363-72, 2006.

FOYER, C. Ascorbic acid. In: ALSCHER, R.G., HESS, J.L. (Eds). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 31-58.

GOUVÊA, C.M.C.P., SOUZA, J.F., MAGALHÃES, C.A.N., MARTINS, I.S. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. **Plant Growth Regul.**, v.21, p.183-7, 1997.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochem. J.**, v.219, p.1-14, 1984.

HU, X., NEILL, S., TANG, Z., CAI, W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. **Plant Physiol.**, v.137, p.663-70, 2005.

HUANG, X., KIEFER, E., VON RAD, U., ERNST, D., FOISSNER, I., DURNER, J. Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.625-31, 2002a.

HUNG, K.T., CHANG, C.J., KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-66, 2002.

KNOX, J.P., DODGE, A.D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v.24, p.889-96, 1985.

KOPYRA, M., GWÓZDZ, F.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-7, 2003.

LAMATTINA, L., GARCIA-MATA, C., GRAZIANO, M., PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.54, p.109-36, 2003.

LESHEM, Y.Y. **Nitric oxide in Plants. Occurrence, Function and Use**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 154p.

LESHEM, Y.Y., WILLS, R.B.H., KU, V.V.V. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.825-33, 1998.

MATRINGE, M., CAMADRO, J.M., LABBE, P., SCALLA, R. Protoporphyrinogen oxidase as a molecule target for diphenyl ether herbicides. **Biochem. J.**, v.260, p.231, 1989.

MEROTTO JUNIOR, A., VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R.A., MEROTTO JUNIOR, A. (Eds). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p.69-86.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.**, v.9, p.490-8, 2004.

NOCTOR, G., FOYER, C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen species under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.49, p.249-79, 1998.

NORITAKE, T., KAWAKITA, K., DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant Cell Physiol.**, v.37, p.113-6, 1996.

PAGNUSSAT, G.C., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiol.**, v.129, p.954-6, 2002.

PALLET, K.E., YOUNG, A.J. Carotenoids. In: ALSCHER, R.G., HESS, J.L. (Eds). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.91-110.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F.L.S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.198-206, 1999.

ROMAN, E.S. Estresses ocasionados por fitotoxicidade de herbicidas. In: BONATO, E.R. (Ed). **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. p.103-43.

ROSS, M.A., LEMBI, C.A. **Applied weed science**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 452p.

RYTER, S.W., TYRREL, R.M. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Rad. Biol. Med.**, v.24, p.1520-34, 1998.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v.101, p.7-12, 1993.

SEKI, M., UMEZAWA, T., URANO, K., SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.10, p.296-302, 2007.

SMIRNOFF, N., CONKLIN, P.L., LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.52, p.437-67, 2001.

SOMOBY-NELSON, M. A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v.160, p.61-3, 1945.

TAJI, T., OHSUMI, C., IUCHI, S., SEKI, M., KASUGA, M., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v.29, p.417-26, 2002.

VAN BREUSEGEM; F., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci.**, v.161, p.405-14, 2001.

WATANABE, K., OHORI, Y., SATO, Y., BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K. Changes in fatty acid composition of neutral lipid in mung bean cotyledons by oxyfluorfen-induced peroxidation. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.69, p.166-73, 2001.

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

CAPÍTULO III

ÓXIDO NÍTRICO MINIMIZA O ESTRESSE OXIDATIVO GERADO PELO LACTOFEN EM PLANTAS DE SOJA

RESUMO - O lactofen é um herbicida utilizado na cultura da soja para o controle de plantas daninhas de folhas largas que, apresentando ação na inibição da protoporfirinogênio oxidase (Protox), acarreta diminuição da atividade das enzimas da rota de síntese de clorofilas e citocromos, bem como o surgimento de gotas lipídicas nos cloroplastos provenientes da peroxidação de lipídios das membranas. Devido a estas alterações, pode ocorrer uma excessiva produção de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), além de diminuição dos teores de pigmentos fotossintéticos. Como consequência, podem ocorrer manchas, enrugamento e queima das folhas, o que leva à paralisação temporária do crescimento da cultura. Em contrapartida, o óxido nítrico (NO) é uma molécula capaz de eliminar diretamente as ERMO e assim finalizar reações propagadas em cadeia, atuando como um antioxidante. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o pré-tratamento de plantas de soja com solução de nitroprussiato de sódio (SNP), substância doadora de NO, promove proteção contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen. Assim, plantas de soja no estágio fenológico V3, após pré-tratamento com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) por dois dias consecutivos, foram pulverizadas com lactofen na dose recomendada para esta cultura, equivalente a 0,7 L.ha⁻¹. Em seguida, folíolos foram coletados às 24, 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação de lactofen (HAAL) para a quantificação dos teores de lipoperóxidos, clorofilas totais e suas frações “a” e “b” e carotenóides totais, bem como para a determinação da atividade das enzimas antioxidantes glutatona S-transferase (GST), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD). Apesar da peroxidação lipídica não ter sido totalmente interrompida, o NO apresentou capacidade de eliminação das ERMO geradas pela ação do herbicida lactofen, impedindo a degradação de pigmentos fotossintéticos. Conseqüentemente, a eliminação das ERMO pelo NO acarretou tanto diminuição de substrato disponível para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD, essenciais na proteção das plantas em situações indutoras de estresse oxidativo, como ausência de indução da GST pelo H₂O₂.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes, estresse oxidativo, *Glycine max* L. Merrill, lactofen, lipoperóxidos, óxido nítrico, pigmentos fotossintéticos.

ABSTRACT - Lactofen is an herbicide applied in soybean fields to control broadleaf weeds due to inhibition of protoporphyrinogen oxidase (Protox) action, which leads to a decrease in chlorophyll and cytochrome biosynthetic pathway enzyme activity, besides the appearance of lipid drops in chloroplasts from membrane lipid peroxidation. These alterations can cause an excessive production of reactive oxygen species (ROS) and decrease of photosynthetic pigment levels. Consequently, spots, wrinkles and leaf burn can occur, which results in transitory cessation of crop growth. However, nitric oxide (NO) is a molecule able to scavenge ROS directly and to end chain reactions, thus acting as an antioxidant. So, the present research aimed to evaluate if the pre-treatment of soybean plants with sodium nitroprusside (SNP) solution, a NO donor substance, promotes protection against oxidative stress generated by lactofen. Thus, soybean plants at V3 phenologic stage were pre-treated with different SNP levels (0, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) for two consecutive days and on third day they were sprayed with lactofen at recommended rate for this crop, equivalent to 0.7 L.ha^{-1} . Afterwards, leaflets were harvested at 24, 48, 72, 96 e 120 h after application of lactofen (HAAL) in order to quantify the levels of lipoperoxides, total chlorophylls and their “a” and “b” fractions, total carotenoids, as well as the activity assay of glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and peroxidase (POD) antioxidant enzymes. Although lipid peroxidation was not completely prevented, NO was able to scavenge ERMO generated by lactofen herbicide action and avoided photosynthetic pigment breakdown. Consequently, ERMO scavenging by NO leads to a decrease in the available substrate for antioxidant enzymes SOD, CAT and POD, which are essential in protecting plants under oxidative stress situations, as well as the absence of GST induction by H_2O_2 .

Key-words: Antioxidant enzymes, *Glycine max* L. Merrill, lactofen, lipoperoxides, nitric oxide, oxidative stress, photosynthetic pigments.

INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de estresses abióticos incluindo seca, salinidade, radiação ultravioleta, poluentes atmosféricos e metais pesados causam danos moleculares às plantas, direta ou indiretamente pela formação de espécies reativas do metabolismo do oxigênio – ERMO (Laspina et al., 2005).

O estresse oxidativo em sistemas biológicos, incluindo os vegetais, é resultante de uma superprodução das ERMO, tais como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (1O_2). Estas ERMO são capazes de alterar quimicamente as principais classes de biomoléculas, causando mudanças estruturais e funcionais em lipídios, proteínas, clorofilas e ácidos nucleicos (Scandalios, 1993; Smirnov, 1993; Thérond et al., 2000). Dentre estas alterações podem-se destacar quebra das clorofilas, fragmentação do DNA, extravasamento iônico, peroxidação de lipídios e, finalmente, morte celular (Dodge, 1994).

Alguns herbicidas também produzem estresse oxidativo. Desta forma, o lactofen [1'-(carboetoxi)etil 5-(2-cloro-4-(trifluoro-metil)fenoxi)-2-nitrobenzoato], herbicida do grupo químico dos difenil-éteres, atua na inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox) (Vidal, 1997; Rodrigues & Almeida, 1998). Como consequência, ocorre quebra de ligações eletrolíticas, diminuição da produção de ascorbato e glutatona, bem como da atividade das enzimas da rota de síntese de clorofila (Merotto Junior & Vidal, 2001). Paralelamente a esses processos, ocorre o surgimento de gotas lipídicas nos cloroplastos provenientes da peroxidação de lipídios das membranas (Devine et al., 1993). Devido a estas alterações moleculares, a evolução dos efeitos tem como consequência uma excessiva produção de ERMO, além de diminuição dos teores de clorofila e carotenóides (Merotto Junior & Vidal, 2001).

As plantas, porém, apresentam um sistema de defesa antioxidante, responsável pela eliminação das ERMO, que confere proteção contra o estresse oxidativo. Tal sistema é composto por enzimas como por exemplo peroxidases (POD), glutatona S-transferases (GST), glutatona redutase (GR), superóxido dismutases (SOD) e catalase (CAT), além de compostos não-enzimáticos, como glutatona (GSH), carotenóides, ascorbato, α – tocoferol e flavonóides, entre outros (Foyer et al., 1994a; Laspina et al., 2005).

As glutationa S-transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) são consideradas como enzimas de desintoxicação, por metabolizarem uma ampla variedade de compostos exógenos tóxicos, denominados “xenobióticos”. Assim, a GST promove a conjugação de tais compostos ao tripeptídeo glutationa (GSH, γ -glutamil-cisteinil-glicina), produzindo conjugados solúveis em água destes compostos, com toxicidade reduzida (Jepson et al., 1994; Marrs, 1996).

As superóxido dismutases (SODs, EC 1.15.1.1) são enzimas que catalisam a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular (O_2) (Chi Yu et al., 2005). São ubíquas nos organismos aeróbicos e divididas em três classes, as Cu/Zn-SODs, encontradas no citosol e nos cloroplastos, as Fe-SODs, nos cloroplastos, e as Mn-SODs, na matriz mitocondrial (Tsang et al., 1991).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6) é considerada juntamente com as SODs como as mais eficientes enzimas antioxidantes. Ambas as enzimas apresentam uma função combinada, de modo que a CAT converte o H_2O_2 , originado em função da atividade da SOD, em H_2O e O_2 (Scandalios, 1993).

As peroxidases (POD, EC 1.11.1.7) possuem uma variedade de isoformas, que usam diferentes redutores e estão localizadas em diferentes compartimentos celulares (Campa, 1991). Estas enzimas, além de desempenharem importante papel na biossíntese da parede celular, catalisam a reação entre um agente redutor e o H_2O_2 , para produzir um composto oxidado e água (IUBMB, 2007).

O óxido nítrico (NO) é uma molécula altamente reativa e o fato de ser um radical livre permite-lhe eliminar outros intermediários reativos e assim finalizar reações propagadas em cadeia (Kopyra & Gwózdź, 2003). Seu efeito protetor em combater o estresse oxidativo pode se dar ou por atuar como um antioxidante, eliminando diretamente as ERMO (Radi et al., 1991; Laspina et al., 2005), ou por atuar como uma molécula sinalizadora, numa cascata de eventos, levando a mudanças de expressão gênica (Lamattina et al., 2003; Laspina et al., 2005). Enquanto que alguns autores consideram o NO como um agente indutor de estresse (Leshem, 1996), outros mencionam seu papel protetor contra o estresse oxidativo (Beligni & Lamattina, 1999a, b; Hsu & Kao, 2004), dependendo de sua concentração, tecido vegetal, idade da planta e tipo de estresse.

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do NO sobre a atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD, CAT e POD, bem como nos teores de

indicadores de estresse oxidativo, tais como lipoperóxidos, clorofila “a”, clorofila “b”, clorofilas totais e carotenóides totais, em plantas de soja tratadas com lactofen.

MATERIAL E MÉTODOS

Local

O experimento foi conduzido entre janeiro e fevereiro de 2005 em casa de vegetação pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas, situado na Faculdade de Ciências da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Câmpus de Bauru-SP, até a realização das coletas das plantas de soja. Posteriormente, as avaliações bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Xenobióticos, pertencente ao Departamento de Química e Bioquímica, no Instituto de Biociências da UNESP, Câmpus de Botucatu-SP.

Material vegetal

No presente experimento foram utilizadas sementes de soja (*Glycine max* L. Merrill) cv. Pintado. Doze sementes foram colocadas para germinar em vasos de 8 L de capacidade preenchidos com substrato da marca Rendimax Floreiras[®], de seguinte composição: a) em porcentagem na matéria seca: 1,08 de N; 0,40 de P₂O₅; 0,21 de K₂O; 14,00 de umidade; 58,00 de matéria orgânica; 32,23 de C; 0,59 de Ca; 1,04 de Mg; 0,25 de S; b) em mg.kg⁻¹ de matéria seca: 240 de Na; 54 de Cu; 8150 de Fe; 88 de Mn e 112 de Zn. A relação C/N correspondeu a 29/1, enquanto que o pH (CaCl₂) foi de 4,94. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação a temperatura entre 31 - 35°C e com umidade relativa igual a 52,8%.

Delineamento experimental

Os vasos foram distribuídos inteiramente ao acaso, em esquema fatorial quatro x cinco, isto é, quatro doses de nitroprussiato de sódio (SNP) x cinco épocas de coleta, com quatro repetições, num total de 80 vasos. As doses de SNP, utilizado como doador de NO, foram equivalentes a 0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹. As épocas de coleta corresponderam às 24, 48, 72, 96 e 120 h após a aplicação de lactofen (HAAL).

Aplicações das doses de SNP e lactofen

Os tratamentos das plantas de soja foram realizados quando estas encontravam-se no estágio fenológico V3. As plantas foram pulverizadas com as doses de SNP acima mencionadas por dois dias consecutivos, a um intervalo de 24 h. Aquelas não tratadas com SNP ($0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) receberam aplicação de água destilada. No terceiro dia, após 24 h da última aplicação de SNP, todas as plantas receberam a aplicação de lactofen na dose recomendada para a cultura de soja, equivalente a $0,7 \text{ L.ha}^{-1}$. Para tais procedimentos, utilizou-se um pulverizador manual com capacidade de 250 mL, cuja vazão correspondeu a $6,3 \text{ mL.s}^{-1}$.

Coletas

Padronizou-se como amostragem os folíolos laterais adultos das folhas trifolioladas. Cada amostra coletada correspondeu a duas lâminas foliares, de cujo par se registrou a matéria fresca. Em seguida, as amostras foram embaladas em sacos plásticos e em papel alumínio, sendo posteriormente congeladas em gelo seco e armazenadas em *freezer* a -80°C para as posteriores avaliações bioquímicas.

Quantificação dos teores de lipoperóxidos

A peroxidação de lipídios foi determinada de acordo com a técnica descrita por Heath & Packer (1968), citados por Rama Devi & Prasad (1998). As amostras foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido ticloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria a 90°C por 1h. Após resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorvância em espectrofotômetro UV-visível a 560 e 600 nm. Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). g^{-1} de matéria fresca.

Quantificação dos teores de pigmentos fotossintéticos

Os pigmentos fotossintéticos foram extraídos com acetona 80% (Arnon, 1949). O extrato cetônico foi utilizado para as leituras de absorvância a 647, 663 e 470 nm. Os teores de clorofila “a”, clorofila “b”, clorofilas totais e de carotenóides totais foram calculados através das fórmulas propostas por Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em mg.g^{-1} de matéria fresca.

Obtenção dos extratos enzimáticos

Os extratos enzimáticos foram obtidos conforme o método descrito por Ekler et al. (1993). As amostras foram homogeneizadas com a utilização de almofariz gelado, em 5 mL de tampão gelado TRIS-HCl $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,8 contendo 1 mmol.L^{-1} de EDTA e 7,5% (peso.volume⁻¹) de polivinilpirrolidona e uma pequena quantidade de areia previamente lavada e esterilizada. O homogeneizado foi centrifugado a $14.000 \times g$ por 20 minutos a 4°C . O sobrenadante obtido de cada amostra foi coletado e armazenado em *freezer* a -20°C para posterior determinação da atividade das enzimas GST, SOD, CAT e POD, bem como dos teores de proteínas solúveis.

Determinações enzimáticas

A atividade da GST foi determinada de acordo com o método descrito por Wu et al. (1996). O sistema de reação foi composto de $30 \mu\text{L}$ de extrato enzimático, tampão fosfato de potássio 100 mmol.L^{-1} pH 6,9, glutationa reduzida (GSH) $3,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 30 mmol.L^{-1} , num volume final de $3,03 \text{ mL}$. A reação foi conduzida a 25°C durante 30 minutos. A utilização de CDBN simula a presença de compostos sintéticos, como herbicidas (Figura 1). A absorvância do conjugado GSH-CDNB foi medida em espectrofotômetro UV-visível a 340 nm . Para os cálculos, utilizou-se o coeficiente de extinção molar do conjugado, igual a $10 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Mannervik & Guthenberg, 1981). A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol de GSH-CDNB.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

Para a determinação da atividade da CAT, o sistema de reação, mantido a 20°C por 60 segundos, foi composto de $50 \mu\text{L}$ de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 7,0 contendo 1 mmol.L^{-1} de EDTA e H_2O_2 20 mmol.L^{-1} , num volume final de 1 mL . Após leituras de absorvância a 240 nm , utilizou-se para os cálculos o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). A atividade da enzima foi expressa em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína (Bor et al., 2003).

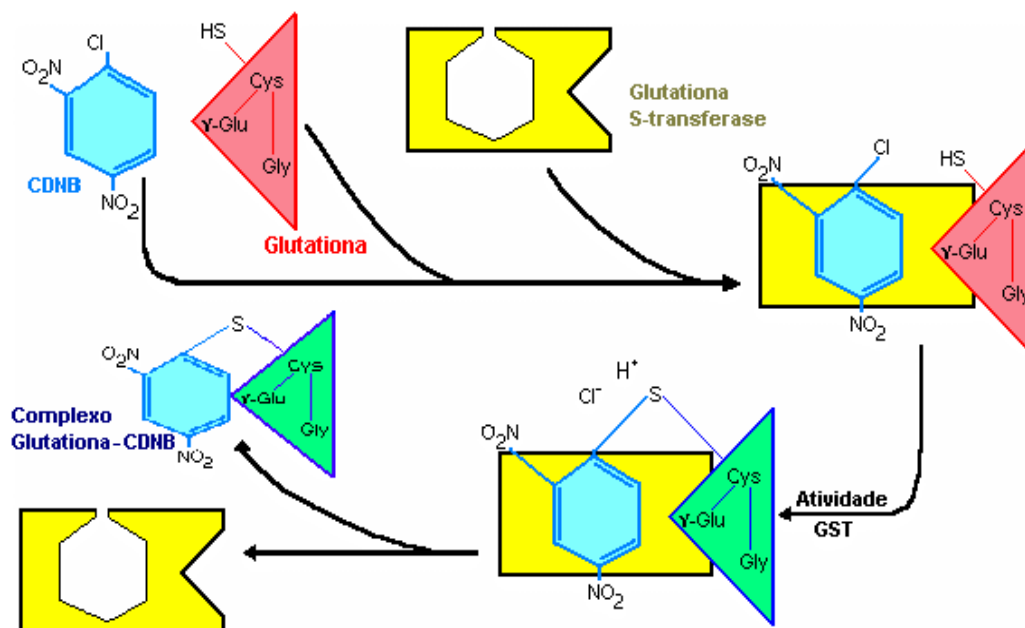


Figura 1. Esquema conceitual da reação catalisada pela GST. O grupo tiol (SH) situado na cadeia lateral da cisteína, um dos aminoácidos componentes do tripeptídeo glutatona (GSH), liga-se ao cloro presente no 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), originando o complexo GSH-CDNB.

Para a determinação da atividade da SOD, seguiu-se o método de Beauchamp & Fridovich (1971), citados por Bor et al. (2003). O sistema de reação foi composto de 30 μL de extrato enzimático, tampão fosfato de sódio 50 mmol.L^{-1} pH 7,8, mistura “nitroblue tetrazolium” (NBT) 33 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ + EDTA 0,66 mmol.L^{-1} (5:4) e mistura L-metionina 10 mmol.L^{-1} + riboflavina 3,3 mol.L^{-1} (1:1), totalizando um volume de 3,0 mL. Após iluminação dos tubos por dez minutos a 25°C, a redução do NBT a “blue formazan” foi medida por leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 nm. A atividade da SOD foi expressa em U.mg^{-1} de proteína. Neste caso, uma unidade (U) representa a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a razão de redução do NBT.

A atividade da POD foi determinada de acordo com as condições citadas no trabalho de Teisseire & Guy (2000). O sistema de reação foi composto de 30 μL de extrato enzimático diluído (1:10 em tampão de extração), tampão fosfato de potássio 50 mmol.L^{-1} pH 6,5, pirogalol (1,2,3-benzenotriol) 20 mmol.L^{-1} e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 5 mmol.L^{-1} , totalizando um volume de 1,0 mL. A reação foi conduzida a temperatura ambiente por 5 minutos. A formação de purpurogalina foi

medida em espectrofotômetro UV-visível a 430 nm e seu coeficiente de extinção molar ($2,5 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade específica da enzima, expressa em $\mu\text{mol de purpurogalina}.\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ de proteína.

De acordo com Scandalios (1993), a ação combinada da SOD, da CAT e POD permite efetivamente a eliminação das ERMO, conforme exemplificado na Figura 2.

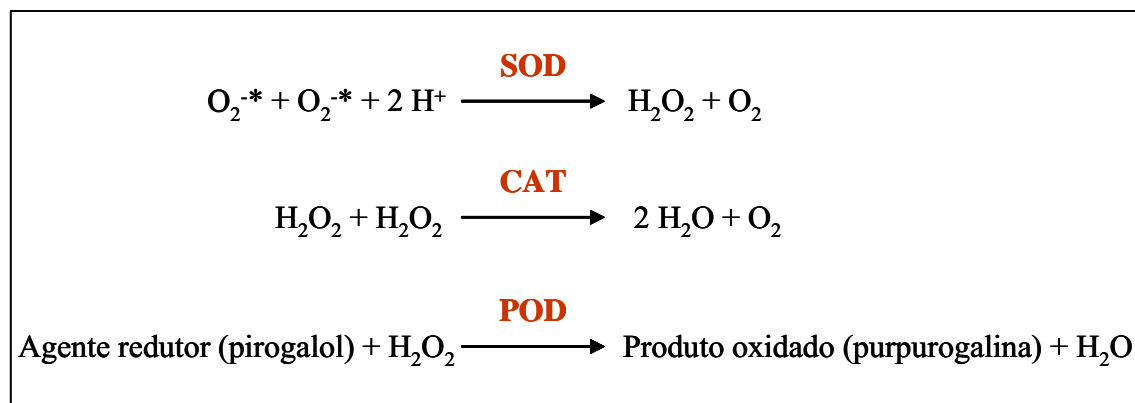


Figura 2. Esquema simplificado da ação conjunta das enzimas SOD, CAT e POD na eliminação das ERMO.

Quantificação dos teores de proteínas solúveis

Os teores de proteínas solúveis dos extratos enzimáticos, necessários para o cálculo da atividade específica das enzimas estudadas, foram quantificados pelo método de Bradford (1976). Leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível a 595 nm, utilizando-se caseína como proteína de referência.

Análise estatística dos resultados

Todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância, pelo teste F, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SAS. Em seguida, modelos de regressão polinomial foram construídos, quando verificada interação significativa entre doses de SNP ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) + lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$) x HAAL. Nas épocas de coleta onde tal interação não foi observada, somente os pontos foram plotados nos gráficos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversas condições de estresse nas plantas, tal como a utilização de herbicidas, podem promover nas plantas elevada produção de ERMO, acarretando em estresse oxidativo (Scandalios, 1993; Smirnoff, 1993; Thérond et al., 2000; Couée et al., 2006). Como consequência, as ERMO podem causar peroxidação de lipídios, modificações protéicas, rompimento das cadeias de DNA, destruição de clorofilas e extravasamento iônico, entre outras alterações, de modo que tais eventos podem culminar com a morte celular (Halliwell & Gutteridge, 1984; Baker & Orlandi, 1995; Giardi et al., 1997; Beligni & Lamattina, 1999b). Assim, a quantificação de indicadores de estresse oxidativo, tais como lipoperóxidos e pigmentos fotossintéticos, tornam-se relevantes na obtenção de maiores informações a respeito do nível de estresse oxidativo gerado nas plantas.

Nesse sentido, há estudos que demonstram elevação na produção de lipoperóxidos, bem como a degradação de clorofilas em plantas de diferentes espécies tratadas com herbicidas, tais como trigo e cevada tratadas com oxyfluorfen (Choi et al., 1999), soja sob efeito de lactofen (Remaeh, 2004), algas mantidas na presença de flumioxazin (Geoffroy et al., 2004) e milho utilizando-se atrazine (Nemat Alla & Hassan, 2006). Também tem sido relatado que herbicidas como clomazone, fluridone, norflurazon, diflufenican e flurtamone podem causar degradação de carotenóides nas plantas (Böger, 1996; Jung et al., 1999; Kana et al., 2004; Kim et al., 2004).

No presente estudo, observou-se na Tabela 1 interação significativa entre doses de SNP + lactofen x HAAL em relação aos indicadores de estresse oxidativo avaliados, exceto quanto aos teores de carotenóides totais.

Tabela 1. Análise de variância referente aos indicadores de estresse oxidativo: teores de lipoperóxidos, clorofilas totais, suas frações “a” e “b” e carotenóides totais em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP, seguido de lactofen (X), em duas épocas de coleta (Y).

variáveis	interação	F	Pr > F	CV%
lipoperóxidos	X*Y	4,40	<0,0001*	15,23
clorofila "a"	X*Y	3,88	<0,0001*	13,11
clorofila "b"	X*Y	6,97	<0,0001*	10,40
clorofilas totais	X*Y	3,44	0,0001*	12,42
carotenóides totais	X*Y	3,08	0,2797 ^{NS}	18,08

*Significativo a 5% de probabilidade. NS: não significativo.

Nas plantas que não receberam pré-tratamento com SNP e naquelas pré-tratadas com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ houve redução dos teores de lipoperóxidos nos momentos iniciais após a aplicação do lactofen, até 72 HAAL, seguido de elevação até 120 HAAL (Figura 3). Nas pré-tratadas com as maiores doses de SNP (100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), não houve alteração significativa dos valores dessa variável ao longo do tempo. Em contrapartida, pôde-se constatar principalmente naquelas pré-tratadas com 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ baixos teores no início e no final da avaliação (24 e 120 HAAL).

Diversos estudos mencionam efeito protetor do NO contra o estresse oxidativo por ocasionar redução dos teores de lipoperóxidos, como relatado em plantas de girassol expostas à presença de cádmio (Laspina et al., 2005) e em folhas de arroz submetidas a diferentes condições de estresse, tais como exposição ao herbicida paraquat (Hung et al., 2002), ao ácido abscísico (Hung & Kao, 2003), à presença de cádmio (Hsu & Kao, 2004) e cobre (Chi Yu et al., 2005), bem como em condições de estresse hídrico (Cheng et al., 2002). Tal proteção se deve ao fato de o NO interromper as reações em cadeia da peroxidação de lipídios, por interagir com os radicais lipídicos alcóxila ou peróxila formados nesse processo (Beligni & Lamattina, 1999a; Van Breusegem et al., 2001).

Diante dessas considerações, pôde-se constatar que no presente estudo o NO promoveu redução da peroxidação lipídica nas plantas de soja, principalmente logo nas primeiras horas após a aplicação de lactofen e no período final de observação (120 HAAL). Porém, sua eficácia não foi completa, por não ter promovido a redução dos teores de lipoperóxidos durante os demais períodos avaliados.

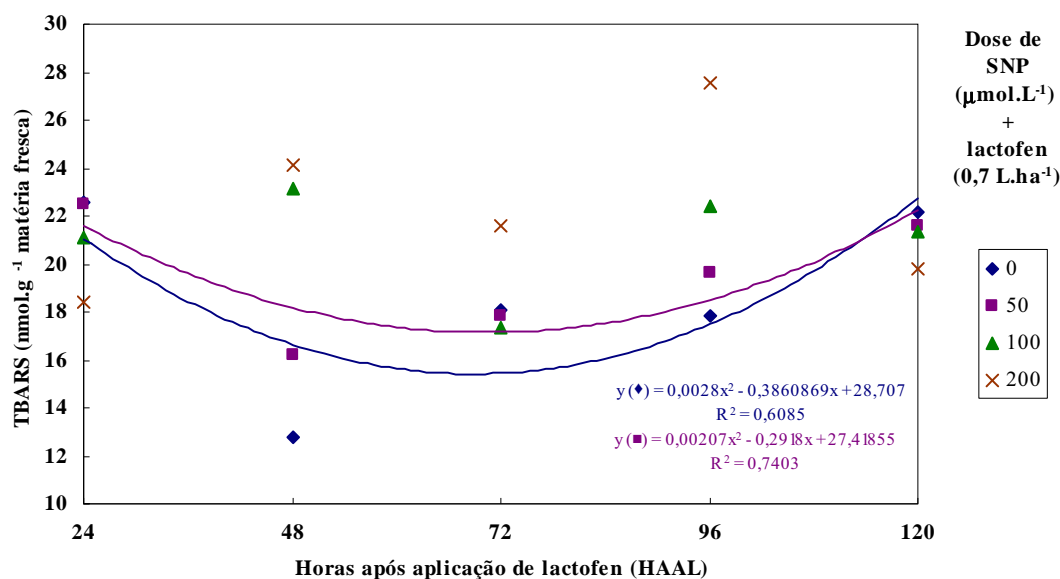


Figura 3. Teores de lipoperóxidos (nmol de TBARS.g⁻¹ matéria fresca) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. No pré-tratamento com 100 e 200 µmol.L⁻¹ de SNP, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen. TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

De maneira similar ao observado em relação aos teores de lipoperóxidos, as plantas tratadas somente com lactofen apresentaram redução dos teores de clorofilas totais e suas frações “a” e “b” nas horas iniciais após a aplicação de lactofen, até 72 HAAL, com posterior elevação nos momentos finais avaliados (Figura 4).

Por outro lado, naquelas pré-tratadas com 50 µmol.L⁻¹, houve manutenção dos teores de clorofila “b” até 72 HAAL, seguido de declínio nos períodos posteriores (Figura 4B), comportamento oposto ao verificado em relação aos teores de lipoperóxidos nessas plantas. Além disso, deve ser mencionado que nas plantas que receberam a maior dose de SNP em pré-tratamento (200 µmol.L⁻¹), os teores mais elevados de clorofilas totais e suas frações “a” e “b” foram detectados às 24 e 120 HAAL, períodos nos quais foram detectados os menores teores de lipoperóxidos. Nessas ocasiões, os teores de clorofilas totais e suas frações “a” e “b” não foram prejudicados pelo lactofen, enquanto que baixos teores de lipoperóxidos foram mantidos.

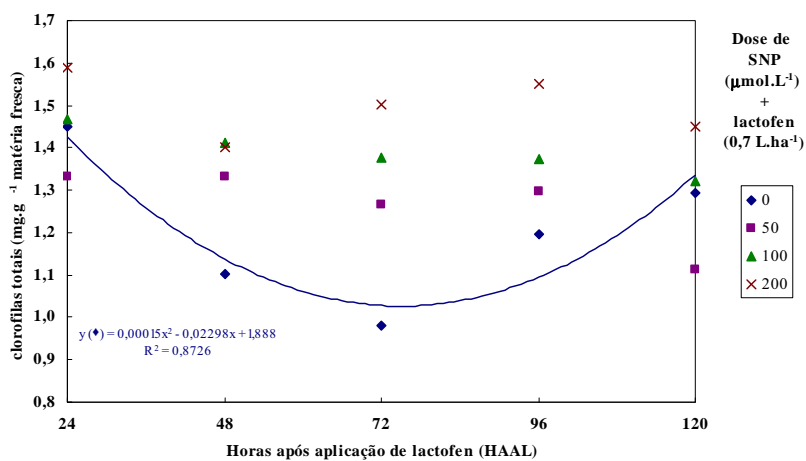
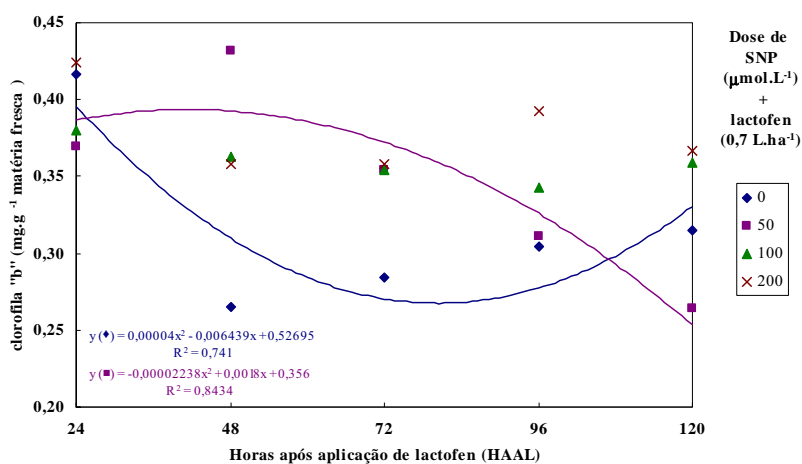
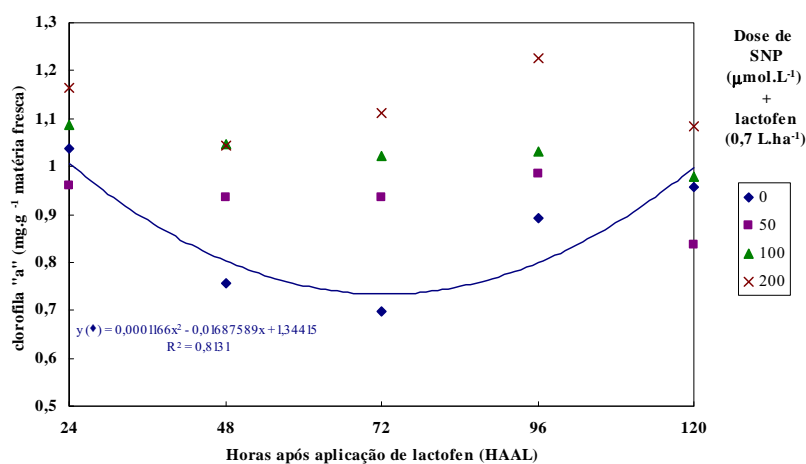


Figura 4. Teores (mg.g^{-1} matéria fresca) de clorofila "a" (4A), clorofila "b" (4B) e clorofilas totais (4C) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. No pré-tratamento com 50 (Figuras 4A e 4C), 100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP (Figuras 4A, 4B e 4C), não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

É descrito na literatura que o NO apresenta ação protetora contra a degradação de clorofila induzida sob condições geradoras de estresse oxidativo, tais como aplicação dos herbicidas diquat e paraquat em segmentos foliares de batata (Beligni & Lamattina, 1999c), infestação pelo fungo *Phytophthora infestans* em folhas de batata (Laxalt et al., 1997) e presença de cádmio em plantas de girassol (Laspina et al., 2005).

No presente estudo, também se observou que, de maneira geral, nos períodos intermediários de avaliação (48, 72 e 96 HAAL), maiores teores de lipoperóxidos, bem como de clorofilas totais e suas frações “a” e “b” foram apresentados pelas plantas pré-tratadas com SNP.

Uma possível explicação para esse fato seria que o tratamento de plantas com herbicidas difenil-éteres leva à inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox), o que promove redução na síntese de clorofilas, bem como acúmulo de protoporfirinogênio IX (Gupta & Tripathy, 1999; Merotto Junior & Vidal, 2001; Tripathy et al., 2007). Conseqüentemente, o acúmulo de porfirinas gera estresse oxidativo, por levar à produção de oxigênio singlete (1O_2), capaz de oxidar lipídios e proteínas originando peróxidos ou outros produtos oxidados, culminando em sérios danos aos tecidos (Gupta & Tripathy, 1999; Tripathy & Singhal, 1999; Tripathy et al., 2007).

Por sua vez, a molécula heme atua como reguladora da rota de síntese das porfirinas. Entretanto, a ação dos herbicidas inibidores da Protox acontece antes da produção de heme e, assim, a sinalização de interrupção da rota não acontece. Por isso, a planta continua produzindo protoporfirinogênio IX mesmo na presença desses herbicidas. A continuidade do funcionamento da rota e a ausência de produção de clorofila determina o aumento do fluxo de carbono para este metabolismo, objetivando o suprimento de clorofila. A contínua alimentação da rota aumenta a produção de protoporfirinogênio IX e, assim, os danos causados pela inibição da enzima Protox são continuamente incrementados (Merotto Junior & Vidal, 2001). Por outro lado, a meia vida dos herbicidas difenil-éteres no interior celular é de apenas duas horas (Duke et al., 1991).

Desta forma, sugere-se que após esse período a planta retome a síntese de clorofilas, uma vez que a enzima Protox não se encontra mais sob inibição. Porém, tal fato não impediria que os teores de lipoperóxidos continuassem aumentando, em decorrência do acúmulo de protoporfirinogênio IX promovido pelos herbicidas.

Tais considerações poderiam justificar o fato de, no presente estudo, os teores de clorofilas totais e suas frações “a” e “b” terem se mantido estáveis, embora as plantas pré-tratadas com SNP apresentassem elevados teores de lipoperóxidos, nos períodos intermediários de avaliação (48, 72 e 96 HAAL). Tem sido descrito que o NO é capaz de interromper as reações em cadeia responsáveis pela peroxidação lipídica (Beligni & Lamattina, 1999a; Van Breusegem et al., 2001). Porém, tal efeito não foi verificado no presente estudo nos períodos acima mencionados, provavelmente em função do acúmulo de protoporfirinogênio IX promovido pelo lactofen.

Pode ser observado que maiores teores de carotenóides totais foram detectados nas plantas pré-tratadas com SNP (Figura 5), exceto na avaliação realizada às 24 HAAL.

É de conhecimento que, além de sua ação na fotossíntese, os carotenóides exercem função antioxidante nos cloroplastos devido sua capacidade de extinguir as ERMO que são naturalmente formadas durante este processo (Oelmüller, 1989; Thiele et al., 1996; Havaux et al., 2000; Kim et al., 2004). A redução dos teores de carotenóides pode acarretar em estresse oxidativo, em virtude da degradação oxidativa das clorofilas e da rápida destruição das membranas dos tilacóides pelo excesso de ERMO geradas, resultando em descoloração, necrose, dessecação e morte dos tecidos (Foyer et al., 1994b; Böger, 1996; Bartosz, 1997; Hess, 2000; Kim et al., 2004).

Sabe-se que o NO, a exemplo dos carotenóides, também pode atuar como um antioxidante, pela sua capacidade de eliminar diretamente as ERMO, amenizando o estresse oxidativo (Radi et al., 1991; Laspina et al., 2005). Além disso, na presença de luz, os carotenóides podem promover a síntese de NO endógeno nas plantas (Cooney et al., 1994).

Desta forma, pode-se sugerir que no presente estudo o NO e os carotenóides atuem em conjunto na proteção das plantas de soja contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen, evidenciado pela manutenção dos teores de clorofilas totais e suas frações “a” e “b”, embora a peroxidação lipídica não tenha sido impedida e nem totalmente interrompida.

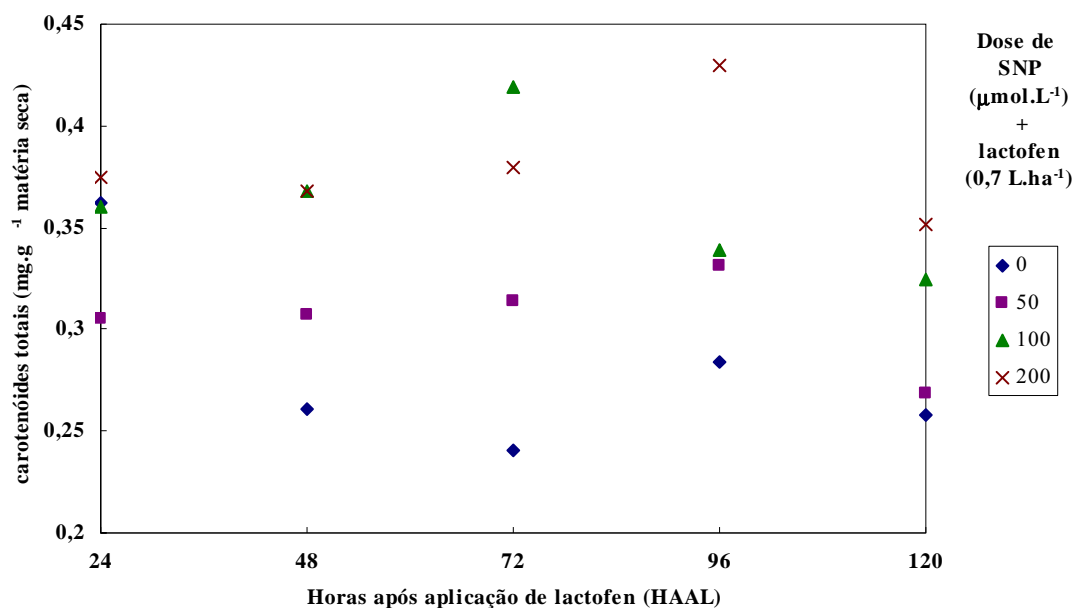


Figura 5. Teores (mg.g^{-1} matéria fresca) de carotenóides totais em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha^{-1}), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Em todas as doses, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

Além da atuação de antioxidantes pertencentes ao sistema natural de defesa das plantas, destacam-se enzimas, tais como SOD, CAT e POD (Eltner, 1982; Winston, 1990; Smirnoff, 1993; Sies, 1997; Radetski et al., 2000). Além destas, as GSTs catalisam a conjugação de compostos eletrofílicos sintéticos com o tripeptídeo glutationa (γ -glutamil-cisteinil-glicina, GSH) e os produtos S-glutationilados polares formados são então ativamente removidos do citosol por transportadores ligados ao ATP, sendo exportados das células, no caso dos animais, ou importados para os vacúolos das plantas, antes de serem posteriormente metabolizados (Sanchez-Fernandez et al., 2001).

Por pertencerem ao sistema de defesa de proteção das plantas, as GSTs atuam na metabolização dos xenobióticos, como lactofen em soja (Remaeh, 2004), oxyfluorfen em células de soja (Knörzer et al., 1996) e plantas de trigo (Cataneo et al., 2002), glyphosate (Cataneo et al., 2003) e atrazine (Nemat Alla & Hassan, 2006) em plantas de milho.

No presente trabalho, observou-se interação significativa entre doses de SNP + lactofen x HAAL em relação à atividade da GST e das enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de variância referente às atividades da GST, SOD, CAT e POD em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP, seguido de lactofen (X), em duas épocas de coleta (Y).

variáveis	interação	F	Pr > F	CV%
GST	X*Y	17,59	<0,0001*	12,59
SOD	X*Y	35,92	<0,0001*	11,34
CAT	X*Y	10,57	<0,0001*	23,27
POD	X*Y	87,21	<0,0001*	10,89

*Significativo a 5% de probabilidade.

A atividade da GST foi maior nas plantas de soja tratadas somente com o lactofen, em comparação com as que receberam pré-tratamento com SNP, exceto na primeira avaliação realizada, às 24 HAAL (Figura 6). As plantas pré-tratadas com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP apresentaram aumento linear de atividade da enzima ao longo do tempo, enquanto que naquelas pré-tratadas com a maior dose (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) houve um decréscimo dessa atividade após 24 HAAL.

Para nosso conhecimento, não existem relatos da ação de NO sobre a atividade de GST em plantas submetidas ao tratamento com herbicidas. Porém, estudos demonstram que o NO promove a expressão gênica da GST em plantas de soja (Delledone et al., 1998) e tabaco (Durner et al., 1998) expostas à presença de patógenos. A GST também pode sofrer um aumento de sua expressão gênica na presença de H_2O_2 , fato observado por Desikan et al. (1998) em células de *Arabidopsis*, e por Levine et al. (1994) em plantas de soja.

Assim, no presente estudo, o fato de as plantas pré-tratadas com SNP terem apresentado menor atividade da GST, principalmente naquelas que receberam a maior dose (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), pode ter sido decorrente da ação antioxidante do NO na eliminação do H_2O_2 gerado em consequência da ação do lactofen.

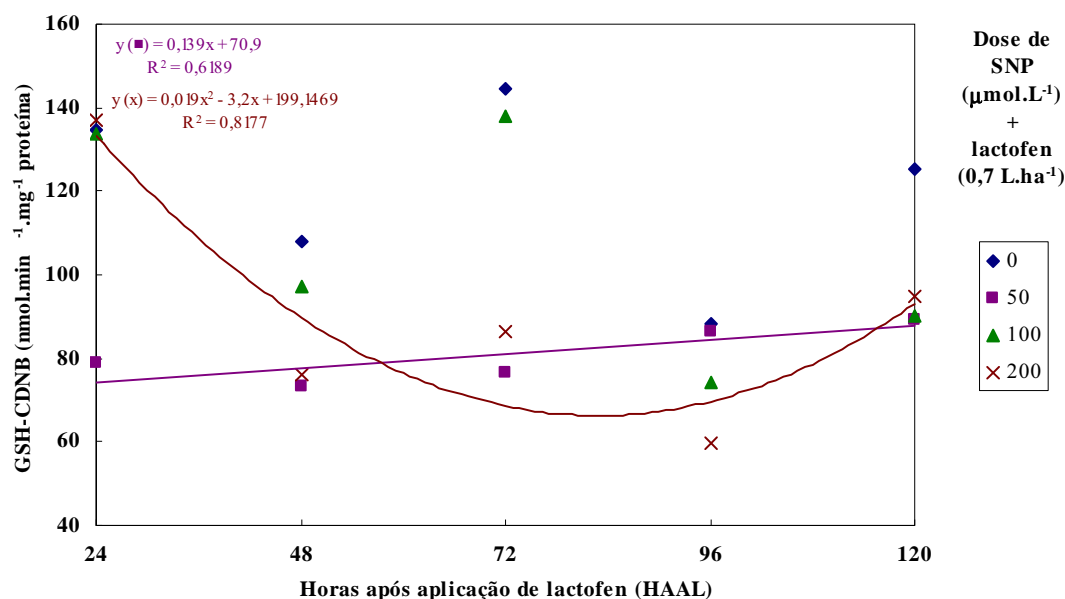


Figura 6. Atividade da GST (nmol de GSH-CDNB.min⁻¹.mg⁻¹ proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 µmol.L⁻¹), seguido de lactofen (0,7 L.ha⁻¹), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Na ausência de SNP e no pré-tratamento com 100 µmol.L⁻¹, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

A SOD é uma enzima participante da eliminação de radicais O₂^{-*} formados em plantas expostas a agentes oxidantes (Bowler et al., 1992; Scandalios, 1993). Trabalhos relatam aumentos de atividade da SOD em plantas promovendo proteção e tolerância à herbicidas. Como exemplos, Iannelli et al. (1999) constataram que um aumento de atividade da SOD promoveu resistência de plantas de milho ao paraquat, enquanto que Nemat Alla & Hassan (2006) observaram aumentos de atividade da SOD em plantas de milho híbrido 351 pulverizadas com atrazine. Remaeh (2004) também verificou aumento de atividade da SOD em plantas de soja tratadas com lactofen.

No presente estudo, pode ser verificado que na ausência do pré-tratamento das plantas com SNP, maior atividade da SOD foi detectada nas avaliações iniciais com estabilização a partir das 72 HAAL (Figura 7). Foi detectado que nas primeiras avaliações ocorreu maior atividade da SOD em decorrência do aumento da dose de SNP. Porém, este comportamento inverteu-se no transcorrer do tempo, onde na última

avaliação realizada (120 HAAL) a atividade da SOD diminuiu em função do aumento da dose de SNP.

Estudos mostram que, na presença de NO ou de substâncias doadoras, uma baixa atividade da SOD, acompanhada de redução dos teores de lipoperóxidos e de aumento dos teores de pigmentos fotossintéticos, indicam proteção das plantas contra o estresse oxidativo gerado em diferentes situações, como é o caso da presença de cádmio em plantas de girassol (Laspina et al., 2005). De maneira similar, Hung & Kao (2003) observaram que o ácido abscísico (ABA) promoveu estresse oxidativo e senescência em folhas de arroz, caracterizados pelo aumento dos teores de H_2O_2 e de lipoperóxidos e pelo aumento de atividade da SOD. Porém, quando as folhas foram expostas à presença de ABA e de N-tert-butil- α -fenilnitrona (PBN), substância doadora de NO, houve uma redução na atividade da SOD, dos teores de lipoperóxidos e de H_2O_2 . É válido registrar o trabalho de Caro & Puntarulo (1998), que observaram redução na produção de radicais $O_2^{\cdot-}$ em eixos embrionários de soja na presença de NO.

Baseado na literatura, é evidente que a diminuição da atividade da SOD é devido à menor disponibilidade de substrato ($O_2^{\cdot-}$) como efeito da ação do NO.

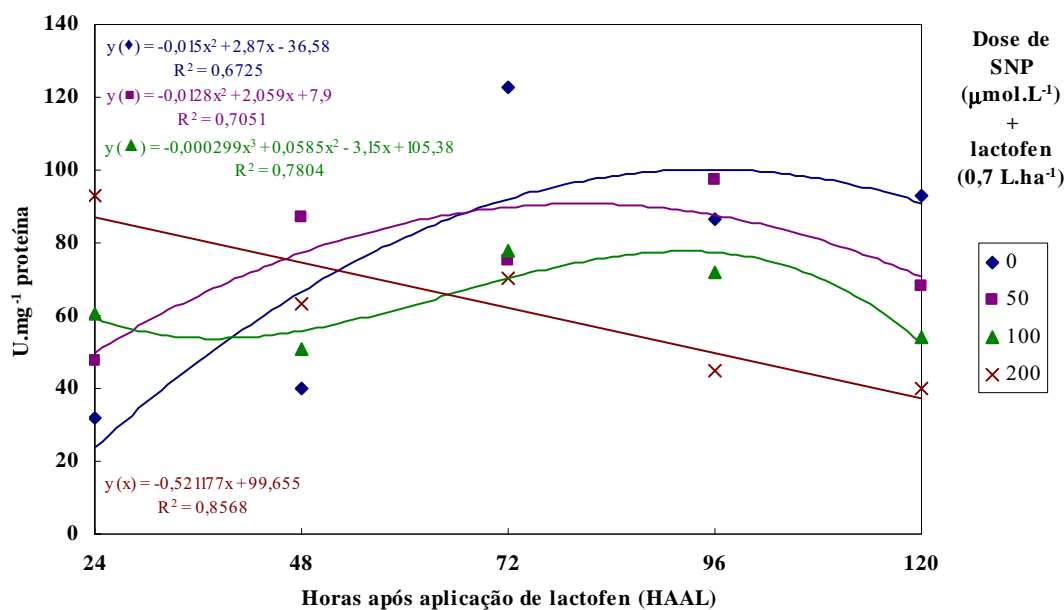


Figura 7. Atividade da SOD (U.mg^{-1} proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen (0,7 L.ha^{-1}), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

No presente estudo, tal fato foi constatado nas plantas pré-tratadas com a maior dose de SNP ($200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), que apresentaram elevados teores de clorofilas totais, suas frações “a” e “b” e de carotenóides totais, bem como baixos teores de lipoperóxidos às 120 HAAL, período onde foi observada menor atividade da SOD. Assim, sugere-se que na medida em que se aumentou a dose de SNP aplicada em pré-tratamento das plantas de soja, o NO tenha promovido gradativamente a eliminação do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, substrato da SOD, amenizando-se assim o estresse oxidativo gerado pelo lactofen.

A CAT também atua como antioxidante, por converter o H_2O_2 em H_2O e O_2 (Scandalios, 1993). No presente trabalho, foi observado que às 24, 72 e 96 HAAL, as plantas pré-tratadas com SNP apresentaram menor atividade da CAT (Figura 8). Quando se aplicou SNP na dose de $100 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pré-tratamento, as plantas apresentaram baixa atividade da CAT às 24 e 120 HAAL, períodos nos quais foram detectados baixos teores de lipoperóxidos e elevados teores de clorofilas e carotenóides.

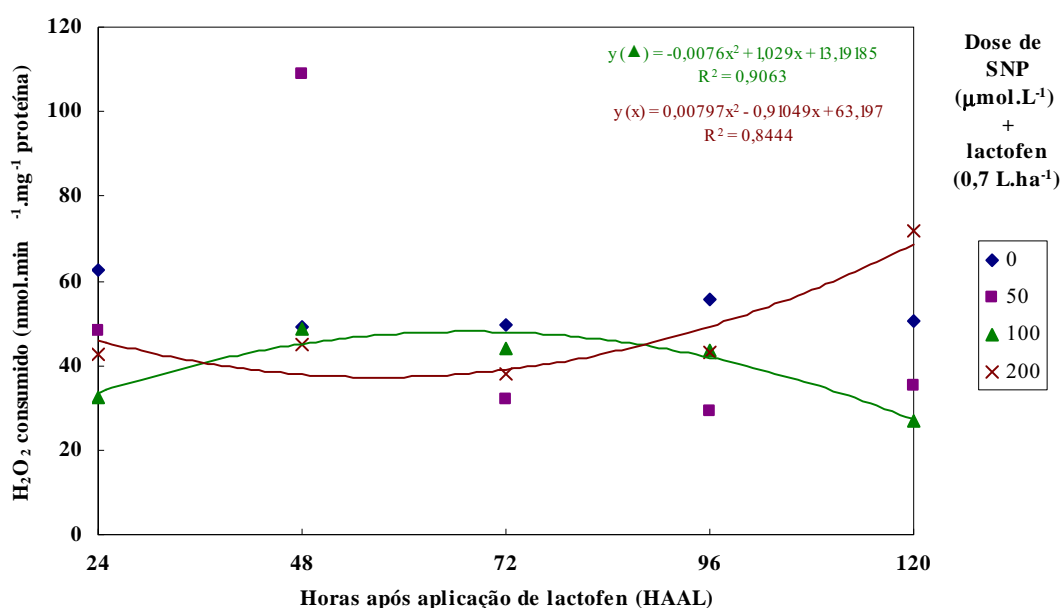


Figura 8. Atividade da CAT ($\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido.min}^{-1}.\text{mg}^{-1} \text{ proteína}$) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP ($0, 50, 100$ e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Na ausência de SNP e no pré-tratamento com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

Como efeito isolado, observou-se um pico de atividade da CAT às 48 HAAL nas plantas pré-tratadas com 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP, período onde a atividade da SOD também foi elevada. Concomitantemente, tais plantas apresentaram nesse período elevados teores dos pigmentos fotossintéticos, principalmente os referentes à clorofila “b”, além de baixos teores de lipoperóxidos. Tais resultados indicam a ação antioxidante conjunta da CAT e da SOD no combate ao estresse oxidativo, de modo que a SOD converte o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , que posteriormente é hidrolisado pela CAT, produzindo H_2O e O_2 (Halliwell & Gutteridge, 1990; Laspina et al., 2005).

De acordo com Polidoros & Scandalios (1999) a expressão gênica da CAT em milho pode ser inibida por baixas concentrações de H_2O_2 ou induzida por elevadas concentrações. Além disso, em folhas de arroz tratadas com ácido abscísico (ABA), Hung & Kao (2003) observaram aumentos concomitantes dos níveis de H_2O_2 e da atividade da CAT.

Estas informações permitem sugerir que no presente estudo a redução de atividade da CAT nas plantas pré-tratadas com SNP pode ter sido decorrente da menor produção de H_2O_2 , como efeito do NO, o que reitera sua ação protetora nas plantas de soja pela eliminação das ERMO geradas pelo lactofen.

Porém, foi detectado aumento de atividade da CAT nas plantas pré-tratadas com a maior dose de SNP (200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) às 120 HAAL. Tal fato não era esperado, pois neste período as plantas apresentaram baixos teores de lipoperóxidos e elevados teores de clorofilas e carotenóides, bem como baixas atividades das enzimas GST e SOD. Uma possível explicação seria que a CAT estaria removendo parte do H_2O_2 gerado e ainda não eliminado por ação do NO, contribuindo para a defesa antioxidante das plantas contra o estresse oxidativo induzido pelo lactofen.

As PODs apresentam função antioxidante nas células vegetais expostas a condições de estresse por decomporem o H_2O_2 produzido pela SOD, tendo ação semelhante à da CAT (Bor et al., 2003). Pesquisas relatam aumentos de atividade da POD em resposta a diferentes condições de estresses ambientais, como presença de ozônio em folhas de *Sedum album* (Castillo et al., 1984), dióxido de enxofre em plantas de cevada (Navari-Izzo & Izzo, 1994), elevada luminosidade em plântulas de trigo (Mishra et al., 1995), baixas temperaturas e presença de H_2O_2 em plântulas de milho (Prasad et al., 1994) e presença do herbicida oxyfluorfen em células de soja (Knörzner et al., 1996). Nesses casos, foi considerado que a POD desempenhou importante papel na eliminação do H_2O_2 durante as referidas condições geradoras de estresse oxidativo.

Nos momentos iniciais da avaliação, até 72 HAAL, as plantas pré-tratadas com $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de SNP apresentaram aumento de atividade da POD, seguido de redução nos períodos posteriores, semelhante ao observado em relação às atividades da SOD e da CAT (Figura 9).

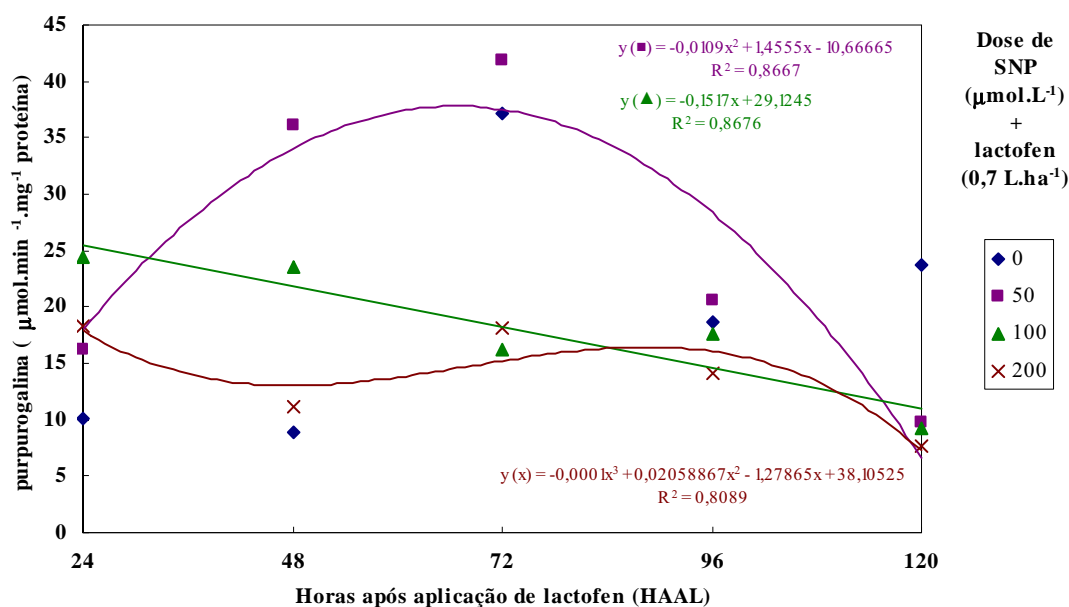


Figura 9. Atividade da POD (μmol de purpurogalina. $\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de soja pré-tratadas com diferentes doses de SNP (0, 50, 100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), seguido de lactofen ($0,7 \text{ L.ha}^{-1}$), às 24, 48, 72, 96 e 120 HAAL. Na ausência de SNP, não houve interação significativa entre doses de SNP + lactofen x DAAL, a 5% de probabilidade – sem ajuste. Médias de quatro repetições. HAAL: horas após aplicação de lactofen.

Nas plantas pré-tratadas com as maiores doses de SNP (100 e $200 \mu\text{mol.L}^{-1}$), houve tendência à redução de atividade da POD com o decorrer do tempo. Similarmente, Chi Yu et al. (2005) observaram ausência de indução de atividade da POD em folhas de arroz pré-tratadas com SNP sob estresse induzido pela presença de cobre.

Diante dos resultados obtidos no presente trabalho, pode ser concluído que em plantas de soja, apesar da peroxidação lipídica não ter sido totalmente interrompida pelo NO, este apresenta capacidade de eliminação das ERMO geradas pela ação do herbicida lactofen impedindo, portanto, a degradação de pigmentos fotossintéticos. Conseqüentemente, a eliminação das ERMO pelo NO acarreta tanto diminuição de

substrato disponível para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD, essenciais na proteção das plantas em situações indutoras de estresse oxidativo, como ausência de indução da GST pelo H₂O₂.

AGRADECIMENTOS

À CAPES, pelo financiamento deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.**, v.24, p.1-15, 1949.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.33, p.299-321, 1995.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiol. Plantarum**, v.19, p.47-64, 1997.

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v.44, p.276-87, 1971.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? **Trends Plant Sci.**, v.4, p.299-300, 1999a.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-44, 1999b.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v.3, p.199-208, 1999c.

BÖGER, P. Mode of action of herbicides affecting carotenogenesis. **J. Pestic. Sci.**, v.21, p.473-8, 1996.

BOR, M., ÖZDEMİR, F., TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Sci.**, v.164, p.77-84, 2003.

BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-54, 1976.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAM, M.B. (Eds). **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.25-50.

CARO, A., PUNTARULO, S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. **Physiol. Plant.**, v.104, p.357-64, 1998.

CASTILLO, F.J., PENEL, C., GREPPIN, H. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. **Plant Physiol.**, v.74, p.846-51, 1984.

CATANEO, A.C., CHAMMA, K.L., FERREIRA, L.C., DÉSTRO, G.F.G., CARVALHO, J.C., NOVELLI, E.L.B. Glutathione S-transferase activity in acetochlor, atrazine and oxyfluorfen metabolization in maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae). **Acta Sci.**, v.24, p.619-23, 2002.

CATANEO, A.C., DÉSTRO, G.F.G., FERREIRA, L.C., CHAMMA, K.L., SOUSA, D.C.F. Atividade de glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v.21, p.307-12, 2003.

CHENG, F.Y., HSU, S.Y., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of detached rice leaves induced by dehydration and polyethylene glycol but not by sorbitol. **Plant Growth Regul.**, v.38, p.265-72, 2002.

CHI YU, C., HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.162, p.1319-30, 2005.

CHOI, J.S., LEE, H.J., HWANG, I.T., PYON, J.Y., CHO, K.Y. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.65, p.62-72, 1999.

COONEY, R.V., HARWOOD, P.J., CUSTER, L.J., FRANKE, A.A. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. **Environ. Health Perspec.**, v.102, p.460-2, 1994.

COUÉE, I., SULMON, C., GOUESBET, G., EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.449-59, 2006.

DELLEDONNE, M., XIA, Y., DIXON, R.A., LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-8, 1998.

DESIKAN, R., REYNOLDS, A., HANCOCK, J.T., NEILL, S.J. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochem. J.**, v.330, p.115-20, 1998.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: Englewood Cliffs, 1993. 441p.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: FOYER, C.H., MULLINEAUX, P.M. (Eds). **Causes of photoactive stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.219-36.

DUKE, S.O., LYDON, J., BECERRIL, J.M., SHERMAN, T.D., LEHNEN JUNIOR, L.P., MATSUMOTO, H. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Sci.**, v.39, p.465-473, 1991.

DURNER, J., WENDEHENNE, D., KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-3, 1998.

EKLER, Z., DUTKA, F., STEPHENSON, G.R. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. **Weed Res.**, v.33, p.311-8, 1993.

ELSTNER, E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.33, p.73-96, 1982.

FOYER, C.H., DESCOURVIERES, P., KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, v.17, p.507-523, 1994a.

FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. **Physiol. Plant.**, v.92, p.696-717, 1994b.

GEOFFROY, L., FRANKART, C., EULLAFFROY, P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environ. Pollut.**, v.131, p.233-41, 2004.

GIARDI, M.T., MASOJIDEK, J., GODDE, D. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D₁ reaction centre II protein. **Physiol. Plant.**, v.101, p.635-42, 1997.

GUPTA, I., TRIPATHY, B.C. Oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings treated with acifluorfen. **Z. Naturforsch.**, v.54C, p.771-81, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. **Biochem. J.**, v.219, p.1-14, 1984.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. **Methods Enzymol.**, v.186, p.1-85, 1990.

HAVAUX, M., BONFILS, J.P., LÜTZ, C., NIYOGI, K.K. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophylls cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. **Plant Physiol.**, v.124, p.273-84, 2000.

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-98, 1968.

HESS, F.D. Light-dependent herbicides: a review. **Weed Sci.**, v.48, p.160-70, 2000.

HSU, Y.T., KAO, C.H. Cd toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul.**, v.42, p.227-38, 2004.

HUNG, K.T., CHANG, C.J., KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-66, 2002.

HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. **J. Plant Physiol.**, v.160, p.871-9, 2003.

IANNELLI, A.M., VAN BREUSEGEM, F., VAN MONTAGU, M., INZE, D., MASSACCI, A. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. **J. Exp. Bot.**, v.50, p.523-32, 1999.

IUBMB. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. Enzyme nomenclature – EC 1.11.1.7. (Peroxidase). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>>. Acesso em: 25 jun. 2007.

JEPSON, I., LAY, V.J., HOLT, D.C., BRIGHT, S.W.J., GREENLAND, A.J. Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. **Plant Mol. Biol.**, v.26, p.1855-66, 1994.

JUNG, S., KIM, J.S., CHO, K.Y., KANG, B.G. Changes in the pools of carotenoids and protochlorophyll(ide) in etiolated cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons treated with norflurazon and KC 6361. **Photosynthetica**, v.36, p.361-73, 1999.

KANA, R., SPUNDOVÁ, M., ILÍK, P., LAZÁR, D., KLEM, K., TOMEK, P., NAUS, J., PRÁŠIL, O. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.78, p.161-70, 2004.

KIM, J.S., YUN, B.W., CHOI, J.S., KIM, T.J., KWAK, S.S., CHO, K.Y. Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.78, p.127-39, 2004.

KNÖRZER, O.C., DURNER, J., BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiol. Plant.**, v.97, p.388-96, 1996.

KOPYRA, M., GWÓZDZ, E.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-7, 2003.

LAMATTINA, L., GARCIA-MATA, C., GRAZIANO, M., PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.54, p.109-36, 2003.

LASPINA, N.V., GROPPA, M.D., TOMARO, M.L., BENAVIDES, M.P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Sci.**, v.169, p.323-30, 2005.

LAXALT, A., BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.73, p.643-51, 1997.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regul.**, v.18, p.155-9, 1996.

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583-93, 1994.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, v.148, p.350-82, 1987.

MANNERVIK, B., GUTHENBERG, C. Glutathione transferases (human placenta). **Methods Enzymol.**, v.77, p.231-5, 1981.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.47, p.127-58, 1996.

MEROTTO JUNIOR, A., VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R.A., MEROTTO JUNIOR, A. (Eds). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p.69-86.

MISHRA, N.P., FATMA, T., SINGHAL, J.S. Development of antioxidative defence system of wheat seedlings in response to high light. **Physiol. Plant.**, v.95, p.77-82, 1995.

NAVARI-IZZO, F., IZZO, R. Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. **Plant Sci.**, v.96, p.31-40, 1994.

NEMAT ALLA, M.M., HASSAN, N.M. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. **Plant Physiol. Biochem.**, v.44, p.202-10, 2006.

OELMÜLLER, R. Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. **Photochem. Photobiol.**, v.49, p.229-39, 1989.

POLIDOROS, A.N., SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiol. Plant.**, v.106, p.112-20, 1999.

PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., MARTIN, B.A., STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, v.6, p.65-74, 1994.

RADETSKI, C.M., COTELLE, S., FÉRARD, J.F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environ. Exp. Bot.**, v. 44, p.221-9, 2000.

RADI, R., BECKAM, J.S., BASH, K.M., FREEMAN, R.A. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.228, p.481-7, 1991.

RAMA DEVI, S., PRASAD, M.N.V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Sci.**, v.138, p.157-65, 1998.

REMAEH, L.M.R. **Estresse oxidativo induzido pelo herbicida lactofen em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill): resposta de enzimas antioxidantes**. Botucatu, 2004. 87f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F.L.S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

SANCHEZ-FERNANDEZ, R., REA, P.A., DAVIES, T.G.E., COLEMAN, J.O.D. Do plants have more genes than humans? Yes, when it comes to ABC proteins. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.347-8, 2001.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v.101, p.7-12, 1993.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, v.82, p.291-5, 1997.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytol.**, v.125, p.27-8, 1993.

TEISSEIRE, H., GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Sci.**, v.153, p.65-72, 2000.

THÉRON, P., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., DAVIT-SPRAUL, A., CONTI, M., LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.3, p.373-84, 2000.

THIELE, A., SCHIRWITZ, K., WINTER, K., KRAUSE, G.H. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. **Plant Sci.**, v.115, p.237-50, 1996.

TRIPATHY, B.C., MOHAPATRA, A., GUPTA, I. Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. **Biochim. Biophys. Acta**, 2007. (In Press).

TRIPATHY, B.C., SINGHAL, G.S. Oxidative stress in photodynamic herbicidal action of 5-aminolevulinic acid. In: SINGHAL, G.S., RENGER, G., SOPORY, S.K., IRRGAND, K.D., GOVINDJEE (Eds). **Concepts in photobiology, photosynthesis and photomorphogenesis**. New Delhi: Narosa Publishing House, 1999. p.668-88.

TSANG, E.W.T., BOWLER, C., HÉROUART, D., VAN CAMP, W., VILLARROEL, R., GENETELLO, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, v.3, p.783-92, 1991.

VAN BREUSEGEM; F., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci.**, v.161, p.405-14, 2001.

VIDAL, R.A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Pallotti, 1997. 165p.

WINSTON, G.W. Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: ALSCHER, R.G., CUMMING, J.R. (Eds). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p.57-86.

WU, J., OMOKAWA, H., HATZIOS, K.K. Glutathione S-transferase activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oryza sativa*). **Pest. Biochem. Physiol.**, v.54, p.220-9, 1996.

CONSIDERAÇÕES

FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na literatura, há diversas pesquisas que buscam investigar respostas proporcionadas pelas plantas de culturas agrícolas de importância econômica, como a soja, quando submetidas a tratamentos com herbicidas, no caso de inibidores da Protox, tais como o lactofen, cuja aplicação nas plantas acarreta estresse oxidativo. Assim, há estudos que avaliam o comportamento do sistema de defesa antioxidante responsável pela eliminação das ERMO geradas nessa condição, além da quantificação de indicadores bioquímicos e fitométricos, entre outros, que contribuem para uma maior elucidação dos níveis de injúrias causadas pelos herbicidas.

Nas últimas décadas, inúmeras revisões vêm sendo elaboradas com o propósito de abordar diversos aspectos referentes à ação do NO nas plantas. Assim, a revisão apresentada no presente estudo abordou as vias de síntese e algumas propriedades químicas do NO, além de mencionar pesquisas que relatam seu efeito protetor em plantas submetidas a estresses bióticos e abióticos, tais como seca, aquecimento, estresse salino, metais pesados, herbicidas e ataque de patógenos. A participação do NO em processos como germinação e superação de dormência de sementes, senescência celular, crescimento, organogênese radicular e apoptose / morte celular programada também foi abordada. Além disso, foram descritos a interação do NO com os hormônios vegetais etileno, ácido abscísico, citocinina e giberelina, bem como seu controle endógeno e o uso de substâncias exógenas doadoras.

Torna-se relevante mencionar que pesquisas relacionadas com a prática de aplicação exógena de doadores de NO, como o SNP, em pré-tratamento de plantas submetidas a diferentes condições de estresse vêm sendo realizadas com o objetivo de se observar o efeito protetor do NO sobre as mesmas. Desta forma, o presente estudo objetivou verificar os efeitos proporcionados pelo pré-tratamento de plantas de soja com SNP, seguido de tratamento com o herbicida lactofen, relacionando-os com o sistema de defesa antioxidante, através das avaliações das atividades das enzimas GST, SOD, CAT e POD, além de terem sido realizadas quantificações de indicadores de estresse oxidativo, tais como teores de lipoperóxidos, açúcares solúveis e pigmentos fotossintéticos, bem como avaliações de aspectos fitométricos como altura, comprimento radicular, número de folíolos e matéria seca.

O pré-tratamento das plantas de soja com SNP foi benéfico, pelo fato de o NO ter minimizado sintomas visuais de injúria proporcionados pelo lactofen nos folíolos

jovens. A redução da atividade das enzimas antioxidantes GST, SOD, CAT e POD, associada à manutenção de baixos teores de açúcares solúveis totais e redutores e aumento dos teores de clorofilas totais e suas frações “a” e “b” e carotenóides totais nas plantas pré-tratadas com SNP sugerem o efeito protetor do NO contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen. Diante desses resultados torna-se evidente que em plantas de soja o NO apresenta capacidade de eliminação das ERMO geradas pela ação do herbicida lactofen, o que acarreta tanto a ausência de indução da GST pelo H_2O_2 , tão bem como diminuição de substrato para as enzimas antioxidantes SOD, CAT e POD.

As plantas de soja possuem a capacidade de recuperar seu crescimento após a aplicação do lactofen. Além disso, o pré-tratamento com SNP proporcionou crescimento mais lento das plantas de soja. Assim, estudos mais avançados são necessários, especialmente vinculados à área de expressão gênica, visando maior esclarecimento de como a síntese do NO é modulada nos diferentes órgãos e compartimentos vegetais, bem como maior detalhamento dos alvos moleculares das sinalizações promovidas pelo NO, o que permitirá maior elucidação dos mecanismos pelos quais o NO pode atuar na sinalização do estresse promovido pelo lactofen na cultura da soja.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Para as condições em que se desenvolveu a presente pesquisa, pode-se concluir que:

- o NO proporciona crescimento mais lento de plantas de soja submetidas ao lactofen;
- a injúria promovida pelo lactofen sobre folíolos jovens de plantas de soja é reduzida pelo NO;
- o NO protege plantas de soja contra o estresse oxidativo gerado pelo lactofen provavelmente por agir diretamente na eliminação das ERMO e não pela indução da atividade de enzimas antioxidantes;
- estudos mais avançados são necessários relativos à modulação da síntese do NO nos diferentes órgãos e compartimentos vegetais, bem como aos alvos moleculares das sinalizações promovidas pelo NO.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (UNESP, 2007)

ALDERTON, W.K., COOPER, C.E., KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, v.357, p.593-615, 2001.

AN, L., LIU, Y., ZHANG, M., CHEN, T., WANG, X. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. **J. Plant Physiol.**, v.162, p.317-26, 2005.

ANDERSON, J.A., PADHYE, S.R. Protein aggregation, radical scavenging capacity, and stability of hydrogen peroxide defense systems in heat-stressed vinca and sweet pea leaves. **J. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v.129, p.54-9, 2004.

ANDREWS, C.J., CUMMINS, I., SKIPSEY, M., GRUNDY, N.M., JEPSON, I., TOWNSON, J., EDWARDS, R. Purification and characterization of a family of glutathione transferases with roles in herbicide detoxification in soybean (*Glycine max* L.); selective enhancement by herbicides and herbicide safeners. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.82, p.205-19, 2005.

ANDREWS, C.J., SKIPSEY, M., TOWNSON, J.K., MORRIS, C., JEPSON, I., EDWARDS, R. Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. **Pestic. Sci.**, v.51, p.213-22, 1997.

APEL, K., HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.55, p.373-99, 2004.

ARASIMOWICZ, M.; FLORYSZAK-WIECZOREK, J. Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. **Plant Sci.**, v.172, p.876-87, 2007.

ARNON, D.I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiol.**, v.24, p.1-15, 1949.

ASADA, K. The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.50, p.601-39, 1999.

BAISAK, R., RANA, D., ACHARYA, P.B.B., KAR, M. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant Cell Physiol.**, v.35, p.489-95, 1994.

BAKER, C.J., ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.33, p.299-321, 1995.

BARROS, A.C., UEDA, A., SCHUMM, K.C. Eficiência e seletividade do lactofen em mistura com outros latifolicidas, no controle de plantas daninhas na cultura da soja. **Rev. Bras. Herb.**, v.1, p.79-84, 2000.

BARTELS, D., SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Crit. Rev. Plant Sci.**, v.24, p.23-58, 2005.

BARTOSZ, G. Oxidative stress in plants. **Acta Physiol. Plantarum**, v.19, p.47-64, 1997.

BATAK, I., DEVIC, M., GIBA, Z., GRUBISIC, D., POFF, K.L., KONJEVIC, R. The effects of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Seed Sci. Res.**, v.12, p.253-259, 2002.

BEAUCHAMP, C., FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and applicable to acrylamide gels. **Anal. Biochem.**, v.44, p.276-87, 1971.

BECANA, M., DALTON, D.A., MORAN, J.F., ITURBE-ORMAETXE, I., MATAMOROS, M.A., RUBIO, M.C. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiol. Plant.**, v.109, p.372-81, 2000.

BELIGNI, M.V., FATH, A., BETHKE, P.C., LAMATTINA, L., JONES, R.L. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. **Plant Physiol.**, v.129, p.1642-50, 2002.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Is nitric oxide toxic or protective? **Trends Plant Sci.**, v.4, p.299-300, 1999a.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.508-509, 2001.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, v.208, p.337-44, 1999b.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide in plants: the history is just beginning. **Plant Cell Environ.**, v.24, p.267-78, 2001.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide interferes with plant photooxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. **Plant Cell Environ.**, v.25, p.737-48, 2002.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide protects against cellular damage produced by methylviologen herbicides in potato plants. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v.3, p.199-208, 1999c.

BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. **Planta**, v.210, p.215-21, 2000.

BELIGNI, M.V., LAXALT, A., LAMATTINA, L. Putative role of nitric oxide in plant-pathogen interactions. In: INTERNATIONAL MEETING ON THE BIOLOGY OF NITRIC OXIDE, 5, 1997, Kyoto. **Proceedings...** London: Portland Press, 1997. p.250.

BERGER, S., BELL, E., SADKA, A., MULLET, J.E. *Arabidopsis thaliana* Atvsp is homologous to soybean VspA and VspB, genes encoding storage protein acid

phosphatases, and is regulated similarly by methyl jasmonate, wounding, sugars, light and phosphate. **Plant Mol. Biol.**, v.27, p.933-42, 1995.

BETHKE, P.C., BADGER, M.R., JONES, R.L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. **Plant Cell**, v.16, p.332-41, 2004a.

BETHKE, P.C., GUBLER, F., JACOBSEN, J.V., JONES, R.L. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. **Planta**, v.219, p.847-55, 2004b.

BETHKE, P.C., LIBOUREL, I.G.L., JONES, R.L. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.517-26, 2006.

BIGOT, A., FONTAINE, F., CLÉMENT, C., VAILLANT-GAVEAU, N. Effect of the herbicide flumioxazin on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Chemosphere**, v.67, p.1243-51, 2007.

BLAISE, C.R. Practical laboratory applications with micro-algae for hazard assessment of aquatic contaminants. In: RICHARDSON, M. (Ed). **Ecotoxicology Monitoring**. Weinheim: VCH, 1993. p.83-107.

BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E., FAGERSTEDT, K. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Ann. Bot.**, v.91, p.179-94, 2003.

BÖGER, P. Mode of action of herbicides affecting carotenogenesis. **J. Pestic. Sci.**, v.21, p.473-8, 1996.

BOLWELL, G.P. Role of reactive oxygen species and NO in plant defence responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.287-94, 1999.

BOLWELL, G.P., BUTT, V.S., DAVIES, D.R., ZIMMERLIN, A. The origin of the oxidative burst in plants. **Free Rad. Res.**, v.23, p.517-32, 1995.

BOR, M., ÖZDEMİR, F., TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Sci.**, v.164, p.77-84, 2003.

BOWLER, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.43, p.83-116, 1992.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v.72, p.248-54, 1976.

BREAUX, E.J., PANTANELLA, J.E., SANDERS, E.F. Chloroacetanilide herbicide selectivity: analysis of glutathione and homoglutathione in tolerant, susceptible, and safened seedlings. **J. Agric. Food Chem.**, v.35, p.474-8, 1987.

BROWN, H.M., NEIGHBORS, S.M. Soybean metabolism of chlorimuron ethyl: physiological basis for soybean selectivity. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.29, p.112-20, 1987.

CAKMAK, I., HORST, W.J. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). **Physiol. Plant.**, v.83, p.463-8, 1991.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: EVERSE, J., EVERSE, K.E., GRISHAM, M.B. (Eds). **Peroxidases in chemistry and biology**. Boca Raton: CRC Press, 1991. p.25-50.

CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure function and regulation on bridging to gap between biochemistry and physiology. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.50, p.277-303, 1999.

CARO, A., PUNTARULO, S. Nitric oxide decreases superoxide anion generation by microsomes from soybean embryonic axes. **Physiol. Plant.**, v.104, p.357-64, 1998.

CARO, A., PUNTARULO, S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. **Free Radic. Res.**, v.31, S205-S212, 1999.

CARVALHO, F.T., GALBIATTI JUNIOR, W., CAVAZZANA, M.A. Eficiência do herbicida sulfentrazone no controle, em pré-emergência, de plantas daninhas em soja. **Rev. Bras. Herbic.**, v.1, p.33-7, 2000.

CARVALHO, J.C. Mecanismo de ação dos herbicidas e sua relação com a resistência a herbicidas. In: CHRISTOFFOLETI, P.J. (Ed). **Aspectos de Resistência de Plantas Daninhas a Herbicidas**. Londrina: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2003. p.22-44.

CASTILLO, F.J., PENEL, C., GREPPIN, H. Peroxidase release induced by ozone in *Sedum album* leaves. **Plant Physiol.**, v.74, p.846-51, 1984.

CATANEO, A.C., CHAMMA, K.L., FERREIRA, L.C., DÉSTRO, G.F.G., CARVALHO, J.C., NOVELLI, E.L.B. Glutathione S-transferase activity in acetochlor, atrazine and oxyfluorfen metabolization in maize (*Zea mays* L.), sorghum (*Sorghum bicolor* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) (Poaceae). **Acta Sci.**, v.24, p.619-23, 2002.

CATANEO, A.C., CHAMMA, K.L., FERREIRA, L.C., DÉSTRO, G.F.G., SOUSA, D.C.F. Atividade de superóxido dismutase em plantas de soja (*Glycine max* L.) cultivadas sob estresse oxidativo causado por herbicida. **Rev. Bras. Herbic.**, v.4, p.23-31, 2005.

CATANEO, A.C., DÉSTRO, G.F.G., FERREIRA, L.C., CHAMMA, K.L., SOUSA, D.C.F. Atividade de glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v.21, p.307-12, 2003.

CHENG, F.Y., HSU, S.Y., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of detached rice leaves induced by dehydration and polyethylene glycol but not by sorbitol. **Plant Growth Regul.**, v.38, p.265-72, 2002.

CHI YU, C., HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.162, p.1319-30, 2005.

CHOI, J.S., LEE, H.J., HWANG, I.T., PYON, J.Y., CHO, K.Y. Differential susceptibilities of wheat and barley to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.65, p.62-72, 1999.

CHORY, J., REINECKE, D., SIM, S., WASHBURN, T., BRENNER, M. A role for cytokinins in de-etiolation of *Arabidopsis.det* mutants have an altered response to cytokinins. **Plant Physiol.**, v.104, p.339-47, 1994.

CLARK, D., DURNER, J., NAVARRE, D.A., KLESSIG, D.F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.13, p.1380-4, 2000.

CONSTANTIN, J., OLIVEIRA JUNIOR, R.S., MACIEL, C.D.G. Avaliação de misturas em tanque de imazethapyr com outros herbicidas para o controle de *Bidens pilosa* e *Euphorbia heterophylla* em soja. **Rev. Bras. Herbic.**, v.1, p.73-8, 2000.

COONEY, R.V., HARWOOD, P.J., CUSTER, L.J., FRANKE, A.A. Light-mediated conversion of nitrogen dioxide to nitric oxide by carotenoids. **Environ. Health Perspec.**, v.102, p.460-2, 1994.

CORPAS, F.J., BARROSO, J.B., DEL RÍO, L.A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.145-50, 2001.

CORREA-ARAGUNDE, N., GRAZIANO, M., LAMATTINA, L. Nitric oxide plays a central role in determining lateral root development in tomato. **Planta**, v.218, p.900-5, 2004.

COUDERCHET, M., VERNET, G. Pigments as biomarkers of exposure to the vineyard herbicide flazasulfuron in freshwater algae. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.55, p.271-7, 2003.

COUÉE, I., SULMON, C., GOUESBET, G., EL AMRANI, A. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.449-59, 2006.

CREPALDI, I.C., ALMEIDA-MURADIAN, L.B., RIOS, M.D.G., PENTEADO, M.V.C., SALATINO, A. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Rev. Bras. Bot.**, v.24, p.155-159, 2001.

CREUS, C.M., GRAZIANO, M., CASANOVAS, E.M., PEREYRA, M.A., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., BARASSI, C.A., LAMATTINA, L. Nitric oxide is involved in the *Azoospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. **Planta**, v.221, p.297-303, 2005.

CUETO, M., HERNANDEZ-PERERA, O., MARTIN, R., BENTURA, M.L., RODRIGO, J., LAMAS, S., GOLVANO, M.P. Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. **FEBS Lett.**, v.398, p.159-64, 1996.

DALL'AGNOL, A. Prefácio. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SOJA, 4, 2006, Londrina. **Resumos...** Londrina: Embrapa Soja, 2006. p.5.

DAMIÃO FILHO, C.E., CORSO, G.M., ANDRADE, V.M.M. Efeitos do herbicida lactofen sobre três cultivares de soja. I. Alterações morfológicas externas e internas das folhas. **Planta Daninha**, v.10, p.17-24, 1992.

DAT, J.F., VANDENABEELE, S., VRANOVA, E., VAN MONTAGU, M., INZE, D., VAN BREUSEGEM, F. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cell Mol. Life Sci.**, v.57, p.779-95, 2000.

DAVIS, D.G., SWANSON, H.R. Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Environ. Exp. Bot.**, v.46, p.95-108, 2001.

DE GARA, L., PINTO, M.C., TOMMASI, F. The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.863-70, 2003.

DE VOS, C.H.R., SHAT, H., VOOIJS, R., ERNST, W.H.O. Copper induced damage to permeability barrier in roots of *Silene cucubalus*. **Plant Physiol.**, v.135, p.165-9, 1989.

DEAN, J.V., HARPER, J.E. The conversion of nitrite to nitrogen oxide(s) by the constitutive NAD(P)H-nitrate reductase enzyme from soybean. **Plant Physiol.**, v.88, p.389-95, 1988.

DEL RÍO, L.A., CORPAS, F.J., BARROSO, J.B. Nitric oxide and nitric oxide synthase activity in plants. **Phytochemistry**, v.65, p.783-92, 2004.

DEL RÍO, L.A., PALMA, J.M., SANDALIO, L.M., CORPAS, F.J., PASTORI, G.M., BUENO, P., LÓPEZ-HUERTAS, E. Peroxisomes as a source of superoxide and hydrogen peroxide in stressed plants. **Biochem. Soc. Trans.**, v.24, p.434-8, 1996.

DEL RÍO, L.A., SANDALIO, L.M., PALMA, J.M., BUENO, P., CORPAS, F.J. Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. **Free Rad. Biol. Med.**, v.13, p.557-80, 1992.

DELLEDONNE, M., MURGIA, I., EDERLE, D., SBICEGO, P.F., BIODANI, A., POLVERARI, A., LAMB, C. Reactive oxygen intermediates modulate nitric oxide signaling in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p. 605-10, 2002.

DELLEDONNE, M., XIA, Y., DIXON, R.A., LAMB, C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. **Nature**, v.394, p.585-8, 1998.

DELLEDONNE, M., ZEIER, J., MAROCCO, A., LAMB, C. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease-resistance response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.13454-9, 2001.

DEPKA, B., JAHNS, P., TREBST, A. β -Carotene to zeaxanthin conversion in the rapid turnover of the D1 protein of photosystem II. **FEBS Lett.**, v.424, p.267-70, 1998.

DESIKAN, R., HANCOCK, J.T., COFFEY, M.J., NEILL, N.J. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. **FEBS Lett.**, v.382, p.213-7, 1996.

DESIKAN, R., MACKERNESS, S.A.H., HANCOCK, J.T., NEILL, S.J. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. **Plant Physiol.**, v.127, p.159-72, 2001.

DESIKAN, R., REYNOLDS, A., HANCOCK, J.T., NEILL, S.J. Harpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on defence gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochem. J.**, v.330, p.115-20, 1998.

DEUBER, R. **Ciência das plantas daninhas: fundamentos**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 431p.

DEVINE, M., DUKE, S.O., FEDTKE, C. **Physiology of herbicide action**. New Jersey: Englewood Cliffs, 1993. 441p.

DÍAZ, M., ACHKOR, H., TITARENKO, E., MARTÍNEZ, M.C. The gene encoding glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/GSNO reductase is responsive to wounding, jasmonic acid and salicylic acid. **FEBS Lett.**, v.543, p.136-9, 2003.

DOBASHI, K., PAHAN, K., CHAHAL, A., SINGH, I. Modulation of endogenous antioxidant enzymes by nitric oxide in rat C6 glial cells. **J. Neurochem.**, v.68, p.1896-1903, 1997.

DODGE, A. Herbicide action and effects on detoxification processes. In: FOYER, C.H., MULLINEAUX, P.M. (Eds). **Causes of photoactive stress and amelioration of defense systems in plants**. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.219-36.

DOUDICAN, N.A., SONG, B., SHADEL, G.S., DOETSCH, P.W. Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v.25, p.5196-204, 2005.

DROOG, F.N.J., HOOYKAAS, P.J.J., VAN DER ZAAL, B.J. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated type-III tobacco glutathione S-transferases. **Plant Physiol.**, v.107, p.1139-46, 1995.

DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REDERS, P.A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Anal. Chem.**, v.28, p.350-6, 1956.

DUKE, S.O., LYDON, J., BECERRIL, J.M., SHERMAN, T.D., LEHNEN JUNIOR, L.P., MATSUMOTO, H. Protoporphyrinogen oxidase-inhibiting herbicides. **Weed Sci.**, v.39, p.465-473, 1991.

DURNER, J., KLESSIG, D.F. Nitric oxide as a signal in plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.369-74, 1999.

DURNER, J., WENDEHENNE, D., KLESSIG, D.F. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.95, p.10328-3, 1998.

EDWARDS, R., DIXON, D.P. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism. In: COBB, A.H., KIRKWOOD, R.C. (Eds). **Herbicides and their mechanisms of action**. Sheffield: Sheffield Academic Press, 2000. p.33-71.

EKLER, Z., DUTKA, F., STEPHENSON, G.R. Safener effects on acetochlor toxicity, uptake, metabolism and glutathione S-transferase activity in maize. **Weed Res.**, v.33, p.311-8, 1993.

ELSTNER, E.F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.33, p.73-96, 1982.

EMBRAPA SOJA. **Tecnologias de produção de soja**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/control.htm>>. Acesso em: 11 jun. 2007.

FEECHAN, A., KWON, E., YUN, B.W., WANG, Y., PALLAS, J.A., LOAKE, G.J. A central role for S-nitrosothiols in plant disease resistance. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.22, p.8054-9, 2005.

FEIERABEND, J., SCHAAN, C., HERTWIG, B. Photoinactivation of catalase occurs under both high- and low-temperature stress conditions and accompanies photoinhibition of photosystem II. **Plant Physiol.**, v.100, p.1554-61, 1992.

FERREIRA, A.L.A., MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil**, v.43, p.61-8, 1997.

FERRER, M.A., ROS BARCELO, A. Differential effects of nitric oxide on peroxidase and H₂O₂ production by the xylem of *Zinnia elegans*. **Plant Cell Environ.**, v.22, p.891-7, 1999.

FIRESTONE, M.K., DAVIDSON, E.A. Microbiological basis of NO and N₂O production and consumption in soil. In: ANDREAE, M.O., SCHIMEL, D.S. (Eds). **Exchange of trace gases between terrestrial ecosystems and the atmosphere**. Chichester: Wiley, 1989. p.7-21.

FLORYSZAK-WIECZOREK, J., MILCZAREK, G., ARASIMOWICZ, M., CISZEWSKI, A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? **Planta**, v.224, p.1363-72, 2006.

FLURY, T., KREUZ, K., WAGNER, E. H₂O₂ generation and the influence of antioxidants during the 2,3,5-triiodobenzoic acid-mediated induction of glutathione S-transferase in soybean. **Phytochemistry**, v.49, p.37-41, 1998.

FOOTE, C.S., SHOOK, F.C., ABAKERLI, R.B. Characterization of singlet oxygen. **Methods Enzymol.**, v.105, p.36-47, 1984.

FOYER, C. Ascorbic acid. In: ALSCHER, R.G., HESS, J.L. (Eds). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p. 31-58.

FOYER, C.H., DESCOURVIERES, P., KUNERT, K.J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. *Plant Cell Environ.*, v.17, p.507-523, 1994a.

FOYER, C.H., LELANDAIS, M., KUNERT, K.J. Photooxidative stress in plants. ***Physiol. Plant.***, v.92, p.696-717, 1994b.

FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F., SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. ***Physiol. Plant.***, v.100, p.241-54, 1997.

FOYER, C.H., MULLINEAUX, P.M. **Causes of photooxidative stress and amelioration of defense systems in plants.** Boca Raton: CRC Press, 1994. 395p.

FOYER, C.H., NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. ***Plant Cell Environ.***, v.28, p.1056-71, 2005.

FREAR, D.S., SWANSON, H.R., MANSAGER, E.R. Acifluorfen metabolism in soybean: diphenylether bond cleavage and the formation of homogluthathione, cysteine, and glucose conjugates. ***Pestic. Biochem. Physiol.***, v.20, p.299-310, 1983.

FREAR, D.S., SWANSON, H.R., MANSAGER, E.R. Alternate pathways of metribuzin metabolism in soybean: formation of *N*-glucoside and homogluthathione conjugates. ***Pestic. Biochem. Physiol.***, v.23, p.56-65, 1985.

GABALDON, C., GOMEZ ROS, L.V., PEDRENO, M.A., ROS BARCELO, A. Nitric oxide production by the differentiating xylem of *Zinnia elegans*. ***New Phytol.***, v.165, p.121-130, 2005.

GARCIA-MATA, C., GAY, R., SOKOLOVSKI, S., HILLS, A., LAMATTINA, L., BLATT, M.R. Nitric oxide regulates K⁺ and Cl⁻ channels in guard cells through a subset of abscisic acid-evoked signaling pathways. ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, v.100, p.11116-21, 2003.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? **Trends Plant Sci.**, v.8, p.20-6, 2003.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.790-2, 2002.

GARCIA-MATA, C., LAMATTINA, L. Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiol.**, v.126, p.1196-204, 2001.

GECHEV, T.S., VAN BREUSEGEM, F., STONE, J.M., DENEV, I., LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **BioEssays**, v.28, p.1091-101, 2006.

GEOFFROY, L., COUDERCHET, M., VERNET, G. Effet du diuron, de l'oxyfluorène et du cuivre sur l'activité catalasique de *Scenedesmus obliquus*. In: COUDERCHET, M., EULLAFFROY, P., VERNET, G. (Eds). **Produits phytosanitaires**. Reims: Presses Universitaires de Reims, 2001. p.157-66.

GEOFFROY, L., FRANKART, C., EULLAFFROY, P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environ. Pollut.**, v.131, p.233-41, 2004.

GIAGRO. **Cobra**. Disponível em: <<http://www.giagro.com.br>>. Acesso em: 04 mai. 2007.

GIARDI, M.T., MASOJIDEK, J., GODDE, D. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D₁ reaction centre II protein. **Physiol. Plant.**, v.101, p.635-42, 1997.

GIBA, Z. The effect of NO-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of empress tree seed. **Plant Growth Regul.**, v.26, p.175-81, 1998.

GIBA, Z., GRUBISIC, D., TODOROVIC, S., SAJC, L., STOJAKOVIC, D., KONJEVIC, T. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. **Plant Growth Regul.**, v.26, p.175-81, 1998.

GOULD, K.S., LAMOTTE, O., KLINGUER, A., PUGIN, A., WENDEHENNE, D. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? **Plant Cell Environ.**, v.26, p.1851-62, 2003.

GOUVÊA, C.M.C.P., SOUZA, J.F., MAGALHÃES, C.A.N., MARTINS, I.S. NO-releasing substances that induce growth elongation in maize root segments. **Plant Growth Regul.**, v.21, p.183-7, 1997.

GRONWALD, J.W., PLAISANCE, K.L. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. **Plant Physiol.**, v.117, p.877-92, 1998.

GROSSMAN, K., KWIATKOWSKI, S., TRESCH, S. Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). **J. Exp. Bot.**, v.52, p.1811-6, 2001.

GRÜN, S., LINDERMAYR, C., SELL, S., DURNER, J. Nitric oxide and gene regulation in plants. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.507-16, 2006.

GUO, F.Q., OKAMOTO, M., CRAWFORD, N.M. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. **Science**, v.302, p.100-3, 2003.

GUPTA, I., TRIPATHY, B.C. Oxidative stress in cucumber (*Cucumis sativus* L.) seedlings treated with acifluorfen. **Z. Naturforsch.**, v.54C, p.771-81, 1999.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford: Oxford University Press, 2000.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. **Biochem. J.**, v.219, p.1-14, 1984.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease. An overview. **Methods Enzymol.**, v.186, p.1-85, 1990.

HANCOCK, J.T., DESIKAN, R., CLARKE, A., HURST, R.D., NEILL, S.J. Cell signaling following plant/pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.611-7, 2002.

HAVAUX, M. Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. **Trends Plant Sci.**, v.3, p.147-51, 1998.

HAVAUX, M., BONFILS, J.P., LÜTZ, C., NIYOGI, K.K. Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the *npq1 Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophylls cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. **Plant Physiol.**, v.124, p.273-84, 2000.

HAYNES, R.J., SHERLOCK, R.R. Gaseous losses of nitrogen. In: HAYNES, R.J. (Ed). **Mineral nitrogen in the plant-soil system.** Academia Press, 1986. p.242-302.

HE, Y., TANG, R.H., HAO, Y., STEVENS, R.D., COOK, C.W., AHN, S.M., JING, L., YANG, Z., CHEN, L., GUO, F., FIORANI, F., JACKSON, R.B., CRAWFORD, N.M., PEI, Z.M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. **Science**, v.305, p.1968-71, 2004.

HEATH, R.L., PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetic and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.125, p.189-98, 1968.

HÉROUART, D., BAUDOUIN, E., FRENDO, P., HARRISON, J., SANTOS, R., JAMET, A., VAN DE SYPE, G., TOUATI, D., PUPPO, A. Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume-*Rhizobium* symbiosis? **Plant Physiol. Biochem.**, v. 40, p.619-24, 2002.

HERTWIG, B., STREB, P., FEIERABEND, J. Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. **Plant Physiol.**, v.100, p.1547-53, 1992.

HESS, D.T., MATSUMOTO, A., KIM, S.O., MARSHALL, H.E., STAMLER, J.S. Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v.2, p.150-66, 2005.

HESS, F.D. Light-dependent herbicides: a review. **Weed Sci.**, v.48, p.160-70, 2000.

HIRABAYASHI, J. On the origin of elementary hexoses. **Q. Rev. Biol.**, v.71, p.365-80, 1996.

HOGG, N., KALYANARAMAN, B., JOSEPH, J., STRUCK, A., PARTHASARATHY, S. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. **FEBS Lett.**, v.334, p.170-4, 1993.

HSU, Y.T., KAO, C.H. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **Plant Growth Regul.**, v.42, p. 227-38, 2004.

HU, X., NEILL, S., TANG, Z., CAI, W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. **Plant Physiol.**, v.137, p.663-70, 2005.

HUANG, X., KIEFER, E., VON RAD, U., ERNST, D., FOISSNER, I., DURNER, J. Nitric oxide burst and nitric oxide-dependent gene induction in plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.40, p.625-31, 2002a.

HUANG, X., STETTMAIER, K., MICHEL, C., HUTZLER, P., MUELLER, M.J., DURNER, J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signalling in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, v.218, p.938-46, 2004.

HUANG, X., VON RAD, U., DURNER, J. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. **Planta**, v.215, p.914-23, 2002b.

HUBER, S.C., HARDIN, S.C. Numerous post-translational modifications provide opportunities for the intricate regulation of metabolic enzymes at multiple levels. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.3, p.318-22, 2004.

HUMBECK, K., RÖMER, S., SENGER, H. Evidence for an essential role of carotenoids in the assembly of an active photosystem II. **Planta**, v.179, p.242-50, 1989.

HUNG, K.T., CHANG, C.J., KAO, C.H. Paraquat toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.159, p.159-66, 2002.

HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. **J. Plant Physiol.**, v.161, p.43-52, 2004.

HUNG, K.T., KAO, C.H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. **J. Plant Physiol.**, v.160, p.871-9, 2003.

IANNELLI, A.M., VAN BREUSEGEM, F., VAN MONTAGU, M., INZE, D., MASSACCI, A. Tolerance to low temperature and paraquat-mediated oxidative stress in two maize genotypes. **J. Exp. Bot.**, v.50, p.523-32, 1999.

IUBMB. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology**. Enzyme nomenclature – EC 1.11.1.7. (Peroxidase). Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC1/11/1/7.html>>. Acesso em: 25 jun. 2007.

JEPSON, I., LAY, V.J., HOLT, D.C., BRIGHT, S.W.J., GREENLAND, A.J. Cloning and characterization of maize herbicide safener-induced cDNAs encoding subunits of glutathione S-transferase isoforms I, II and IV. **Plant Mol. Biol.**, v.26, p.1855-66, 1994.

JUNG, S., KIM, J.S., CHO, K.Y., KANG, B.G. Changes in the pools of carotenoids and protochlorophyll(ide) in etiolated cucumber (*Cucumis sativus*) cotyledons treated with norflurazon and KC 6361. **Photosynthetica**, v.36, p.361-73, 1999.

KANA, R., SPUNDOVÁ, M., ILÍK, P., LAZÁR, D., KLEM, K., TOMEK, P., NAUS, J., PRÁŠIL, O. Effect of herbicide clomazone on photosynthetic processes in primary barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.78, p.161-70, 2004.

KELLOGG, E.W., FRIDOVICH, I. Superoxide, hydrogen peroxide, and singlet oxygen in lipid peroxidation by xanthine oxidase system. **J. Biol. Chem.**, v.250, p.8812-7, 1975.

KIM, J.S., YUN, B.W., CHOI, J.S., KIM, T.J., KWAK, S.S., CHO, K.Y. Death mechanisms caused by carotenoid biosynthesis inhibitors in green and in undeveloped plant tissues. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.78, p.127-39, 2004.

KIM, Y.S., HAN, S. Nitric oxide protects Cu,Zn-superoxide dismutase from hydrogen peroxide-induced inactivation. **FEBS Lett.**, v.479, p.25-8, 2000.

KISSMANN, K.G. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas**. Disponível em: <http://www.hrac-br.com.br/arquivos/texto_resistencia_herbicidas.doc>. Acesso em: 01 mai. 2003.

KLEPPER, L. Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. **Atmos. Environ.**, v.13, p.537-42, 1979.

KLESSIG, D.F., DURNER, J., NOAD, R., NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., KUMAR, D., ZHOU, J.M., SHAH, J., ZHAUD, S., KACHROO, P., TRIFA, Y., PONTIER, D., LAM, E., SILVA, H. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.97, p.8849-55, 2000.

KLESSIG, D.F., MALAMY, J. The salicylic acid signal in plants. **Plant Mol. Biol.**, v.26, p.1439-58, 1994.

KNÖRZER, O.C., DURNER, J., BÖGER, P. Alterations in the antioxidative system of suspension-cultured soybean cells (*Glycine max*) induced by oxidative stress. **Physiol. Plant.**, v.97, p.388-96, 1996.

KNOWLES, R.G., MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem. J.**, v.298, p.249-58, 1994.

KNOX, J.P., DODGE, A.D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v.24, p.889-96, 1985.

KOCH, K.E. Carbohydrate-modulated gene expression in plants. **Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.47, p.509-40, 1996.

KONO, Y., FRIDOVICH, I. Superoxide radical inhibits catalase. **J. Biol. Chem.**, v.257, p.5751-4, 1982.

KOPYRA, M., GWÓZDZ, F.A. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. **Plant Physiol. Biochem.**, v.41, p.1011-7, 2003.

KRAUS, T.E., FLETCHER, R.A. Paclobutrazol protects wheat seedlings from heat and paraquat injury. Is detoxification of active oxygen involved? **Plant Cell Physiol.**, v.35, p.45-52, 1994.

LAMATTINA, L., GARCIA-MATA, C., GRAZIANO, M., PAGNUSSAT, G. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.54, p.109-36, 2003.

LAMB, C., DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.48, p.251-75, 1997.

LAMOTTE, O., COURTOIS, C., DOBROWOLSKA, G., BESSON, A., PUGIN, A., WENDEHENNE, D. Mechanism of nitric-oxide-induced increase of free cytosolic Ca²⁺ concentration in *Nicotiana plumbaginifolia* cells. **Free Radic. Biol. Med.**, v.40, p.1369-76, 2006.

LAMOTTE, O., GOULD, K., LECOURIEUX, D., SEQUEIRA-LEGRAND, A., LEBRUN-GARCIA, A., DURNER, J., PUGIN, A., WENDEHENNE, D. Analysis of nitric oxide signalling functions in tobacco cells challenged by the elicitor cryptogein. **Plant Physiol.**, v.135, p.516-30, 2004.

LAMOUREUX, G.L., RUSNESS, D.G. Propachlor metabolism in soybean plants, excised soybean tissues and soil. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.34, p.187-204, 1989.

LASPINA, N.V., GROPPA, M.D., TOMARO, M.L., BENAVIDES, M.P. Nitric oxide protects sunflower leaves against Cd-induced oxidative stress. **Plant Sci.**, v.169, p.323-30, 2005.

LAXALT, A., BELIGNI, M.V., LAMATTINA, L. Nitric oxide preserves the level of chlorophyll in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. **Eur. J. Plant Pathol.**, v.73, p.643-51, 1997.

LESHEM, Y.Y. Nitric oxide in biological systems. **Plant Growth Regul.**, v.18, p.155-9, 1996.

LESHEM, Y.Y. **Nitric oxide in Plants. Occurrence, Function and Use.** Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000. 154p.

LESHEM, Y.Y., HARAMATY, E. Plant ageing: the emission of NO and ethylene and effect of NO-releasing compounds on growth of pea (*Pisum sativum*) foliage. **J. Plant Physiol.**, v.148, p.258-63, 1996.

LESHEM, Y.Y., WILLS, R.B.H., KU, V.V.V. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. **Plant Physiol. Biochem.**, v.36, p.825-33, 1998.

LEVINE, A., PENNELL, R.I., ALVAREZ, M.E., PALMER, R., LAMB, C. Calcium-mediated apoptosis in a plant hypersensitive disease resistance response. **Curr. Biol.**, v.6, p.427-37, 1996.

LEVINE, A., TENHAKEN, R., DIXON, R., LAMB, C. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. **Cell**, v.79, p.583-93, 1994.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods Enzymol.**, v.148, p.350-82, 1987.

LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., BAHNWEG, G., DURNER, J. Differential inhibition of *Arabidopsis* methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. **J. Biol. Chem.**, v.281, p.4285-91, 2006.

LINDERMAYR, C., SAALBACH, G., DURNER, J. Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiol.**, v.137, p.921-30, 2005.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas: plantio direto e convencional**. 5. ed. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2000. 339p.

MACKERNESS, S.A.H., JOHN, C.F., JORDAN, B., THOMAS, B. Early signaling components in ultraviolet-B responses: distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **FEBS Lett.**, v.489, p.237-42, 2001.

MAGALHÃES, J.R., PEDROSO, M.C., DURZAN, D.J. Nitric oxide, apoptosis and plant stresses. **Physiol. Plant Mol. Biol.**, v. 5, p.115-25, 1999.

MALANGA, G., PUNTARULO, S. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. **Physiol. Plant.**, v.94, p.672-9, 1995.

MANNERVIK, B., GUTHENBERG, C. Glutathione transferases (human placenta). **Methods Enzymol.**, v.77, p.231-5, 1981.

MARKGRAF, T., OELMÜLLER, R. Evidence that carotenoids are required for the accumulation of a functional photosystem II, but not photosystem I in the cotyledons of mustard seedlings. **Planta**, v.185, p.97-104, 1991.

MARRS, K.A. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.47, p.127-58, 1996.

MATRINGE, M., CAMADRO, J.M., LABBE, P., SCALLA, R. Protoporphyrinogen oxidase as a molecule target for diphenyl ether herbicides. **Biochem. J.**, v.260, p.231, 1989.

MAYFIELD, S.P., TAYLOR, W.C. Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll *a/b* binding protein (LHCP) mRNA. **Eur. J. Biochem.**, v.144, p.79-84, 1984.

MEROTTO JUNIOR, A., VIDAL, R.A. Herbicidas inibidores de PROTOX. In: VIDAL, R.A., MEROTTO JUNIOR, A. (Eds). **Herbicidologia**. Porto Alegre: Evangraf, 2001. p.69-86.

MILLAR, A.H., DAY, D.A. Alternative solutions to radical problems. **Trends Plant Sci.**, v.2, p.289-90, 1997.

MILLAR, T.M., STEVENS, C.R., BLAKE, D.R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. **Biochem. Soc. Trans.**, v.25, p.528, 1997.

MISHRA, N.P., FATMA, T., SINGHAL, J.S. Development of antioxidative defence system of wheat seedlings in response to high light. **Physiol. Plant.**, v.95, p.77-82, 1995.

MISRA, N., GUPTA, A.K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **J. Plant Physiol.**, v.163, p.11-8, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Sci.**, v.7, p.405-10, 2002.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., GOLLERY, M., VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Sci.**, v.9, p.490-8, 2004.

MOALEM-BENO, D., TAMARI, G., LEITNER-DAGAN, Y., BOROCHOV, A., WEISS, D. Sugar-dependent gibberellin-induced chalcone synthase gene expression in *Petunia* corollas. **Plant Physiol.**, v.113, p.419-24, 1997.

MODOLO, L.V., AUGUSTO, O., ALMEIDA, I.M.G., MAGALHÃES, J.R., SALGADO, I. Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. **FEBS Lett.**, v.579, p.3814-20, 2005.

MODOLO, L.V., AUGUSTO, O., ALMEIDA, I.M.G., PINTO-MAGLIO, C.A.F., OLIVEIRA, H.C., SELIGMAN, K., SALGADO, I. Decreased arginine and nitrite levels in nitrate reductase-deficient *Arabidopsis thaliana* plants impair nitric oxide synthesis and the hypersensitive response to *Pseudomonas syringae*. **Plant Sci.**, v.171, p.34-40, 2006.

MODOLO, L.V., CUNHA, F.Q., BRAGA, M.R., SALGADO, I. Nitric oxide synthase-mediated phytoalexin accumulation in soybean cotyledons in response to the *Diaporthe phaseolorum f. sp. meridionalis* elicitor. **Plant Physiol.**, v.130, p.1288-97, 2002.

MOLLER, I.M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.52, p.561-91, 2001.

MOLLER, I.M., JENSEN, P.E., HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v.58, p.459-81, 2007.

MORELAND, D.E. Biochemical mechanisms of action of herbicides and the impact of biotechnology on the development of herbicides. **J. Pestic. Sci.**, v.24, p.299-307, 1999.

MURAD, F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. **J. Clin. Invest.**, v.78, p.1-5, 1986.

MURGIA, I., DELLEDONNE, M., SOAVE, C. Nitric oxide mediates iron-induced ferritin accumulation in *Arabidopsis*. **Plant J.**, v. 30, p.521-8, 2002.

MURGIA, I., TARANTINO, D., VANNINI, C., BRACALE, M., CARRAVIERI, S., SOAVE, C. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylacoidal ascorbate

peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photo-oxidative stress to nitric oxide-induced cell death. **Plant J.**, v.38, p.940-53, 2004.

NAVARI-IZZO, F., IZZO, R. Induction of enzyme activities and antioxidant production in barley plants as a result of SO₂ fumigation. **Plant Sci.**, v.96, p.31-40, 1994.

NAVARI-IZZO, F., PINZINO, C., QUARTACCI, M.F., SGHERRI, C.L.M. Superoxide and hydroxyl radical generation, and superoxide dismutase in PSII membrane fragments from wheat. **Free Rad. Res.**, v.31 (supplement), p.3-9, 1999.

NAVARRE, D.A., WENDEHENNE, D., DURNER, J., NOAD, R., KLESSIG, D.F. Nitric oxide modulates the activity of tobacco aconitase. **Plant Physiol.**, v.122, p.573-82, 2000.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., CLARKE, A., HANCOCK, J.T. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. **Plant Physiol.**, v.128, p.13-6, 2002.

NEILL, S.J., DESIKAN, R., HANCOCK, J.T. Nitric oxide signaling in plants. **New Phytol.**, v.159, p.11-35, 2003.

NEMAT ALLA, M.M., HASSAN, N.M. Changes of antioxidants levels in two maize lines following atrazine treatments. **Plant Physiol. Biochem.**, v.44, p.202-10, 2006.

NINNEMANN, H., MAIER, J. Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. **Photochem. Photobiol.**, v.64, p.393-398, 1996.

NIYOGI, K.K., SHIH, C., CHOW, W.S., POGSON, B.J., DELLAPENNA, D., BJÖRKMAN, O. Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. **Photosynth. Res.**, v.67, p.139-45, 2001.

NOCTOR, G., FOYER, C. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen species under control. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.49, p.249-79, 1998.

NORITAKE, T., KAWAKITA, K., DOKE, N. Nitric oxide induces phytoalexin accumulation in potato tuber tissues. **Plant Cell Physiol.**, v.37, p.113-6, 1996.

NUNOSHIBA, T., DE-ROJAS-WALKER, T., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R., DEMPLE, B. Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.9993-7, 1993.

OELMÜLLER, R. Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. **Photochem. Photobiol.**, v.49, p.229-39, 1989.

OROZCO-CÁRDENAS, M., RYAN, C.A. Nitric oxide negatively modulates wound signaling in tomato plants. **Plant Physiol.**, v.130, p.487-93, 2002.

ÖTVÖS, K., PASTERNAK, T.P., MISKOLEZI, P., DOMOKI, M., DORJGOTOV, D., SZUES, A., BOTTKA, S., DUDITS, D., FEHER, A. Nitric oxide is required for, and promotes auxin-mediated activation of cell division and embryogenic cell formation but does not influence cell cycle progression in alfalfa cell cultures. **Plant J.**, v.43, p.849-60, 2005.

OUARITI, O., BOUSSAMA, N., ZARROUK, M., CHERIF, A., GHORBAL, M.H. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membranes lipids. **Phytochemistry**, v.45, p.1343-50, 1997.

OWEN, W.J. Herbicide metabolism as a basis for selectivity. In: ROBERTS, T. (Ed). **Metabolism of agrochemicals in plants**. Chichester: Wiley, 2000. p.211-58.

PAGNUSSAT, G.C., LANTERI, M.L., LAMATTINA, L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. **Plant Physiol.**, v.132, p.1241-8, 2003.

PAGNUSSAT, G.C., SIMONTACCHI, M., PUNTARULO, S., LAMATTINA, L. Nitric oxide is required for root organogenesis. **Plant Physiol.**, v.129, p.954-6, 2002.

PALLET, K.E., YOUNG, A.J. Carotenoids. In: ALSCHER, R.G., HESS, J.L. (Eds). **Antioxidants in higher plants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.91-110.

PANDOLFINI, T., GABBRIELLI, R.R., COMPARINI, C. Nickel toxicity and peroxidase activity in seedlings of *Triticum aestivum* L. **Plant Cell Environ.**, v.15, p.719-25, 1992.

PEDROSO, M.C., MAGALHÃES, J.R., DURZAN, D. A nitric oxide burst precedes apoptosis in angiosperm and gymnosperm callus cells and foliar tissues. **J. Exp. Bot.**, v.51, p.1027-36, 2000a.

PEDROSO, M.C., MAGALHÃES, J.R., DURZAN, D. Nitric oxide induces cell death in *Taxus* cells. **Plant Sci.**, v.157, p.173-80, 2000b.

PEGO, J.V., KORTSTEE, A.J., HUIJSER, C., SMEEKENS, S. Photosynthesis, sugars and the regulation of gene expression. **J. Exp. Bot.**, v.51, p.407-16, 2000.

PERAZZOLLI, M., DOMINICI, P., ROMERO-PUERTAS, M.C., ZAGO, E.D., ZEIER, J., SONODA, M., LAMB, C., DELLEDONNE, M. *Arabidopsis* non-symbiotic haemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. **Plant Cell**, v.16, p.1-10, 2004.

PERAZZOLLI, M., ROMERO-PUERTAS, M.C., DELLEDONNE, M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.479-88, 2006.

PFEIFFER, S., JANISTYN, B., JESSNER, G., PICHORNER, H., EBERMANN, R. Gaseous nitric oxide stimulates guanosine-3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) formation in spruce needles. **Phytochemistry**, v.36, p.259-62, 1994.

PFEIFFER, S., JANISTYN, B., SOJA, G., KOESLING, D., MAYER, B., EBERMANN, R. Detection of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase in higher plants. **J. Endothel. Cell Res.**, v.3, [Abstract 66], 1995.

PINTO, M.C., TOMMASI, F., GARA, I. Changes in the antioxidant systems as part of the signaling pathway responsible for the programmed cell death activated by nitric oxide and reactive oxygen species in tobacco Bright-Yellow 2 cells. **Plant Physiol.**, v.130, p.698-708, 2002.

POLIDOROS, A.N., SCANDALIOS, J.G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiol. Plant.**, v.106, p.112-20, 1999.

PRADO, A.M., PORTERFIELD, D.M., FEIJO, J.A. Nitric oxide is involved in growth regulation and re-orientation of pollen tubes. **Development**, v.131, p.2707-14, 2004.

PRASAD, K.V.S.K., SARANDHI, P.P., SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environ. Exp. Bot.**, v.42, p.1-10, 1999.

PRASAD, T.K., ANDERSON, M.D., MARTIN, B.A., STEWART, C.R. Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. **Plant Cell**, v.6, p.65-74, 1994.

PRICE, J., LAXMI, A., MARTIN, S.K.S., JANG, J.C. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.16, p.2128-50, 2004.

RADETSKI, C.M., COTELLE, S., FÉRARD, J.F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environ. Exp. Bot.**, v. 44, p.221-9, 2000.

RADI, R., BECKAM, J.S., BASH, K.M., FREEMAN, R.A. Peroxynitrite induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.228, p.481-7, 1991.

RAMA DEVI, S., PRASAD, M.N.V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Sci.**, v.138, p.157-65, 1998.

RAO, M.V., DAVIS, R.D. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. **The Plant J.**, v.17, p.603-14, 1999.

REETZ, E., CORRÊA, S., VENCATO, A., ROSA, G.R., RIGON, L., BELING, R.R. **Anuário Brasileiro da Soja**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2006. 136p.

REMAEH, L.M.R. **Estresse oxidativo induzido pelo herbicida lactofen em plantas de soja (*Glycine max* L. Merrill): resposta de enzimas antioxidantes**. Botucatu, 2004. 87f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

RIBEIRO, E.A., CUNHA, F.Q., TAMASHIRO, W.M.S.C., MARTINS, I.S. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. **FEBS Lett.**, v.445, p.283-6, 1999.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F.L.S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1998. 648p.

RODRIGUES, B.N., PITELLI, R.A. Quebra de dormência em sementes de *Commelina benghalensis*. **Planta Daninha**, v.12, p.106-10, 1994.

ROITSCH, T. Source-sink regulation by sugar and stress. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.2, p.198-206, 1999.

ROLLAND, F., MOORE, B., SHEEN, J. Sugar sensing and signalling in plants. **Plant Cell**, Suppl., S185-S205, 2002.

ROMAN, E.S. Estresses ocasionados por fitotoxicidade de herbicidas. In: BONATO, E.R. (Ed). **Estresses em soja**. Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. p.103-43.

ROMAN, E.S., BECKIE, H., VARGAS, L., HALL, L., RIZZARDI, M.A., WOLF, T.M. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2007. 160p.

ROS BARCELÓ, A. Lignification in plant cell walls. **Int. Rev. Citol.**, v.176, p.87-132, 1997.

ROSS, M.A., LEMBI, C.A. **Applied weed science**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall, 1999. 452p.

ROTZINGER, S., ARAGON, C.M.G., ROGAN, F., AMIR, S., AMIT, Z. The nitric oxide synthase inhibitor NW-nitro-L-arginine methylester attenuates brain catalase activity in vitro. **Life Sci.**, v.56, p.1321-4, 1995.

RUBBO, H., RADI, R., TRUJILLO, M., TELLERI, R., KALYANARAMAN, B., BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxinitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. **J. Biol. Chem.**, v.269, p.26066-75, 1994.

RYTER, S.W., TYRREL, R.M. Singlet molecular oxygen: a possible effector of eukaryotic gene expression. **Free Rad. Biol. Med.**, v.24, p.1520-34, 1998.

RYU, J.Y., SONG, J.Y., LEE, J.M., JEONG, S.W., CHOW, W.S., CHOI, S.B., POGSON, B.J., PARK, Y.I. Glucose-induced expression of carotenoid biosynthesis genes in the dark is mediated by cytosolic pH in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.25320-5, 2004.

SALERNO, G.L., CURIATTI, L. Origin of sucrose metabolism in higher plants: when, how and why? **Trends Plant Sci.**, v.8, p.63-9, 2003.

SANCHEZ-FERNANDEZ, R., REA, P.A., DAVIES, T.G.E., COLEMAN, J.O.D. Do plants have more genes than humans? Yes, when it comes to ABC proteins. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.347-8, 2001.

SANDMANN, G. Spectral determination of carotenoid precursors in *Scenedesmus* cells treated with bleaching herbicides. In: BÖGER, P., SANDMANN, G. (Eds). **Target assays for modern herbicides and related compounds**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. p.3-8.

SAVIANI, E.E., ORSI, C.H., OLIVEIRA, J.F.P., PINTO-MAGLIO, C.A.F., SALGADO, I. Participation of the mitochondrial permeability transition pore in nitric oxide induced plant cell death. **FEBS Lett.**, v.510, p.136-40, 2002.

SCANDALIOS, J.G. **Molecular biology of free radical scavenging systems**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. 284p.

SCANDALIOS, J.G. Molecular responses to oxidative stress. In: HAWKESFORD, M.J. (Ed). **Molecular analysis of plant adaptations to the environment**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001. p.181-208.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiol.**, v.101, p.7-12, 1993.

SCHÄFER, L., FEIERABEND, J. Photoinactivation and protection of glycolate oxidase *in vitro* and in leaves. **Z. Naturforsch.**, v.55c, p.361-72, 2000.

SCHERER, G.F.E., HOLK, A. NO donors mimic and NO inhibitors inhibit cytokinin action in betaine accumulation in *Amaranthus caudatus*. **Plant Growth Regul.**, v.32, p.345-50, 2000.

SCHMIDT, H.H.W.H., WALTER, U. NO at work. **Cell**, v.78, p.919-25, 1994.

SCOTT, G.H., ASKEW, S.D., WILCUT, J.W. Economic evaluation of diclosulam and flumioxazin systems in peanut (*Arachis hypogaea*). **Weed Technol.**, v.15, p.360-4, 2001.

SEKI, M., UMEZAWA, T., URANO, K., SHINOZAKI, K. Regulatory metabolic networks in drought stress responses. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v.10, p.296-302, 2007.

SEN, S., CHEEMA, I.R. Nitric oxide synthase and calmodulin immunoreactivity in plant embryonic tissue. **Biochem. Arch.**, v.11, p.221-7, 1995.

SHAH, K., KUMAR, R.G., VERMA, S., DUBEY, R.S. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Sci.**, v.161, p.1135-44, 2001.

SHEN, B., JENSEN, R.G., BOHNERT, H.J. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. **Plant Physiol.**, v.113, p.1177-83, 1997.

SHINGLES, R., ROH, M.H., McCARTY, R.E. Nitrite transport in chloroplast inner envelope vesicles. **Plant Physiol.**, v.112, p.1375-81, 1996.

SIEFERMANN-HARMS, D. The light-harvesting and protective functions of carotenoids in photosynthetic membranes. **Physiol. Plant.**, v.69, p.561-8, 1987.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, v.82, p.291-5, 1997.

SIES, H., SHAROV, V.S., KLOTZ, L.O., BRIVIBA, K. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **J. Biol. Chem.**, v.272, p.27812-7, 1997.

SIMONTACCHI, M., JASID, S., PUNTARULO, S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. **Plant Sci.**, v.167, p.839-47, 2004.

SINHA, S., GUPTA, M., CHANDRA, P. Oxidative stress induced by iron in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle: response of antioxidants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.38, p.286-91, 1997.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytol.**, v.125, p.27-8, 1993.

SMIRNOFF, N., CONKLIN, P.L., LOEWUS, F.A. Biosynthesis of ascorbic acid in plants. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, v.52, p.437-67, 2001.

SOMASHEKARIAH, B.V., PADMAJA, K., PRASAD, A.R.K. Phytotoxicity of cadmium ions on germinating seedlings of mung bean (*Phaseolus vulgaris*): involvement of lipid peroxides in chlorophyll degradation. **Physiol. Plant.**, v.85, p.85-9, 1992.

SOMOGY-NELSON, M. A new reagent for determination of sugars. **J. Biol. Chem.**, v.160, p.61-3, 1945.

SONG, F., GOODMAN, R.M. Activity of nitric oxide is dependent on, but is partially required for function of salicylic acid in the signaling pathway in tobacco systemic acquired resistance. **Mol. Plant Microbe Interact.**, v.12, p.1458-1462, 2001.

STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, v.78, p.931-6, 1994.

STAMLER, J.S., LAMAS, S., FANG, F.C. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, v.6, p.675-83, 2001.

STÖHR, C., STREMLAU, S. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.463-70, 2006.

SU, W., HOWELL, S.H. The effects of cytokinin and light on hypocotyl elongation in *Arabidopsis* seedlings are independent and additive. **Plant Physiol.**, v.108, p.1423-30, 1995.

SUJAK, A., GABRIELSKA, J., GRUDZINSKI, W., BORC, R., MAZUREK, P., GRUSZECKI, W.I. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: The structural aspects. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.371, p.301-7, 1999.

SULMON, C., GOUESBET, G., COUÉE, I., EL AMRANI, A. Sugar-induced tolerance to atrazine in *Arabidopsis* seedlings: interacting effects of atrazine and soluble sugars on *psbA* mRNA and D1 protein levels. **Plant Sci.**, v.167, p.913-23, 2004.

SULMON, C., GOUESBET, G., EL AMRANI, A., COUÉE, I. Sugar-induced tolerance to the herbicide atrazine in *Arabidopsis* seedlings involves activation of oxidative and xenobiotic stress responses. **Plant Cell Rep.**, v.25, p.489-98, 2005.

SUN, B., JING, Y., CHEN, K., SONG, L., CHEN, F., ZHANG, L. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **J. Plant Physiol.**, v.164, p.536-43, 2007.

SUNOHARA, Y., KOBAYASHI, M., MATSUMOTO, H. Light induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase activity in quinclorac-treated maize seedlings. **J. Pestic. Sci.**, v.28, p.18-23, 2003.

SUNOHARA, Y., MATSUMOTO, H. Comparative physiological effects of quinclorac and auxins, and light involvement in quinclorac-induced chlorosis in maize leaves. **Pestic. Biochem. Physiol.**, v.58, p.125-32, 1997.

SUNOHARA, Y., MATSUMOTO, H. Oxidative injury induced by the herbicide quinclorac on *Echinochloa oryzicola* Vasing and the involvement of antioxidative ability in its highly selective action in grass species. **Plant Sci.**, v.167, p.597-606, 2004.

TAJI, T., OHSUMI, C., IUCHI, S., SEKI, M., KASUGA, M., KOBAYASHI, M., YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K., SHINOZAKI, K. Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Plant J.**, v.29, p.417-26, 2002.

TAKAHASHI, S., YAMASAKI, H. Reversible inhibition of photophosphorylation in chloroplasts by nitric oxide. **FEBS Lett.**, v.512, p.145-8, 2002.

TEISSEIRE, H., GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant Sci.**, v.153, p.65-72, 2000.

THÉRON, P., BONNEFONT-ROUSSELOT, D., DAVIT-SPRAUL, A., CONTI, M., LEGRAND, A. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, v.3, p.373-84, 2000.

THIBAUD, M.C., GINESTE, S., NUSSAUME, L., ROBAGLIA, C. Sucrose increases pathogenesis-related PR-2 expression in *Arabidopsis thaliana* through an SA-dependent but NPR1-independent signalling pathway. **Plant Physiol. Biochem.**, v.42, p.81-8, 2004.

THIELE, A., SCHIRWITZ, K., WINTER, K., KRAUSE, G.H. Increased xanthophyll cycle activity and reduced D1 protein inactivation related to photoinhibition in two plant systems acclimated to excess light. **Plant Sci.**, v.115, p.237-50, 1996.

THOMAS, D.D., LIU, X., KANTROW, S.P., LANCASTER, J.R. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O₂. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.98, p.355-60, 2001.

THOMAS, T.H., HARE, P.D., VAN STADEN, J. Phytochrome and cytokinin responses. **Plant Growth Regul.**, v.23, p.105-22, 1997.

TISCHNER, R., PLANCHET, E., KAISER, W.M. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. **FEBS Lett.**, v.576, p.151-5, 2004.

TREBST, A., DEPKA, B. Role of carotene in the rapid turnover and assembly of photosystem II in *Chlamydomonas reinhardtii*. **FEBS Lett.**, v.400, p.359-62, 1997.

TRIPATHY, B.C. 5-aminolevulinic acid-induced photodynamic damage to cucumber (*Cucumis sativus* L.) plants mediated by singlet oxygen. In: DUKE, S.O., REBEIZ, C.A. (Eds). **Porphyric pesticides: chemistry, toxicology and pharmaceutical applications**. Washington, DC: American Chemical Society, 1994. p. 65-80.

TRIPATHY, B.C., MOHAPATRA, A., GUPTA, I. Impairment of the photosynthetic apparatus by oxidative stress induced by photosensitization reaction of protoporphyrin IX. **Biochim. Biophys. Acta**, 2007. (In Press).

TRIPATHY, B.C., SINGHAL, G.S. Oxidative stress in photodynamic herbicidal action of 5-aminolevulinic acid. In: SINGHAL, G.S., RENGER, G., SOPORY, S.K., IRRGAND, K.D., GOVINDJEE (Eds). **Concepts in photobiology, photosynthesis and photomorphogenesis**. New Delhi: Narosa Publishing House, 1999. p.668-88.

TRUJILLO, M., ALVAREZ, M.N., PELUFFO, G., FREEMAN, B.A., RADI, R. Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. **J. Biol. Chem.**, v.273, p.7828-34, 1998.

TSANG, E.W.T., BOWLER, C., HÉROUART, D., VAN CAMP, W., VILLARROEL, R., GENETELLO, C., VAN MONTAGU, M., INZÉ, D. Differential regulation of superoxide dismutases in plants exposed to environmental stress. **Plant Cell**, v.3, p.783-92, 1991.

TURRENS, J.F. Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. **Biosci. Rep.**, v.17, p.3-8, 1997.

UCHIDA, A., JAGENDORF, A.T., HIBINO, T., TAKABE, T., TAKABE, T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Sci.**, v.163, p.515-23, 2002.

UNESP. **Universidade Estadual Paulista**. Normas para referências bibliográficas. Disponível em: <<http://www.biblioteca.btu.unesp.br/referencia.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2007.

VAN BREUSEGEM; F., VRANOVÁ, E., DAT, J.F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Sci.**, v.161, p.405-14, 2001.

VAN CAMP, W., VAN MONTAGU, M., INZE, D. H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. **Trends Plant Sci.**, v.3, p.330-4, 1998.

VENCATO, A., ROSA, G.R., RIGON, L., CORRÊA, S., REETZ, E., BELING, R.R., SANTOS, C. **Anuário Brasileiro da Soja**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta Santa Cruz, 2005. 136p.

VIDAL, R.A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre: Pallotti, 1997. 165p.

WANG, P.G., XIAN, M., TANG, X., WU, X., WEN, Z., CAI, T., JANCZUK, A.J. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. **Chem. Rev.**, v.102, p.1091-1134, 2002.

WANG, X.Q., ULLAH, H., JONES, A.M., ASSMANN, S.M. G proteins regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. **Science**, v.292, p.2070-2, 2001.

WATANABE, K., OHORI, Y., SATO, Y., BÖGER, P.; WAKABAYASHI, K. Changes in fatty acid composition of neutral lipid in mung bean cotyledons by oxyfluorfen-induced peroxidation. **Pest. Biochem. Physiol.**, v.69, p.166-73, 2001.

WEITZBERG, E., LUNDBERG, J.O.N. Nonenzymatic nitric oxide production in humans. **Nitric Oxide**, v.2, p.1-7, 1998.

WENDEHENNE, D., LAMOTTE, O., PUGIN, A. Plant iNOS: conquest of the Holy Grail. **Trends Plant Sci.**, v.8, p.465-8, 2003.

WENDEHENNE, D., PUGIN, A., KLESSIG, D.F., DURNER, J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. **Trends Plant Sci.**, v.6, p.177-83, 2001.

WHITE, A.C., MALONEY, E.K., BOSTANI, M.R., HASSOUN, P.M., FANBURG, B.L. Nitric oxide increases cellular glutathione levels in rat lung fibroblasts. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v.13, p.442-8, 1995.

WILDT, J., KLEY, D., ROCKEL, A., ROCKEL, P., SEGSCHNEIDER, H.J. Emission of NO from several higher plant species. **J. Geo. Res.**, v.102, p.5919-28, 1997.

WILLIAMS, P.H., JARVIS, S.C., DIXON, E. Emission of nitric oxide and nitrous oxide from soil under field and laboratory conditions. **Soil Biol. Biochem.**, v.30, p.1885-93, 1998.

WINK, D.A., COOK, J.A., PACELLI, R., LIEBMANN, J., KRISHNE, M.C., MITCHELL, J.B. Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. **Toxicol. Lett.**, v.82/83, p.221-6, 1995.

WINK, D.A., HANBAUER, I., KRISHNA, M.C., DE GRAFF, W., GAMSON, J., MITCHELL, J.B. Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.9813-7, 1993.

WINK, D.A., MITCHELL, J.B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, v.25, p.434-56, 1998.

WINSTON, G.W. Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: ALSCHER, R.G., CUMMING, J.R. (Eds). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p.57-86.

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

WRISCHER, M., LJUBESIC, N., SALOPEK, B. The role of carotenoids in the structural and functional stability of thylakoids in plastids of dark-grown spruce seedlings. **J. Plant Physiol.**, v.153, p.46-52, 1998.

WU, J., OMOKAWA, H., HATZIOS, K.K. Glutathione S-transferase activity in unsafened and fenclorim-safened rice (*Oryza sativa*). **Pest. Biochem. Physiol.**, v.54, p.220-9, 1996.

WU, Y., KUZMA, J., MARÉCHAL, E., GRAEFF, R., LEE, H.C., FOSTER, R., CHUA, N.H. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants. **Science**, v.278, p.2126-30, 1997.

XING, H., TAN, L., AN, L., ZHAO, Z., WANG, S., ZHANG, C. Evidence for the involvement of nitric oxide and reactive oxygen species in osmotic stress tolerance of wheat seedlings: inverse correlation between leaf abscisic acid accumulation and leaf water loss. **Plant Growth Regul.**, v.42, p.61-8, 2004.

YAMASAKI, H. The NO world for plants: achieving balance in an open system. **Plant Cell Environ.**, v.28, p.78-84, 2005.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y. Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. **FEBS Lett.**, v.468, p.89-92, 2000.

YAMASAKI, H., SAKIHAMA, Y., TAKAHASHI, S. An alternative pathway for nitric oxide production in plants: new features of an old enzyme. **Trends Plant Sci.**, v.4, p.128-9, 1999.

YAMASAKI, H., SHIMOJI, H., OHSHIRO, Y., SAKIHAMA, Y. Inhibitory effects of nitric oxide on oxidative phosphorylation in plant mitochondria. **Nitric Oxide Biol. Chem.**, v.5, p.261-70, 2001.

ZHANG, M., AN, L., FENG, H., CHEN, T., CHEN, K., LIU, Y., TANG, H., CHANG, J., WANG, X. The cascade mechanisms of nitric oxide as a second messenger of ultraviolet B in inhibiting mesocotyl elongations. **Phytochem. Photobiol.**, v.77, p.219-25, 2003.

ZHAO, L., ZHANG, F., GUO, J., YANG, Y., LI, B., ZHANG, L. Nitric oxide functions as a signal in salt resistance in the calluses from two ecotypes of reed. **Plant Physiol.**, v.134, p.848-57, 2004.

ZHAO, M., ZHAO, X., WU, Y., ZHANG, L. Enhanced sensitivity to oxidative stress in an *Arabidopsis* nitric oxide synthase mutant. **J. Plant Physiol.**, v.164, p.737-45, 2007.

ZHU, S.H., ZHOU, J. Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage. **Food Chem.**, v.100, p.1517-22, 2007.

ZOTTINI, M., FORMENTIN, E., SCATTOLIN, M., CARIMI, F., LOSCHIAVO, F., TERZI, M. Nitric oxide affects plant mitochondrial functionality *in vivo*. **FEBS Lett.**, v.515, p.75-8, 2002.