Paulo Tamaso Mioto

Sinalização do óxido nítrico sobre a regulação do Metabolismo Ácido das Crassulaceas (CAM) em *Guzmania monostachia*

Crassulacean Acid Metabolism (CAM) regulation by nitric oxide in *Guzmania monostachia*

> São Paulo 2016

Sinalização do óxido nítrico sobre a regulação do Metabolismo Ácido das Crassulaceas (CAM) em *Guzmania monostachia*

Crassulacean Acid Metabolism (CAM) regulation by nitric oxide in *Guzmania monostachia*

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

Orientador(a): Helenice Mercier Co-orientador: Luciano Freschi

São Paulo

Mioto, Paulo Tamaso

Sinalização do óxido nítrico sobre a regulação do Metabolismo Ácido das Crassulaceas (CAM) em Guzmania monostachia 122 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. Óxido nítrico 2. Metabolismo ácido das crassuláceas 3. Bromélias-tanque I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

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

Dedicatória

Dedico este trabalho aos doutores da família (basicamente, todo mundo menos eu) "Most gods throw dice, but Fate plays chess, and you don't find out til too late that he's been playing with two queens all along."

Terry Pratchett

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem a ajuda de várias pessoas. Por causa do espaço, não tenho como detalhar tudo, mas cada pessoa mencionada aqui sabe o quanto foi importante.

Sem a orientação e a ajuda da Prof. Dr^a. Helenice Mercier este trabalho nem teria começado. Agradeço muito pelas oportunidades que ela sempre me ofereceu. Acho que cresci muito durante o doutorado e grande parte disso foi por causa dela.

Certamente, a co-orientação do Prof. Dr. Luciano Freschi também foi vital. Ele me ajudou muito, sempre abrindo o seu cofre de conhecimento para compartilhar com todo mundo. Fora a parte profissional, ele é um grande amigo.

Repetindo um pouco os agradecimentos da dissertação, devo dizer que tenho o Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy como um exemplo de dedicação à pesquisa.

Obviamente, não posso esquecer da família. Esses são os que não tem como escapar de mim tão fácil. Temos, pra começar, a Mi (minha irmã, pra quem não sabe), que sempre fornece evidências empíricas (quem diria...) do quanto ela gosta do irmão. Por isso eu acredito nelas. A Regina (senhora minha mãe) ainda cuida de mim como se eu fosse criança, apesar de já não poder mais me pegar no colo. Espero que isso continue. O Carlãozinho (essa palavra é possível se considerarmos "Carlão" como um substantivo por si só, e não como um aumentativo de "Carlos") continua, como sempre, dando apoio e incentivo nas coisas que eu faço. Como já passaram alguns anos de namoro, acho que a Alejandra deveria ser incluída nesta parte de família. Ela também poderia estar na parte de co-orientadora, revisora, ou talvez na parte de amigos. Tanto faz. O importante é que ela esteja em algum lugar por que com certeza merece!

Também tenho que agradecer o pessoal do laboratório (e agregados) que fizeram muito bem a parte deles, tanto na hora de xingar (ops, discutir!) os resultados quanto na hora de tirar os problemas da cabeça pra relaxar um pouco. Como o espaço é curto, só vou citar os nomes. Se tivesse mais espaço eu falaria

os podres também, mas aí a tese seria sobre zoologia. Aí vão os nomes: Akira, Aline C., Aline Q., Aline T., Ale, Ana Maria, Auri, Beth, Bruna, Bruno C., Bruno F., Carol, Cássia, Cintia, Dioceni, Fabito, Fernanda, Grilo, Kruger, Leonardo, Marília, Mayara, Natália, Ôxi, Paula, Paula Y., Perdigão, Piá (que revisou esta tese sem ser pago por isso - e sabendo que nunca vai ser), Rafael, Renato, Sabrina, Técnica Especialista Aline, Tonhão, Vanessa, Victoria e Willyyy.

Internacionalmente, os professores da Estación Experimental del Zaidín (em Granada – Espanha) foram muito valiosos. O Prof. Dr. Francisco Javier Corpas e o Prof. Dr. José Manuel Palma foram extremamente simpáticos e prestativos durante minha estadia lá. Esse é um motivo bem forte pra querer logo trabalhar de novo com eles.

Não tem como deixar de fora também os colegas e amigos de Granada. Entre discussões, experimentos, futebol e cervejadas, eles nem devem ter idéia do quanto me ajudaram. São eles: Carmelo, Eduardo, Hayet, Javi, Juanma, Larisse, Luis, Manolo, Marichu, Marta, Nieves, Noelia, Silvia e Tamara.

Hoje em dia a gente está meio longe, mas não tenho como excluir os velhos (e novos) amigos de Floripa. Eles continuam esperando eu terminar isso tudo e voltar pra tomar cerveja como alguém normal: Blah, Fabrício, Frango, Geba, Hideko, Igor, Israel, Kawata, Luiz, Orie, Pietro, Ryu, Sato, Toba, Megu, Mitsue, Miwa, Murilo, Willy e Zé.

O auxílio financeiro da CAPES e da FAPESP também foi essencial para a realização deste trabalho.

Índice

1. Introdução	1
1.1. O Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM)	1
1.2. Sinalização da modulação do CAM	6
1.2. O óxido nítrico	8
1.2.1. Biossíntese	8
1.2.2. Interação do NO com proteínas	
1.2.3. Funções do NO em plantas	17
1.3 Fisiologia das folhas de bromélias	
1.4. Estudos prévios em G. monostachia	20
2. Objetivos	
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
4. Material e métodos	24
4.1. Obtenção do material vegetal	24
4.2. Tratamento de déficit hídrico	24
4.3. Avaliação da condição fisiológica das folhas	27
4.3.1. Quantificação da porcentagem de água, razão entre massa seca fresca e potencial hídrico	e massa 27
4.3.2. Quantificação de proteínas, clorofilas e carotenoides	
4.4. Análises dos parâmetros do CAM	
4.4.1. Ensaios enzimáticos: PEPC e MDH	
4.4.2. Análise da variação diária da quantidade de ácidos orgânicos	
4.5. Investigação da participação do NO durante a indução ao CAM	
4.5.1. Quantificação do NO por análise da fluorescência emitida com fluoróforo DAR-4M	uso do 32
4.5.2. Quantificação do teor total de compostos nitrosiladas	
4.5.3. Caracterização do perfil de proteínas S-nitrosiladas pelo ensaio "biotin-switch"	de 33
4.6. Investigação da participação do NO sobre a atividade <i>in vitro</i> de al enzimas (PEPC, MDH, APX, CAT e NADP-ICDH)	gumas 34
4.7. Aplicação de NO gasoso ou de um sequestrador de NO	
4.6. Análise estatística	37
5. Resultados	
5.1. Avaliação das condições fisiológicas das folhas	37

5.2. Análises dos parâmetros CAM	42
5.3. Investigação da participação do NO durante a indução ao CAM	.44
5.4. Regulação da atividade de algumas enzimas por nitrosilação em <i>G. monostachia</i> (PEPC, MDH, APX, CAT e NADP-ICDH)	.49
5.5. Doação e sequestro de NO nas folhas	.52
6. Discussão	.58
6.1. Avaliação das condições fisiológicas das folhas	58
6.2. Análises dos parâmetros CAM	.63
6.3. Investigação da participação do NO durante a indução do CAM	67
6.4. Regulação da atividade de enzimas por nitrosilação em G. monostachia.	72
6.5. Doação e sequestro de NO nas folhas	76
7. Conclusões	.80
8. Perspectivas	.82
9. Resumo	.83
10. Abstract	85
11. Referências Bibliográficas	.87

1. Introdução

1.1. O Metabolismo Ácido das Crassuláceas (CAM)

O CAM ocorre em aproximadamente 16.000 espécies que englobam 328 gêneros contidos em 33 famílias (Herrera, 2009). Trata-se de um mecanismo selecionado em resposta à falta d'água no ambiente, uma vez que os estômatos das plantas CAM abrem-se à noite, quando a umidade relativa do ar é mais alta e se fecham durante o dia - um comportamento oposto àquele das plantas com metabolismo C_3 ou C_4 (Winter et al., 2005). Nas plantas CAM, o CO₂ atmosférico é usado durante a noite para a carboxilação do fosfoenolpiruvato (PEP), pela ação da enzima fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), gerando oxaloacetato (OAA). Este é então reduzido a malato pela ação da malato desidrogenase (MDH). O malato gerado é transportado para o vacúolo, onde irá ser protonado e convertido em ácido málico. Durante o dia, os estômatos se fecham e o ácido málico é remobilizado, deixando o vacúolo e se transformando novamente em malato, para ser descarboxilado pela enzima málica ou pela ação sequencial da MDH e da fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK). Aparentemente, existe um forte componente filogenético determinando qual é o sistema responsável pela descarboxilação do malato nas plantas CAM, podendo existir inclusive plantas que utilizam uma combinação dos dois (Cristopher & Holtum 1998; Dodd et al., 2002).

O CO₂ liberado pela descarboxilação do malato é então utilizado no ciclo de Calvin quando as plantas CAM estão com os estômatos fechados. Ainda existe discussão se esse tipo de metabolismo, além de uma maior eficiência no uso da água, poderia trazer outras vantagens à planta, como a proteção do aparato fotossintético contra a fotoinibição quando há baixa disponibilidade de água e/ou alta irradiância (Lüttge, 2004; Pikart, 2014). Esse tipo de metabolismo também é capaz de refixar o CO₂ liberado pela respiração (Herrera, 2009; Pikart, 2014).

O CAM pode se expressar em diferentes graus, gerando um contínuo com relação à sua intensidade (Silvera et al., 2010; Kerbauy et al., 2012; Matiz et al., 2013). O "CAM-cycling" é um tipo fraco de CAM, no qual a abertura estomática se assemelha muito com a de uma planta C3, mas ocorre uma refixação do CO₂ respirado durante a noite (Matiz et al., 2013). Um dos tipos mais extremos de CAM é o chamado "CAM-idling", no qual a planta fica praticamente 24 horas com os estômatos fechados, apenas refixando o CO₂ proveniente da respiração (Lüttge, 2006; Pikart, 2014), sendo esse tipo de CAM uma estratégia de resistência a períodos de déficit hídrico. Tanto o "CAM-cycling"quanto o "CAM-idling"apresentam um baixo acúmulo de ácidos durante a noite, sendo às vezes referidos como CAM fraco. Devido à baixa quantidade de CO₂ sendo processado por esses dois tipos de CAM, ainda existe alguma discussão a respeito das possíveis vantagens que eles poderiam trazer (Winter et al., 2015). No entanto, foi demonstrado recentemente que o CAM fraco pode representar a diferença entre um balanço positivo ou negativo de carbono quando a planta está sob uma restrição severa na entrada de CO₂, como em uma condição de déficit hídrico (Pikart, 2014). Esse mesmo autor mostrou que em condições bem hidratadas a fixação noturna de CO₂ representa aproximadamente 2% do ganho diário de carbono, sendo que essa porcentagem aumenta para 22% com o fechamento dos estômatos por longos períodos devido à imposição de um déficit hídrico.

Adicionalmente, existem variações de período ou intensidade do CAM em resposta a diversos fatores ambientais. Por exemplo, se uma planta CAM está sofrendo falta d'água seus estômatos tenderão a ficar cada vez mais tempo fechados, a caminho de um "CAM-idling", enquanto em períodos de maior abundância hídrica os estômatos de uma planta CAM podem abrir durante o dia, principalmente pela manhã ou final da tarde, a caminho de um "CAM-Cycling" (Mioto et al., 2015; Martin & Adams 1987; Loeschen et al., 1993; Stiles & Martin 1996; Nowak & Martin 1997; Haslam et al., 2003; Owen & Griffiths 2013).

Além disso, dentro dessa plasticidade existem espécies capazes de alterar seu tipo de fotossíntese desde o modo C₃ até o CAM, de acordo com o desenvolvimento (Sleslak et al., 2003; Winter & Holtum, 2007; Winter et al., 2008) ou em resposta a fatores ambientais, como luz (Maxwell et al., 1994; Haslam et al., 2003; Sleslak et al., 2003), temperatura (Nievola et al.,2005), salinidade (Taybi et al., 2001), nutrição (Santos & Salema, 1992; Hamashi et al., 2011) e disponibilidade de água (Maxwell et al., 1994; Cushman & Borland 2002; Haslam et al., 2003). É comum encontrar na literatura a denominação de "C₃-CAM facultativa" para diversas plantas que mostram ambos os tipos de fotossíntese durante seu ciclo de vida. Esse termo pode levar a uma ideia falsa, uma vez que poucas espécies são capazes de mudar o tipo de fotossíntese de C3 para CAM e também de fazer o caminho inverso. Assim, mesmo plantas consideradas CAM podem apresentar metabolismo C₃ em seus estágios mais jovens (Winter et al., 2008). Até agora, apenas três espécies são aceitas como "verdadeiras" C3-CAM facultativas: Calandrinia poliandra, Clusia pratensis e Clusia minor (Mioto et al., 2015). Freschi & Mercier (2011) argumentaram que a mudança do metabolismo C₃ para o CAM talvez seja um dos processos metabólicos mais complexos das plantas em resposta ao ambiente, já que é necessária regulação nos níveis celular, tecidual e do organismo como um todo.

O estudo de espécies que apresentam CAM fraco ou facultativo poderia fornecer pistas interessantes sobre a história evolutiva do CAM (Winter et al., 2015). De fato, acredita-se que o CAM teve múltiplas origens, uma vez que ele está amplamente distribuído entre vários taxa (Matiz et al., 2013; Winter et al., 2015; Mioto et al., 2015). Mais ainda, todos os componentes necessários para a realização do CAM (enzimas ou

estrutura celular, por exemplo) estão presentes em plantas C3 (West-Eberhard et al., 2011). Mesmo assim, até hoje não foi possível dizer com precisão quais são as modificações moleculares, bioquímicas ou estruturais que poderiam resultar no CAM. Mioto et al. (2015) sugerem que um aumento na expressão de algumas enzimas, como a PEPC, que inicialmente estariam ligadas a respostas de estresse, aliadas a modificações na resposta das células-guarda a fatores como luz, CO2 e ritmo circadiano poderiam levar a formas rudimentares de CAM. De qualquer forma, acredita-se que o passo evolutivo que levaria uma planta C3 a se tornar CAM deva ser relativamente simples, uma vez que, até onde se conhece, o CAM depende apenas de uma reorganização de componentes já existentes (West-Ebehard et al., 2011; Mioto et al., 2015). Portanto, conhecer o funcionamento de plantas capazes de modular o CAM resultaria em pistas de como ou por que essa adaptação metabólica surgiu evolutivamente. Somado a isso, existe atualmente um grande interesse em transferir o CAM para plantas com fotossíntese C₃, o que, talvez, possa permitir que essas últimas ocupem ambientes com baixa disponibilidade hídrica, sendo essa importância mais acentuada pelas projeções de mudanças climáticas nos próximos anos (Borland et al., 2011; Borland et al., 2014). Ainda assim, pesquisas envolvendo modulação do CAM são relativamente escassas na literatura.

1.2. Sinalização da modulação do CAM

Uma vertente ainda muito pouco explorada é a sinalização celular que levaria à modulação do CAM em resposta a fatores ambientais. O déficit hídrico, por exemplo, comumente leva a um aumento de expressão do CAM, colocando o ácido abscísico (ABA) como o hormônio mais frequentemente associado ao aumento desse metabolismo. Taybi & Cushman (1999) constataram que a aplicação exógena do ABA foi capaz de aumentar significativamente a quantidade de transcritos do gene Ppc1 (que codifica para uma isoforma da PEPC diretamente relacionada com a fotossíntese CAM) em folhas de Mesembryanthemum crystallinum. Em plantas jovens de abacaxizeiro (Ananas comosus), constatou-se que ocorre um aumento na concentração endógena de ABA quando elas são induzidas ao CAM por estresse hídrico, além de que a aplicação exógena desse hormônio também induz a expressão do CAM (Freschi et al., 2010). Além disso, foi constatada a participação do ABA no processo de indução ao CAM nas espécies Kalanchoe blossfeldiana (Taybi et al., 1995), Portulacaria afra (Ting, 1981) e, recentemente, em Guzmania monostachia (Mioto & Mercier 2013). Embora o ABA esteja envolvido com a indução ao CAM, parece também haver uma via independente dele, da qual pouco se conhece, como mostrado por Freschi et al. (2010) e Taybi & Cushman (2002).

As citocininas têm sido apontadas como reguladoras negativas do CAM. Em plantas jovens de abacaxizeiro, Freschi et al. (2010), tanto observando os níveis endógenos dessa classe hormonal quanto trabalhando com aplicação de citocininas exógenas, constataram uma diminuição da expressão do CAM quando essas estavam presentes. Em *M. crystallinum*, esse papel das citocininas também já tinha sido relatado anteriormente (Schmitt & Piepenbrock, 1992; Peters et al., 1997).

O cálcio se mostrou bastante importante na indução ao CAM em diversas espécies. Com a utilização de ionóforos e quelantes desse íon, foi demonstrado que a indução ao CAM depende de um aumento na concentração de cálcio citossólico tanto em M. crystallinum (Taybi &Cushman, 1999) quanto em A. comosus (Freschi et al., 2010). Em M. crystallinum também foi constatada a participação das cinases dependentes de cálcio e o inositol 1,4,5-trifosfato (Taybi & Cushman, 1999). No sugerida abacaxizeiro, foi uma via bioquímica envolvendo consecutivamente o ABA, o óxido nítrico (NO) e o cálcio, além de outra rota que parece ser independente do ABA e do NO, mas não do cálcio (Freschi et al., 2010). O NO é um radical livre que vem ganhando destaque na fisiologia vegetal, atuando em diversos processos das plantas. Mesmo assim, muito pouco se sabe sobre essa molécula.

1.2. O óxido nítrico

1.2.1. Biossíntese

O NO é um radical livre conhecido já há bastante tempo, mas a sua atuação como um sinalizador indispensável aos seres vivos é uma descoberta relativamente recente, sendo inclusive premiada com o Prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 1998 após a descoberta de seu papel como vasodilatador endógeno em tecidos animais (Durner & Klessig, 1999). Em plantas, os efeitos do NO já haviam sido estudados desde o final da década de 70 (Klepper, 1979), mas pensava-se que a sua produção se restringisse à aplicação de herbicidas ou em resposta a poluentes atmosféricos. Durante muito tempo pouca atenção foi dada a essa molécula na biologia vegetal até que, finalmente, em 1997, foi constatada a produção endógena de NO de maneira independente de herbicidas (Wildt et al., 1997). A partir daí, o número de estudos sobre essa molécula vem crescendo cada vez mais. Mesmo assim, ainda são escassos os trabalhos sobre a sinalização promovida pelo NO em plantas, se comparados com o grande número de publicações tratando da ação dessa molécula em animais (Neill et al., 2003).

O NO é um radical livre que tem tempo de meia-vida longo em sistemas biológicos, principalmente em baixas concentrações, quando comparado aos demais radicais livres (Lamattina et al., 2003; Arasimowicz

& Floryszak-Wieczorek, 2007). Devido ao seu pequeno tamanho, é altamente difusível pelas células, tanto no citossol quanto através de membranas (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007). Mesmo assim, existem evidências de que aquaporinas presentes em mamíferos podem facilitar o transporte de NO através delas (Herrera et al., 2006). Seu transporte também pode ser feito a longa distância, possivelmente através da ligação reversível com moléculas que contenham grupos tiol, como a glutationa (GSH) (Beligni & Lamattina, 2001; Leitner et al., 2009). A ligação do NO com a GSH origina a S-nitrosoglutationa (GSNO), uma molécula que poderia atuar tanto como reservatório de NO quanto forma de transporte.

Existe ainda muita discussão sobre as vias de síntese do NO e sua regulação, sendo esse um conhecimento essencial para compreender os papéis do NO (Rumer et al., 2009). Até agora foram propostas pelo menos sete vias pelas quais o NO poderia ser gerado em plantas. Duas delas tem recebido mais destaque, enquanto as demais continuam sem esclarecimento.

Uma das vias de biossíntese proposta tem como base estudos realizados em animais, sugerindo a participação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Em mamíferos, a síntese do NO parece depender, em boa parte, da NOS, a qual promove a produção de NO e L-citrulina a partir da oxidação de L-arginina, utilizando O₂, NADPH, flavina, tiol e tetrahidro-L-

biopterina como cofatores (Wendehenne et al., 2001; Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007; Wojtaszek, 2000). Já em plantas, existem alguns trabalhos apontando para uma atividade NOS semelhante àquela de mamíferos (Cueto et al., 1996; Ninnemann & Maier, 1996; Corpas et al., 2007), mas mesmo assim, a existência dessa enzima é incerta pelos seguintes motivos: nenhum gene que codifica uma NOS foi encontrado nas plantas vasculares até agora (Zemojtel et al., 2006; Crawford et al., 2006); as respostas das plantas aos inibidores de NOS são muito variáveis (Durner & Klessig, 1999) e a tetrahidro-L-biopterina, um dos cofatores da NOS animal, também parece não ser encontrada em plantas (Zemojtel et al., 2006; Crawford et al., 2006; Neill et al., 2008). Recentemente, foi caracterizada uma NOS na alga Ostreococcus tauri, que pertence a uma linhagem muito basal dos vegetais (Foresi et al., 2011), aumentando a possibilidade de que as plantas vasculares possuam uma enzima similar. Experimentos feitos com plantas de Arabidopsis thaliana expressando a NOS de alga mostraram que a proteína parece funcionar no contexto de uma planta vascular também (Foresi et al., 2015). Mesmo que uma enzima não tenha sido encontrada, a produção de NO à partir da arginina parece existir em plantas.

Outra via de síntese do NO, melhor caracterizada, é a dependente da nitrato redutase (NR), enzima responsável também pela redução do nitrato a nitrito na via de assimilação do nitrogênio. Ao utilizar um extrato

purificado da enzima, foi detectada a emissão de NO a partir do nitrito, sendo essa emissão completamente bloqueada pela adição de azida de sódio (Yamasaki & Sakihama, 2000). Vários outros trabalhos também associaram a produção de NO à atividade da NR (Rockel et al., 2002; Xu & Zhao, 2003; Sakihama et al., 2002; Bright et al., 2006; Freschi et al., 2010). A capacidade da NR produzir NO in vitro foi estimada em aproximadamente 1% da atividade total da enzima, acreditando-se que in vivo essa capacidade seja ainda menor, na faixa de 0,01-0,1% (Rockel et al., 2002). Ainda assim, essa função da NR não deve ser subestimada, uma vez que em muitas espécies vegetais essa enzima mostrou ser uma importante fonte de NO. Existem duas isoformas da NR descritas para A. thaliana, denominadas NIA1 e NIA2, sendo que a NIA2 é responsável por cerca de 90% da atividade total de redução de nitrato da NR, restando apenas 10% para a NIA1 (Wilkinson & Crawford, 1993). Bright et al. (2006), através do uso de duplos mutantes *nial/nia2*, mostraram que o NO gerado no processo de fechamento estomático induzido pelo ABA era dependente da atividade da NR. Mais recentemente, Zhao et al. (2009), também utilizando os mutantes nia1/nia2 e nia2, concluíram que a maior parte do NO produzido por plantas de A. thaliana durante a aclimatação ao frio parece ser proveniente da isoforma NIA1.Esses resultados indicam a possibilidade de que existam isoformas de NR mais relacionadas à produção de NO, enquanto outras seriam responsáveis pelo metabolismo

do nitrato. Além dessas duas vias de produção de NO, cinco outras foram propostas, das quais temos ainda menos informação.

Foi encontrada uma enzima na membrana plasmática das células da raiz de tabaco, a nitrito-NO redutase (Ni-NOR), que também parece ser capaz de converter o nitrito em NO (Stöhr et al., 2001). Essa enzima trabalha com elétrons provenientes de um doador ainda desconhecido sendo que, in vitro, o doador usado foi o citocromo c (Stöhr et al., 2001). O transporte de elétrons nas mitocôndrias produziu NO in vitro, mas em tecidos intactos essa via não se mostrou muito significativa e por isso não é ainda bem reconhecida (Planchet et al., 2005). O NO pode surgir também a partir da redução não enzimática do nitrito, quando este se encontra em pH inferior a 4,5 (Wendehenne et al., 2001). Deve-se ressaltar que essa via de síntese pode ser importante fisiologicamente, uma vez que em alguns tecidos, como no apoplasto da camada de aleurona de sementes de cevada essa condição é encontrada e o NO parece exercer um efeito marcante sobre a germinação dessa espécie (Bethke et al., 2007). Rumer et al. (2009) detectaram a formação de NO a partir de hidroxilaminas em culturas celulares quando em presença de oxigênio. Essa produção parece depender de espécies reativas de oxigênio (ROS) e esses autores sugeriram que as ROS seriam o fator limitante nesse tipo de produção de NO. Foi também proposta uma via de síntese do NO a partir das poliaminas espermidina e

espermina (Tun et al., 2006; Yamasaki & Cohen, 2006), mas essa rota ainda não está bem caracterizada.

Mesmo com todos esses dados disponíveis, ainda existe muita controvérsia a respeito das vias de produção de NO em tecidos vegetais. Por esse motivo, diversos autores ressaltam a importância e a necessidade de serem gerados novos conhecimentos para que se possa compreender melhor como o NO atua em plantas (Baudouin, 2010; Leitner et al., 2009; Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007; Neill et al., 2008; Palavan-Unsal & Arisan, 2009).

1.2.2. Interação do NO com proteínas

Uma vez sintetizado, o NO reage principalmente com o oxigênio, peróxido de hidrogênio ou consigo mesmo, gerando peroxinitrito, nitrato ou nitrito (Leitner et al., 2009). O peroxinitrito é um intermediário nas reações de nitração de resíduos de tirosina, uma das formas pelas quais o NO interage com proteínas (Besson-Bard et al., 2008). Postula-se que a nitração de resíduos de tirosina em proteínas vegetais possa ser uma forma efetiva de regulação, uma vez que diferentes padrões de nitração são observados em resposta tanto a condições ambientais, como temperatura e estresse salino, quanto em resposta ao ataque de patógenos (Saito et al., 2006; Valderrama et al., 2007; Corpas et al., 2008; Corpas et al., 2009). Mais ainda, essa alteração parece frequentemente resultar em uma drástica diminuição da atividade das enzimas, além de não ser facilmente revertida (Valderrama et al., 2007). No entanto, recentemente foi caracterizada uma denitrase em mamíferos, enzima responsável pelo processo de desnitração (Deeb et al., 2013). Dessa forma, a nitração está se estabelecendo como um mecanismo robusto de sinalização na biologia, com evidências em vários organismos, incluindo bactérias, animais e plantas (Bottari, 2015).

Outras formas pelas quais o NO interage com proteínas são a nitrosilação de resíduos de cisteína (S-nitrosilação) ou de metaloproteínas (Arasimowicz & Floryszak-Wieczorek, 2007; Besson-Bard et al., 2009). A nitrosilação também se mostra como um importante mecanismo de interação entre o NO e proteínas, uma vez que já foi constatado que esse tipo de ligação pode regular, direta ou indiretamente, várias propriedades das proteínas, como conformação, atividade, ou até mesmo localização intracelular (Leitner et al., 2009). Em um trabalho recente, Tavares et al. (2014) demonstraram que a S-nitrosilação do fator de transcrição AtMYB30 (que participa da resposta de hipersensibilidade em *A. thaliana*) faz com que essa proteína sofra uma mudança conformacional em sua estrutura secundária, resultando em uma clara redução da sua capacidade de ligação com o DNA. Recentemente, foi descoberto que a enzima ascorbato peroxidase pode ser regulada tanto por nitração de um resíduo específico de tirosina, resultando em menor atividade, quanto por nitrosilação de um resíduo de cisteína, aumentando a atividade da enzima

(Valderrama et al., 2007; Begara-Morales et al., 2014). Certamente, a cisteína parece ser um aminoácido chave na regulação da atividade de diversas enzimas, pois pode apresentar pelo menos sete estados de oxidação (Spoel & Van Ooijen 2014; Rouhier et al., 2015). Do mais reduzido ao mais oxidado, esses estados são: reduzido (S-H), nitrosilado (S-NO), sulfenado (S-OH), o de ponte dissulfeto (S-RS), o de glutationilação (S-SG), o de ácido sulfínico (S-O₂H) e o de ácido sulfênico (S-O₃H). Dessa forma, a S-nitrosilação pode representar por si só um estado no qual a atividade enzimática é alterada, ou como uma ponte facilitando a transição entre outros estados.

Uma vez que a GSH possui um grupo tiol, é possível que o NO se ligue reversivelmente a ela, gerando GSNO. Postula-se, portanto, que a GSNO pode ter relevância como uma forma de armazenamento, catabolismo ou de transporte a longa distância do NO livre (Leitner et al., 2009). Alternativamente, o NO pode ser transferido de um grupo tiol a outro, através de reações conhecidas como transnitrosilação (Lounifi et al., 2013). Essas reações podem ocorrer tanto entre peptídeos (como a GSNO) e proteínas quanto de proteínas para proteínas, ou mesmo entre regiões diferentes de uma mesma proteína (Barroso et al., 2006). É importante levar em conta também que nem todas as cisteínas de uma proteína são passíveis de nitrosilação. Os resíduos de cisteína com baixo pKa próximos

a aminoácidos carregados ou aqueles que estão em um entorno hidrofóbico são os mais propícios à nitrosilação (Lounifi et al., 2013).

Já foram feitos estudos em algumas espécies visando estabelecer o perfil de S-nitrosilação das proteínas, após extratos protéicos da planta serem tratados com GSNO. Dentre as proteínas encontradas, notou-se que em *A. thaliana*, uma planta C₃, a PEPC não foi S-nitrosilada (Lindermayr, 2005), no entanto, no caso de *Kalanchoe pinnata*, uma espécie CAM, essa enzima foi encontrada S-nitrosilada (Abat et al., 2008).

Foi recentemente mostrado que o NO é capaz de interagir não só com proteínas, mas também com outras moléculas importantes no processo de sinalização celular.Conforme mencionado anteriormente, o NO reage com as ROS, podendo afetar os processos de sinalização vinculados a esses compostos (Leitner et al., 2009; Arora et al., 2015). De maneira interessante, foi mostrado que a citocinina zeatina pode sofrer nitração *in vivo* e ser inativada pelo NO em uma reação aparentemente reversível (Liu et al., 2013).

Dessa forma, o NO parece atuar em diversas vias simultaneamente devido, em grande parte, à sua inespecificidade ao reagir com biomoléculas, não apresentando, por exemplo, receptores específicos. Isso torna o estudo da sinalização promovida por esse radical bastante complexo.

1.2.3. Funções do NO em plantas

Por se tratar de um sinalizador importante, muitas pesquisas já associaram o NO com uma grande variedade de processos nas plantas. Trabalhos envolvendo a aplicação de doadores ou sequestradores de NO são relativamente comuns na literatura, mas raramente se investigam os mecanismos pelos quais esse NO poderia estar agindo em cada processo. De qualquer forma, o NO parece estar envolvido tanto em processos ontogenéticos quanto em respostas de estresses a diversos fatores bióticos ou abióticos. Alguns exemplos de processos nos quais há a participação do NO são: 1) abertura e fechamento estomático induzido pelo fitormônio ácido abscísico (ABA) (Desikan et al., 2002; García-Mata & Lamattina, 2003; García-Mata & Lamattina, 2007); 2) resposta de hipersensibilidade (Delledonne et al., 1998; Durner et al., 1998; Leitner et al., 2009); 3) germinação (Bethke et al., 2004; Bethke et al., 2007); 4) desestiolamento e inibição do crescimento do hipocótilo e dos entrenós (Beligni & Lamattina, 2000; Lozano-Juste & León, 2011); 5) morte celular programada da camada de aleurona em A. thaliana, atuando após a ação do ácido giberélico (GA), um fitormônio que sabidamente participa desse processo (Libourel et al., 2006; Bethke et al., 2007); 6) inibição da floração (Seligmann et al., 2008), possivelmente através da regulação negativa de expressão dos genes CONSTANS e GIGANTEA (promotores da floração) e positiva do gene FLOWERING LOCUS C (inibidor da floração) (He et al.,2004); 7) inibição da senescência induzida pelo ABA (Hung & Kao, 2003); 8) formação de raízes e exsudação de citrato em *Lupinus albus*, como uma resposta à falta de fosfato (Wang et al., 2010); 9) indução do CAM, também em *A. comosus*, em resposta ao estresse hídrico (Freschi et al., 2010).

Recentemente, em *Guzmania monostachia*, também foram relacionados a emissão de NO e o aumento do CAM, sendo que o sinal dado por essa molécula ficou bem localizado tanto temporal (durante os últimos dias de aumento do CAM) quanto espacialmente (mais restrito ao ápice foliar, uma vez que em bromélias parece haver uma divisão funcional ao longo do comprimento da folha) (Mioto & Mercier, 2013). Sendo assim, imagina-se que o aprofundamento dos estudos com a espécie *G. monostachia* poderia ajudar a fornecer informações interessantes para serem exploradas na pesquisa sobre NO.

1.3 Fisiologia das folhas de bromélias

G. monostachia é uma bromélia tanque epífita, cujas folhas podem apresentar algumas características particulares. Takahashi et al. (2007) observaram que em bromélias epífitas, as folhas desempenham um papel importante na absorção e assimilação de nutrientes. Em espécies que apresentam tanque, grande parte da sua nutrição depende de compostos presentes na água acumulada ali (Benzing, 1998; Laube & Zotz, 2003). Assim, as bases foliares teriam diferenças funcionais em relação ao ápice, uma vez que elas estão em contato direto com a solução nutritiva do tanque, ao passo que os ápices estariam muito mais aptos à realização de trocas gasosas e fotossíntese em função de sua maior densidade estomática e interceptação de luz (Freschi et al., 2010a).

Apesar de escassos, existem trabalhos apontando para esse tipo de separação funcional ápice-base. Popp et al. (2003) dosaram os teores de ácidos orgânicos e carboidratos em cinco porções das folhas de várias espécies de bromélias, encontrando um gradiente de concentração que aumentou à medida que se aproximou da parte apical. A concentração de nitrogênio também apresentou diferenças ao longo da folha, sendo maior nas partes verdes (apicais) do que nas partes não-verdes (basais) (Popp et al., 2003). Também foi constatado que os tricomas (estruturas importantes para a absorção de nutrientes) do ápice foliar são pouco numerosos comparativamente àqueles da base (Sakai & Sandford, 1980). No nosso laboratório, Takahashi et al. (2007) e Takahashi & Mercier (2011) constataram que, entre as duas porções foliares de Vriesea gigantea, uma bromélia-tanque epífita, as enzimas glutamina sintetase e glutamato desidrogenase dependente de NADH apresentaram atividades significativamente maiores nos ápices. Mais ainda, foram detectadas quantidades maiores de tricomas e menores de estômatos na base foliar, quando comparada ao ápice (Takahashi & Mercier, 2011). Além dos parâmetros já mencionados, foram encontradas maiores concentrações de

ureia e amônio e atividade da NR e da urease na região basal da folha, enquanto que no ápice foi detectada uma maior quantidade de clorofila e amido (Takahashi & Mercier, 2011). Ainda no nosso laboratório, Freschi et al. (2010a) descobriram que o aumento do CAM, induzido por estresse hídrico, ao longo da folha de G. monostachia, se dá de forma diferente, sendo mais intenso no ápice do que na base. Durante o estresse hídrico, a água presente na base parece ser mobilizada para o ápice, permitindo que essa região não sofra diretamente o estresse hídrico. Isso sugere que algum sinal também pode ser transmitido da base para o ápice da folha, informando a escassez d'água na base. Esses resultados mostraram claramente que existe uma divisão funcional ao longo do comprimento da folha de bromélias tanque, indicando que possivelmente a parte basal é mais especializada na absorção de nutrientes e a parte apical na realização da fotossíntese e assimilação do nitrogênio.

1.4.Estudos prévios em G. monostachia

Dentre os membros da família Bromeliaceae, *G. monostachia* é uma planta-modelo que vem sendo investigada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento da Universidade de São Paulo. Sabe-se que a expressão do CAM envolve uma coordenação na planta desde o nível celular até o de indivíduo. Mesmo assim, o CAM parece ter surgido diversas vezes ao longo da evolução, sendo interessante observar que poucos ou nenhum componente realmente novo é necessário para que esse tipo de metabolismo se processe bioquimicamente (West-Eberhard et al., 2011). Isso faz com que espécies altamente plásticas com relação ao CAM (como *G. monostachia*) possam nos dar muitas informações sobre como esse passo evolutivo pode ter ocorrido.

Estudos anteriores demonstraram que após um período de déficit hídrico, *G. monostachia* mostrou um aumento conspícuo na intensidade do CAM (Maxwell et al., 1994; Freschi et al., 2010a; Mioto & Mercier, 2013; Pikart, 2014). Esses mesmos autores observaram ainda que essa alteração ocorreu de maneira diferente ao longo do comprimento das folhas, sendo que na porção apical esta foi mais pronunciada. Isso faz com que esse processo seja localizado tanto temporal quanto espacialmente, tornando *G. monostachia* um bom material para caracterizar com maior exatidão os sinais bioquímicos que levam à indução do CAM.

Ao longo de minha dissertação de mestrado, padronizou-se uma redução do modelo experimental, utilizando folhas destacadas de *G. monostachia* ao invés da planta inteira. De modo interessante, as folhas destacadas apresentaram um comportamento CAM similar às plantas intactas. A partir da implementação desse modelo reduzido no nosso laboratório, a dinâmica temporal do estabelecimento do estresse hídrico e da mudança para o CAM também foram estabelecidos. No primeiro dia de exposição a uma solução com 30% de PEG (polietilenoglicol) 6000, a região basal da folha atinge os níveis mais baixos de porcentagem de água,

que continuam praticamente constantes até a folha ser reidratada novamente. O aumento no CAM, no entanto, só vai se processar do sexto para o sétimo dia após o início do estresse e essa transição é caracterizada por um aumento no acúmulo de acidez durante a noite e uma maior atividade da enzima PEPC. Além da separação temporal entre os processos de perda de água e mudança no tipo de fotossíntese, notou-se que a desidratação ocorre com mais intensidade na região basal das folhas expostas ao PEG, enquanto que a mudança na via de fotossíntese é muito mais significativa na região apical. Tendo conhecimento dessa separação espacial e temporal, caracterizou-se a participação de duas moléculas nesse processo: o ABA e o NO. A primeira aumentou endogenamente ao longo de todo o comprimento das folhas expostas ao PEG e a segunda apresentou um aumento somente na porção apical da folha (Mioto & Mercier, 2013). Uma vez que a porção basal da folha é a região que sofre uma maior perda de água, é possível que exista o transporte de algum sinal da porção basal para a apical da folha.

Levando-se em consideração todos esses resultados anteriores do nosso laboratório, novas questões relacionadas ao papel do NO neste processo surgiram:1) o sinal proporcionado pelo NO teria início logo após a aplicação do déficit hídrico ou só aconteceria nos dias anteriores ao aumento do CAM? 2) o NO seria capaz de provocar um aumento do CAM mesmo numa condição de abundância hídrica? Poderia esse aumento

acontecer mesmo na ausência de NO? 3) a regulação da atividade da PEPC, através da ação do NO, se daria em nível transcricional, pós-traducional ou em ambos? 4) existiria interação direta do NO com proteínas, através de reações de S-nitrosilação? Isso resultaria em mudanças na atividade? 5) no caso da S-nitrosilação, quais seriam as possíveis proteínas que mostrariam essa alteração na condição de déficit hídrico?

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho visou estudar de que forma o NO participa no aumento da expressão do CAM no ápice de folhas destacadas de *G*. *monostachia* submetidas à deficiência hídrica.

2.2. Objetivos específicos

1) Acompanhar as mudanças do CAM através da dinâmica temporal e espacial da atividade da PEPC e acúmulo noturno de ácidos quando folhas destacadas de *G. monostachia* foram submetidas ao déficit hídrico por PEG 6000.

 Acompanhar a emissão de NO pelas diferentes porções foliares quando as folhas destacadas foram submetidas ao déficit hídrico (PEG 6000) ao longo de oito dias.

 Confirmar a participação do NO como sinalizador da regulação do CAM, através do uso de doadores e sequestradores desse radical.

4) Comprovar se o NO é capaz de regular a atividade da PEPC e de outras enzimas em nível pós-traducional.

5) Comparar o perfil de S-nitrosilação das proteínas das porções apical e basal de *G. monostachia* quando as folhas destacadas foram submetidas ou não ao déficit hídrico.

4. Material e métodos

4.1. Obtenção do material vegetal

Bromélias epífitas com tanque da espécie *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez. foram empregadas na realização deste trabalho . Tais plantas foram originadas de brotamento das gemas laterais de plantas cultivadas *in vitro* em meio KN (Knudson, 1946). Esses brotamentos, depois de se desenvolverem em novas plantas, foram transferidos para vasos e levados à casa de vegetação, onde ficaram por cerca de dois anos, até atingirem a idade adulta. Durante esse período, as plantas foram regadas diariamente e adubadas quinzenalmente com a solução KN (Knudson, 1946) Sendo assim, a variação genética entre os indivíduos é menor, se comparada a plantas provenientes da germinação de sementes.

4.2. Tratamento de déficit hídrico

Plantas adultas provenientes da casa de vegetação foram transferidas para uma câmara de crescimento para aclimatação, durante 30 dias, nas seguintes condições ambientais: temperatura de 25±2°C, umidade relativa

do ar de $60\pm10\%$, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de 250 µmol.m⁻².s⁻¹. Durante esse período as plantas não receberam nenhum tipo de adubação e foram regadas diariamente com água destilada. Foram retiradas, sob a água, as folhas do oitavo ao décimo segundo nó de cada planta (começando a contagem a partir do ápice da planta). Para todos os experimentos, as folhas foram mantidas dentro de frascos do tipo borel, com as bases imersas em 10 mL de água deionizada (controle) ou, para provocar a deficiência hídrica, em 10 mL de uma solução com 30% de PEG 6000, gerando um potencial hídrico da solução de cerca de -1,9 MPa. Após testes preliminares, foram usadas campânulas de acrílico transparente durante o experimento, já que foi observado que elas mantinham as folhas em melhores condições ao longo do experimento. A Figura 1A mostra a montagem experimental. Durante a coleta, uma pequena parte da região basal das folhas, que permaneceu submersa na solução de PEG ou água durante o experimento, foi descartada. Segundo resultados de experimentos anteriores, o tempo estabelecido de alteração do CAM foi de sete dias, período no qual as folhas destacadas (controle e tratamento) foram mantidas nas mesmas condições ambientais usadas para a aclimatação das plantas. Foram retiradas amostras uma hora após o início do período luminoso, para todas as análises realizadas e foram também coletadas amostras uma hora antes do término do período luminoso, para a dosagem da variação diária de ácidos orgânicos. Em todas as análises, as folhas

foram divididas em três porções: basal (correspondente à região da bainha foliar, caracterizada por ser um tecido com pouca concentração de clorofila), mediana e apical (formada pela divisão da porção verde da lâmina foliar em dois segmentos) (**Figura 1B**). A porção mediana não foi analisada. Foi feito um *pool* de amostras de cada porção e dessa mistura foram tiradas alíquotas para as análises. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez e, caso a mesma tendência fosse apresentada, o mais expressivo dos dois foi selecionado. Onde foram observadas tendências diferentes foi feita mais uma repetição dos experimentos para confirmação.

Adicionalmente, optou-se por um detalhamento maior do perfil de emissão de NO no sétimo dia. Para tanto, as folhas foram mantidas em PEG ou em água durante sete dias e, no sétimo dia, foram feitas coletas a cada quatro horas, a partir do início do período claro, durante 24 horas, para aferir a quantidade de NO emitido nas porções apical e basal. No primeiro ponto do período claro e no primeiro do período escuro foi também quantificada a atividade da enzima PEPC, visando estabelecer uma correlação entre a atividade desta enzima e a emissão de NO.



Figura 1: Visão geral das câmaras de acrílico com as folhas destacadas de *G. monostachia* (A). Folha de *G. monostachia* subdividida em três porções: apical, mediana e basal (B).

4.3. Avaliação da condição fisiológica das folhas

4.3.1. Quantificação da porcentagem de água, razão entre massa seca e massa fresca e potencial hídrico

Como as amostras sofreram diferentes níveis de desidratação, a utilização de massa fresca (MF) como indicadora da quantidade de material poderia mascarar os resultados. Assim, amostras contendo 0,5 g de massa fresca retiradas de folhas submetidas a cada tratamento foram mantidas por 48 horas em uma estufa a 60°C, para a obtenção das medidas de massa seca (MS). Uma vez obtidos os valores de MS, eles foram divididos pela quantidade original de massa fresca (0,5 g), obtendo-se, assim, uma razão entre a massa fresca e a massa seca em cada um dos tratamentos. Esses valores foram usados para expressar os resultados obtidos nos ensaios
descritos anteriormente. A porcentagem de água, empregada como indicativo do grau de estresse hídrico sofrido, foi calculada a partir da equação: ((MF – MS)/MF)*100.

Adicionalmente, para determinar o grau de déficit hídrico sofrido pelas folhas, foi medido o potencial hídrico das três porções foliares com uso de um psicômetro de folha Wescor L-51.

4.3.2. Quantificação de proteínas, clorofilas e carotenoides

As proteínas foram extraídas em tampão fosfato 50 mM pH 7,2 e quantificadas de acordo com o método de Bradford (1976). Os pigmentos (clorofilas e carotenoides totais) foram extraídos em dimetilformamida e quantificados de acordo com o protocolo de Minocha et al. (2009).

4.4. Análises dos parâmetros do CAM

Para constatar se as folhas mostraram alterações no CAM, foram feitas análises visando quantificar a atividade da enzima PEPC e a variação diária de ácidos orgânicos. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.4.1. Ensaios enzimáticos: PEPC e MDH

Amostras de 0,5g de massa fresca, coletadas uma hora após o início do período luminoso e provenientes das diferentes porções foliares foram trituradas com nitrogênio líquido e em seguida imersas em tampão de extração (pH 8,0), composto por Tris-HCl (200 mM, pH 8,0), 5 mM de DTT, 10 mM de MgCl₂, 1 mM de EDTA, 0,5% de albumina bovina e 10% de glicerol. As amostras foram então centrifugadas a $15.000 \ g$ por 2 minutos. O sobrenadante resultante foi filtrado em lã de vidro, coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos.

O ensaio para a PEPC foi feito a 30° C em 2 mL de um meio de reação, contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8.,0), 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaHCO₃, 20 mM NADH e 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP). A reação foi iniciada com a adição de 400 µL do extrato (adaptado de Nievola et al., 2005).

Nos experimentos onde houve a aplicação de NO gasoso foi também feita a atividade da enzima MDH, visando verificar a amplitude do papel do NO como modulador do CAM.

A extração dessa enzima foi feita da mesma forma que a da PEPC, mudando somente o ensaio para a medição da atividade. Nesse caso, a reação para quantificar a atividade da MDH foi feita a 30°C em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) contendo 10 mM de MgCl₂ e 2 mM de oxaloacetato.

Em ambas as reações, o consumo de NADH foi quantificado em espectrofotômetro (a 340 nm) no momento inicial da reação e após 4 minutos, sendo os resultados expressos na forma de μ mol min⁻¹MS⁻¹.

4.4.2. Análise da variação diária da quantidade de ácidos orgânicos

Amostras das diferentes porções foliares com 100 mg de massa fresca foram maceradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 1,5 mL, onde foram adicionados 500µL de uma mistura de metanol, clorofórmio e água na proporção 12:5:1. Posteriormente, os microtubos foram agitados em vortex e incubados por 30 minutos a 60°C. Em seguida, foram adicionados 500 µL de água ultrafiltrada para a partição de fases, seguido por agitação em vortex. Finalmente, os extratos foram centrifugados em ultracentrífuga de bancada a 20.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e 50 µL do extrato foram acondicionados em "vials" contendo insertos de vidro. O extrato foi então secado completamente e ressuspendido em 25 µL de piridina para a derivatização. Esta foi feita com 25 µL de N-tert-butildimetilsilil-Nmetiltrifluoroacetamida (MTBSTFA), por 1 hora a 90°C e injetado no cromatográfo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS). Foi usado o ácido salicílico como padrão interno para o cálculo de perdas, após a confirmação de que os teores endógenos deste composto não eram detectados.

Alíquotas de 1 μ L (modo splitless) foram injetadas no aparelho equipado com uma coluna Agilent DB-5MS com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e partículas com 0,25 μ m de tamanho. Como gás de arraste utilizou-se um fluxo de 24 mL/min de hélio. A rampa de temperatura foi de 100 °C a 300 °C em uma taxa de 6°C/min e a temperatura final foi mantida por mais 10 minutos. Curvas de calibração foram utilizadas para determinar a concentração de ácidos orgânicos individuais na amostra, através da análise de íons no modo scan. Para quantificação utilizaram-se os íons com m/z 115, 459 e 309 para malato, citrato e ácido salicílico, respectivamente.

4.5. Investigação da participação do NO durante a indução ao CAM

Para caracterizar o papel do NO na indução ao CAM, foram usadas as seguintes estratégias: 1) quantificação da emissão de NO nas porções basal e apical da folha, ao longo dos sete dias nos quais a planta foi submetida à deficiência hídrica; 2) quantificação do teor de nitrosotióis totais em duas porções da folha (basal e apical); 3) aplicação de NO gasoso ou sequestrador (2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3óxido) desse radical livre, seguido de análise dos parâmetros do CAM nas porções basal e apical da folha; 4) verificação do perfil das proteínas que são S-nitrosiladas quando as folhas foram submetidas à escassez d'água; 5) quantificação das atividades das enzimas do CAM (PEPC e MDH) em resposta à nitrosilação in vitro. Visando ampliar a visão do papel do NO na planta, algumas enzimas não diretamente relacionadas ao CAM também foram selecionadas para a avaliação do papel da nitrosilação em suas atividades, como a ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e isocitrato desidrogenase dependente de NADP (NADP-ICDH).

4.5.1. Quantificação do NO por análise da fluorescência emitida com uso do fluoróforo DAR-4M

Amostras foliares foram pesadas (cerca de 0,1 g) e coletadas no período de uma hora após o início do fotoperíodo e em seguida fragmentadas, colocadas em microtubos e incubadas em uma solução de DAR-4M a 75 µM em tampão fosfato (0,5 M; pH 7,2) por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram lavadas três vezes com 1 mL de tampão fosfato. Finalmente, as amostras foram lidas em espectrofluorímetro, utilizando o comprimento de onda de excitação de 560 nm e de emissão de 575 nm. Os resultados são apresentados como unidades arbitrárias de fluorescência (UFA) por grama de massa seca.

4.5.2. Quantificação do teor total de compostos nitrosilados

A técnica de quantificação do teor total de proteínas nitrosiladas foi baseada no mesmo princípio daquela proposta por King et al. (2005). Para tanto, amostras foliares foram trituradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foram homogeneizadas em um tampão contendo 200 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM de MgCl₂ e 1 mM de EDTA sódico e centrifugadas a 20.000 g a 4°C durante 20 minutos. Após a extração, as proteínas foram precipitadas por 1 hora a -20°C com 4 volumes de acetona gelada, sendo em seguida centrifugadas a 4°C (20.000 g) por 20 minutos para remover a acetona. Os precipitados foram ressuspensos no mesmo tampão usado na extração e centrifugados por mais 5 minutos. Foram adicionados 500 μ M de DAR-4M aos extratos e eles foram então divididos em dois grupos: um grupo permaneceu por 5 minutos no escuro, enquanto outro foi exposto durante o mesmo tempo à luz UV em um transluminador, o que causa a quebra da ligação S-NO, liberando o NO para reagir com o DAR-4M. Após a reação, o volume foi ajustado para 1 mL com tampão fosfato pH 7,2 a 50 mM e a amostra foi levada ao espectrofluorímetro. A estimativa do conteúdo de S-nitrosotióis foi feita com base na diferença na emissão de fluorescência (λ_{exc} 560; λ_{emiss} 575) entre a mesma amostra com e sem a aplicação de UV. Os valores obtidos foram comparados a uma curva padrão feita com GSNO, de forma que os valores são apresentados na forma de nmol de NO liberado por mg de proteína.

4.5.3. Caracterizaçãodo perfil de proteínas S-nitrosiladas pelo ensaio de "biotin-switch"

O método foi baseado no descrito por Tada et al. (2008). As porções da folha foram homogeneizadas em tampão HEN (250 mM de Hepes, pH 7,7; 1 mM de EDTA; 0,1 mM de neucuproína). O extrato foi centrifugado duas vezes a 14.000 g por 15 minutos e a concentração de proteínas no sobrenadante detectada pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas na amostra foi ajustada para 1 mg/mL com tampão HEN acrescido de 2,5% de SDS e 25 mM de tiosulfonato de S-metilmetano (MMTS) e incubado a 50°C por 20 minutos, com agitação frequente. Em

seguida, as proteínas foram precipitadas com acetona a 20°C por 20 minutos e centrifugadas a 5.000 g por 5 minutos para a remoção do MMTS. O precipitado foi lavado com acetona e ressuspenso em tampão HEN contendo 1% de SDS. A seguir, foram adicionados ascorbato de sódio a 1 M e uma solução com 2,5 mg/mL de biotina-HPDP. Depois de incubar por 90 minutos, as proteínas foram precipitadas e lavadas com acetona. O precipitado foi ressuspenso em tampão HEN e tampão de neutralização (25 mM de Hepes, pH 7,7; 100 mM de NaCl, 1 mM de EDTA e 0,5% de Triton X-100). Após uma centrifugação a 10.000 g por 5 minutos, foram adicionadas "beads" de estreptavidina e deixado para incubação por 1 hora em temperatura ambiente. As proteínas ligadas às "beads" foram eluídas seguindo as recomendações do fabricante.

As proteínas que não se ligaram à estreptavidina foram quantificadas e usadas como controles para o carregamento dos géis SDS-PAGE. As amostras foram separadas em géis de acrilamida/bis-acrilamida (proporção 35:1) a 12%. As proteínas foram visualizadas através da coloração com prata.

4.6. Investigação da participação do NO sobre a atividade *in vitro* de algumas enzimas (PEPC, MDH, APX, CAT e NADP-ICDH)

Para o estudo do efeito da nitrosilação sobre a atividade da PEPC foi usado um protocolo similar àquele descrito anteriormente (item 4.4.1). O material vegetal foi macerado e extraído em tampão Tris-HCl 200 mM (pH 8,0), MgCl₂ 10 mM e 1mM de EDTA. O extrato foi dividido em três partes iguais e incubado com 2 mM de GSNO (agente nitrosilante), GSH ou água.
O tratamento com GSH fornece informações importantes para constatar se os efeitos observados são realmente devido ao NO, e não à presença de glutationa.

A reação para quantificar a atividade da PEPC foi feita a 30°C em um tampão contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 100 mM NaHCO₃, 20 mM NADH, 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP) e 5 unidades de L-MDH. Foi quantificada a queda de absorbância a 340 nm, representando o consumo de NADH pela reação em sequência da PEPC e da MDH.

No caso das outras enzimas, porções foliares de *G. monostachia* foram trituradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, foi adicionado um tampão de extração contendo 200 mM de Tris-HCl (pH 7,8), 5 mM de MgCl₂.6H₂O, 5 mM de DTT e 1 mM de EDTA sódico. As amostras foram centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos e o sobrenadante coletado. Após a extração, as proteínas foram precipitadas por 1 hora a -20°C com 10 volumes de acetona gelada, sendo em seguida centrifugadas a 20.000 g por 20 minutos para remover a acetona. Os precipitados foram ressuspensos no mesmo tampão usado na extração, porém sem a adição de DTT, e centrifugados por mais 5 minutos. O extrato foi dividido em quatro partes iguais e incubado com 2 mM de GSH, GSNO (agente de nitrosilação) ou água. Finalmente, as amostras foram

35

encaminhadas para as análises de atividade das enzimas. Esses experimentos foram repetidos no mínimo três vezes independentemente.

A reação para quantificar a atividade da MDH foi feita conforme descrito no item 4.4.1.

A reação para quantificar a atividade da APX foi feita a 30° C em tampão HEPES-NaOH (pH 7,6) contendo 2 mM de ascorbato e 3 mM de H₂O₂. Foi quantificada a queda de absorbância a 290 nm, representando o consumo de ascorbato pela enzima.

A reação para quantificar a atividade da CAT foi feita a 25 °C em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 10 mM de H_2O_2 . Foi quantificada a queda de absorbância a 240 nm, representando o consumo de H_2O_2 pela enzima.

A reação para quantificar a atividade da NADP-ICDH foi feita a 30 °C em tampão HEPES-NaOH 50 mM (pH 7,6) contendo 2,5 mM de MgCl₂ e 20 mM de isocitrato. Foi quantificado o aumento da absorbância a 340 nm, indicando a formação de NADPH pela enzima.

4.7. Aplicação de NO gasoso ou de um sequestrador de NO

Para a aplicação de NO gasoso, folhas destacadas foram mantidas por cinco dias em água, dentro de uma câmara vedada feita de acrílico, sob fluxo contínuo de ar contendo 50 ppm de NO. Os teores de NO e o tempo de exposição foram definidos após testes preliminares. A concentração desse gás dentro da câmara foi monitorada diariamente através de um aparelho de quimioluminescência. O **anexo 1** mostra um esquema de como foi montada a câmara. O controle foi realizado nas mesmas condições anteriormente descritas, mas sem acrescentar os 50 ppm de NO no fluxo de ar. Ao final do tempo de indução, foram analisados os parâmetros do CAM, a porcentagem de água e as concentrações endógenas de NO nas três porções foliares.

Para a aplicação do sequestrador de NO, folhas destacadas foram mantidas por sete dias em uma solução de 30% de PEG 6000. Em um lote dessas folhas, foram adicionados diariamente nos 10 mL de solução de cada borel 100 μ L de 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (*cPTIO*), um sequestrador do NO, de forma que a concentração final ficasse 50 mM. Outro lote permaneceu sem a aplicação desse composto para controle. Ao final do período experimental foram analisados os parâmetros do CAM, emissão de NO e a porcentagem de água nas três porções foliares.

4.6. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância multifatorial (ANOVA) ou a outros testes de comparação de médias adequados aos dados (Tukey ou T de Student).

5. Resultados

5.1. Avaliação das condições fisiológicas das folhas

O primeiro passo para responder as perguntas feitas foi caracterizar a dinâmica temporal do aumento do CAM e da emissão de NO visando constatar uma possível relação entre eles. Primeiramente, foram medidos alguns parâmetros para constatar as condições fisiológicas das folhas destacadas, como porcentagem de água nos tecidos (**figura 2**), potencial hídrico (**figura 3**), proteínas totais (**figura 4**) e conteúdo de clorofilas totais e carotenoides (**figura 5**).

Inicialmente nota-se que a base foliar possui cerca de 10% a mais de água por unidade de peso do que o ápice (**figura 2**).Também de acordo com a **figura 2**, constatou-se que a diminuição do conteúdo de água aconteceu já no primeiro dia de déficit hídrico, tanto na porção basal quanto na apical da folha. No entanto, o ápice de folhas mantidas em PEG parece retornar a valores similares àqueles do controle a partir do quarto dia, ao passo que a base mantém níveis mais baixos de água durante todo o período experimental. Corroborando esses resultados, os valores de potencial hídrico mostram uma queda muito rápida na região apical da folha, sendo que o potencial hídrico da base só vai atingir valores comparáveis aos do ápice depois do quarto dia (**figura 3**).



Figura 2: Porcentagem de água das porções apical (A) e basal (B) de folhas de *G. monostachia* mantidas por até sete dias em água ou em uma solução de PEG a 30%. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).



Figura 3: Potencial hídrico das regiões basal e apical de folhas destacadas mantidas em PEG 30% por até sete dias.

As quantificações de clorofilas e carotenoides mostraram que esses pigmentos são muito mais abundantes na região apical do que na basal (figura 4). Adicionalmente, nota-se que mesmo com a queda na quantidade de água tecidual das folhas, não foi possível ver grandes alterações no conteúdo de clorofilas totais em nenhuma das porções foliares (figura 4A; B). O teor de carotenoides mostra uma queda a partir do quinto dia na porção apical das folhas mantidas em PEG e, levando em conta as diferenças de escala dos gráficos, poucas alterações na porção basal (figura 4C; D). Também é possível notar para a porção basal que existe um incremento de clorofilas e carotenoides ao longo do tempo, tanto para a condição controle como para o tratamento (figura 4), sendo que os dois dias iniciais diferem significativamente dos dois dias finais segundo o teste de Tukey (P<0,05). O conteúdo de proteínas totais se mostra menor nos dias iniciais de exposição ao PEG, mas mostra valores mais altos do que os do controle a partir do quarto dia, tanto na base quanto no ápice da folha (figura 5).



Figura 4: Conteúdo de clorofilas (A, B) e carotenoides (C, D) nas porções apical (A, C) e basal (B, D) de folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em água ou em PEG 30% por até sete dias. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).



Figura 5: Conteúdo de proteínas nas porções apical (A) e basal (B) de folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em água ou em PEG 30% por até sete dias. Asteriscos indicam diferenças estatísticas entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

5.2. Análises dos parâmetros CAM

Quanto à modulação do CAM, foi observado um aumento significativo na atividade da PEPC e no conteúdo de malato acumulado durante a noite em resposta ao PEG a partir do sexto dia, apenas nos ápices das folhas (**figuras 6 e 7**). De modo interessante, também foi possível notar que a quantidade de malato no final do período claro praticamente não varia, ao passo que a quantidade acumulada durante a noite sim (**figura 7**). O conteúdo de citrato mostrou um aumento significativo a partir do quarto

dia na porção apical das folhas mantidas em PEG, mas sua flutuação dia/noite não se mostrou constante.



Figura 6: Atividade da PEPC nas porções apical (A) e basal (B) de folhas de *G. monostachia* mantidas por até oito dias em água ou em PEG 30%. Asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P < 0,05).



Figura 7: Variação no conteúdo de malato (A, B) e citrato (C, D) nas porções apical (A, C) e basal (B, D) de folhas de *G. monostachia* mantidas por até oito dias em água ou em PEG 30%. Barras escuras correspondem ao período noturno. Asteriscos indicam diferenças significativas entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

5.3. Investigação da participação do NO durante a indução ao CAM

A emissão de NO ao longo do período de exposição ao PEG apresentou resultados extremamente interessantes. Conforme mostrado na **figura 8**, a quantidade desse radical livre nos tecidos teve uma tendência bem definida, tanto espacial quanto temporal. Na região basal (**figura 8B**), os valores de emissão de NO são significativamente mais altos nos primeiros dois dias após o início do déficit hídrico. Depois desse período, os valores se mantiveram similares ao controle até o final do experimento. Para a porção apical, foi detectado um aumento significativo na emissão desse radical livre nos dias seis e sete, concomitantemente com o aumento do CAM (**figuras 6, 7 e 8A**).



Figura 8: Unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.), indicando produção de NO nas porções apical (A) e basal (B) de folhas de *G. monostachia* mantidas por até sete dias em água ou em PEG 30%. Asteriscos indicam diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

Durante o sétimo dia de exposição ao PEG foi realizado um detalhamento do perfil de emissão do NO, com medições a cada 4 horas durante 24 horas (**figura 9**). No início do período claro (0h conforme

figura 9) e 4 horas após o início do período escuro (16h, conforme **figura 9**) também foram quantificadas as atividades da enzima PEPC (**figura 10**). Nota-se que a emissão de NO permaneceu significativamente mais alta no ápice durante quase todo o experimento, com exceção dos pontos das 12 e das 24 horas (**figura 9A**). A atividade da PEPC parece aumentar durante o período escuro, mas a diferença entre controle e tratamento, embora significativa para ambos os casos, parece diminuir.



Figura 9: Unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.F.), indicando produção de NO ao longo de 24 horas nas porções apical (A) e basal (B) de folhas de *G. monostachia* mantidas por sete dias em água ou em PEG 30%. Barras cinzas indicam o período escuro do dia. Asteriscos indicam

diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05). As letras maiúsculas na figura A representam a comparação entre os pontos do tratamento com PEG ao longo do tempo, segundo o teste de Tukey (P<0,05).



Figura 10: Atividade da PEPC nos horários coletados no período claro (0h) ou escuro (16h) nas porções apical (A) ou basal (B) de folhas de *G*. *monostachia* mantidas por sete dias em água ou em PEG 30%. Asteriscos indicam diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

A quantificação do teor de proteínas nitrosiladas mostrou uma diminuição no sétimo dia apenas no ápice das folhas mantidas em PEG,

como mostra a **figura 11**. Nesse mesmo dia é possível detectar um aumento na produção de NO e nos parâmetros do CAM (**figuras 6, 7, 8, 9 e 10**).



Figura 11: Conteúdo total de compostos nitrosilados nas porções basal e apical de folhas de *G. monostachia* mantidas por sete dias em água ou em PEG 30%. O asterisco indica diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

Foi feita uma comparação entre o perfil de proteínas nitrosiladas presentes nos ápices de folhas submetidas ou não ao tratamento com PEG por sete dias (**figura 12**). Corroborando os dados de quantificação de compostos nitrosilados, é possível notar que as bandas estão mais intensas no controle (**figura 12C**) do que no tratamento (**figura 12D**). Entre as bandas que apresentam mais diferença, destacam-se uma que está na faixa dos 80 KDa, uma em 10KDa e outra em 20 KDa. Outras bandas com intensidade diferente também foram detectadas na faixa dos 15 e 40 KDa.



Figura 12: Perfil de proteínas S-nitrosiladas separadas em gel de acrilamida/bis-acrilamida (35:1) a 12% dos ápices de folhas de *G. monostachia* submetidas ao tratamento com PEG durante sete dias. A = proteínas do controle não ligadas à estreptavidina. B = Proteínas do tratamento não ligadas à estreptavidina. C = Proteínas nitrosiladas do controle. D = Proteínas nitrosiladas do tratamento com PEG. A coloração foi feita com prata.

5.4. Regulação da atividade de algumas enzimas por nitrosilação em *G. monostachia* (PEPC, MDH, APX, CAT e NADP-ICDH)

Para a avaliação dos efeitos de nitrosilação em algumas enzimas específicas foram usados 2 mM de GSNO (doador de NO). Adicionalmente, um tratamento contendo GSH foi feito para constatar que os efeitos observados seriam consequência de nitrosilação e não de glutationilação. A **figura 13** mostra os resultados observados para a atividade das enzimas PEPC e MDH. A PEPC mostrou uma clara redução na atividade quando tratada com GSH e GSNO, sendo o efeito da GSNO mais pronunciado. A MDH, por outro lado, não teve sua atividade afetada por nenhum dos compostos, indicando que a nitrosilação parece não afetar sua atividade. Por outro lado, a APX e a NADP-ICDH mostraram ser inibidas pela nitrosilação (**figura 14A e C**). A CAT pareceu ser mais sensível à regulação por glutationa do que por GSNO (**figura 14B**). De maneira interessante, todas essas são enzimas que mostram regulação positiva quando as folhas são submetidas ao déficit hídrico, ainda que na porção basal (**figura 15**).



Figura 13: Atividade das enzimas PEPC (A) e MDH (B), extraídas da região apical de folhas de *G. monostachia*, em resposta à aplicação *in vitro* de 2 mM de GSH e GSNO (agente nitrosilante). Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (P<0,05).



Figura 14: Atividade das enzimas APX (A), CAT (B) e NADP-ICDH (C), extraídas de folhas de *G. monostachia*, em resposta à aplicação *in vitro* de 2 mM de GSH e GSNO (agente nitrosilante). Letras diferentes indicam diferenças significativas segundo o teste de Tukey (P<0,05).



Figura 15: Atividade das enzimas APX (A), CAT (B) e NADP-ICDH (C) em folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em água ou em PEG por sete dias. Asteriscos indicam diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P < 0,05).

5.5. Doação e sequestro de NO nas folhas

A aplicação de cPTIO, um sequestrador de NO, em folhas destacadas mantidas em PEG por sete dias mostrou poucas alterações nos parâmetros avaliados (**figura 16**). Conforme esperado, não foram observadas diferenças na porcentagem de água (**figura 16A**). Uma pequena mas significativa queda na produção de NO foi detectada na porção basal das folhas (**figura 16B**), contudo isso não foi detectado nas demais porções. Concomitantemente, os parâmetros indicativos do CAM não mostraram grandes alterações (**figura 16C; D; E**).



Figura 16: Porcentagem de água (A), emissão de NO em unidades arbitrárias de fluorescência - U.A.F. (B), atividade das enzimas PEPC (C) e MDH (D) e acúmulo noturno de malato (E) em folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em PEG com adição diária de 50 mM de cPTIO por sete dias. Asteriscos indicam diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

Para determinar qual seria a melhor condição para a aplicação de NO nas plantas, foram feitos experimentos preliminares variando concentração e tempo de exposição a esse composto. Os resultados desses experimentos são apresentados nas **figuras 17** e **18**. É possível notar que a aplicação de NO, independentemente da concentração usada, provocou um aumento das enzimas PEPC e MDH (**figura 17A; B**). Um aumento correspondente de ácidos orgânicos, no entanto, só ocorreu após cinco dias de aplicação de NO na concentração de 100 ppm (**figura 17C**). Após esse período, as folhas mostravam sinais de início de necrose (resultados não mostrados). Baseando-se nesses testes, optou-se por fazer o experimento com uma concentração de 50 ppm de NO aplicada durante 5 dias.



Figura 17: Atividade da PEPC (A), MDH (B) e acúmulo noturno de malato (C) nas porções basal e apical de folhas de *G. monostachia* mantidas em água e submetidas a 100 ou 50 ppm de NO gasoso. O tempo de exposição variou de três a cinco dias. Foram também colocados os valores obtidos a partir de folhas mantidas em água ou em PEG 30% sem a adição de NO, como controles. Letras indicam diferenças estatísticas entre os vários tratamentos de uma mesma porção, segundo o teste de Tukey (P<0,05).

Os resultados de aplicação de 50 ppm de NO gasoso durante 5 dias são apresentados na **figura 18**. Não foram notadas diferenças quanto à porcentagem de água ao comparar o controle com o tratamento, indicando que não houve déficit hídrico em nenhum dos casos (**figura 18A**). Foi detectada maior emissão de NO apenas nas porções basal e mediana e uma tendência de aumento na porção apical (**figura 18B**). Independentemente dos níveis de emissão de NO observados nas diferentes porções foliares, a aplicação desse gás resultou em aumentos marcantes nas atividades das enzimas PEPC e MDH, assim como no acúmulo noturno de ácidos em todas as porções (**figura 18C; D; E**). Esses resultados apontam fortemente para uma relação causal entre NO e CAM.



Figura 18: Porcentagem de água (A), emissão de NO em unidades arbitrárias de fluorescência - U.A.F. (B), atividade das enzimas PEPC (C) e MDH (D) e acúmulo noturno de malato (E) em folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em água e submetidas ou não a um fluxo constante de 50ppm de NO gasoso por cinco dias. Asteriscos indicam diferença significativa entre controle e tratamento segundo o teste T de Student (P<0,05).

6. Discussão

6.1. Avaliação das condições fisiológicas das folhas

Com base nos níveis de porcentagem de água tecidual (figura 2) foi possível observar claramente que existe uma perda de água pelas folhas em resposta à exposição ao PEG. Mais ainda, a região apical da folha parece recuperar os valores de porcentagem de água cerca de quatro dias após à exposição ao déficit hídrico, enquanto que na região basal isso não é observado. É possível, portanto, que haja uma remobilização de água da base para o ápice da folha e, se isso realmente ocorrer, a base da folha funcionaria como um reservatório de água. De fato, os resultados de potencial hídrico (figura 3) mostram que até o quarto dia o potencial hídrico da região apical da folha permaneceu mais negativo do que o da região basal, fornecendo evidências para o possível transporte de água. Embora esses dados tenham sido obtidos em folhas destacadas, o perfil da perda de água se mostrou muito similar àquela de folhas pertencentes a plantas intactas de G. monostachia (Freschi et al., 2010a), com uma redução significativa do conteúdo hídrico na porção basal e poucas alterações na porção apical.

Embora tenha sido detectada uma redução na porcentagem de água das folhas, isso parece não ter alterado de forma tão drástica alguns parâmetros utilizados para monitorar o grau de estresse sofrido. O conteúdo de clorofilas, por exemplo, mostrou poucas alterações ao longo dos sete dias de exposição ao PEG (**figura 4**). O teor de proteínas parece ter caído nos primeiros dias de déficit hídrico, principalmente na região apical, mas retorna a níveis similares ou superiores aos do controle após o quarto dia (**figura 5A**). A porção basal mostra uma tendência similar, ainda que menos evidente (**figura 5B**). Dessa forma, é possível que o quarto dia de exposição ao PEG seja o ponto a partir do qual alterações bioquímicas começam a se estabelecer, permitindo que a folha responda ao estresse. Provavelmente, mudanças na expressão gênica já devem estar ocorrendo nesse período.

Em um experimento paralelo feito no nosso laboratório foi comparada a porcentagem de água entre folhas destacadas mantidas em PEG 30% com uma planta inteira na qual a mesma solução foi aplicada no tanque (ver **anexo 2**). Mais ainda, as folhas foram divididas em três grupos, de acordo com a sua posição na roseta: folhas jovens (do 3º ao 7º nó), folhas intermediárias (8º ao 12º nó) e folhas maduras (13º ao 17º nó). Esses resultados indicaram que as folhas jovens foram as que mostraram maiores diferenças na perda de água nas porções basal e apical quando as comparamos com folhas ligadas à planta (teste T significativo com p<0,01). As folhas intermediárias mostraram diferenças menos conspícuas (teste T significativo apenas com p<0,05, mas não com p<0,01) e poucas diferenças foram observadas nas folhas maduras. Tendo em vista esse resultado, parece que existe uma priorização das folhas jovens quando elas

59

estão ligadas à planta. Quando destacadas, as folhas parecem se comportar de maneira semelhante em resposta à aplicação de PEG, independente do grupo ao qual pertenciam, uma vez que não foram notadas diferenças significativas na porcentagem de água entre elas. Dessa forma, é possível que o uso de folhas destacadas tenha permitido uma maior sincronia nas respostas à seca.

De fato, já foi sugerida a remobilização de água de tecidos mais velhos para os mais jovens em condições de estresse para diversas espécies (Claeys & Inzé, 2013; Pantin et al., 2013). Essa mesma tendência já foi observada dentro do grupo das bromélias em G. monostachia (Rodrigues et al., 2016) e Vriesea gigantea (Gobara, 2014). Esse caminho da água na planta pode ser devido a um maior acúmulo de solutos compatíveis nas folhas mais jovens, de forma que o potencial hídrico fique mais negativo permitindo a entrada de água (Claeys & Inzé, 2013). Recentemente, foi proposto que diferenças na sensibilidade ao ABA entre folhas jovens e velhas seriam também responsáveis por essa mobilização (Pantin et al., 2013). Esses autores demonstraram que folhas jovens de A. thaliana são menos sensíveis ao ABA, permanecendo com os estômatos abertos mesmo na presença desse hormônio. As folhas mais velhas, por outro lado, fecham os estômatos em resposta a baixas concentrações de ABA. Esse comportamento direcionaria a corrente xilemática e, consequentemente, água e nutrientes para as folhas mais jovens.

O conteúdo de carotenoides caiu nas folhas expostas ao PEG a partir do quarto dia (**figura 4**). Esse é um resultado bastante curioso, uma vez que já foi amplamente proposto que a atuação dos carotenoides poderia aliviar danos ao aparato fotossintético através da diminuição do efeito de ROS produzidas pelo fechamento estomático, condição essa muito provável, uma vez que as folhas permaneceram durante cinco dias expostas ao PEG. Como a folha mostrou maior conteúdo de proteínas, ácidos e atividade enzimática nesse período (**figuras 4, 5, 6 e 7**), indicando algum tipo de aclimatação às condições adversas, provavelmente *G. monostachia* depende de outros mecanismos para a proteção contra a produção de ROS.

De fato, Pikart (2014), através de medições de fluorescência da clorofila a e de pigmentos, sugeriu que o CAM poderia atuar evitando danos aos fotossistemas devido à manutenção de níveis adequados de CO_2 no mesofilo mesmo com os estômatos fechados. Esse possível papel protetor do CAM ainda é bastante discutido na literatura, faltando evidências para afirmar se isso realmente pode ser uma consequência do CAM (Lüttge 2002; 2004). Análises do metabolismo antioxidante em *G. monostachia* indicam que as enzimas parecem não mostrar grandes alterações após oito dias de déficit hídrico (Abreu, 2016– resultados não publicados), indicando que o CAM pode sim ter um papel importante na redução do estresse oxidativo.

Tanto o conteúdo de clorofilas quanto o de carotenoides aumentou significativamente na porção basal da folha ao longo do tempo, ainda que poucas diferenças sejam observadas ao comparar o controle com as folhas mantidas em PEG (figura 4). Esse é um resultado interessante, pois sugere que o destacamento da folha da planta-mãe provocou essa resposta. Possivelmente, as bases das folhas isoladas receberam mais luz do que receberiam no arranjo de roseta, estimulando a síntese de pigmentos nessa região. A irradiância recebida pelas diferentes porções da folha aderida à planta-mãe já foi medida em G. monostachia e foi demonstrado que, de fato, a base foliar recebe menos luz do que as demais porções (Freschi et al., 2010a). Outro dado importante a se levar em consideração diz respeito às mudanças de espectro da luz que chega no ápice e na base da folha, o que poderia fornecer algumas pistas acerca dos fotorreceptores envolvidos no processo de síntese de pigmentos. Por exemplo, estudos utilizando luz vermelha, azul ou vermelho extremo dariam algumas pistas se fotoreceptores como fitocromos, fototropinas ou criptocromos atuariam nesse processo. Somado a isso, nota-se que as folhas mais jovens (que estão mais internas na roseta e provavelmente recebem menos luz) mostraram uma região com pouca clorofila ocupando grande parte do comprimento da folha, se comparadas às folhas mais maduras (ver anexo 3).

Todas essas observações fazem hipotetizar que a luz pode ser um dos sinais que leva à diferenciação dos tecidos da folha em ápice ou base. Dessa forma, o aumento gradual no teor de clorofilas e carotenoides observados na região basal das folhas após o destacamento pode indicar algum tipo de processo fotomorfogênico nessas regiões.

6.2. Análises dos parâmetros CAM

No que diz respeito à regulação do CAM, as mudanças se estabeleceram a partir do sexto dia, conforme indicado pelo aumento na atividade de PEPC e do acúmulo de malato durante a noite, embora tenha sido detectado um aumento pontual na quantidade noturna de malato no quarto dia (**figuras 6 e 7**). Esses dados foram condizentes com os obtidos anteriormente para folhas destacadas e plantas inteiras, tanto em termos de tempo quanto de localização na folha (Freschi et al., 2010a; Mioto & Mercier, 2013). Tanto nos resultados apresentados aqui quanto naqueles obtidos nos trabalhos citados, o aumento do CAM aconteceu com muito mais intensidade na porção apical da folha.

Nos resultados obtidos no presente trabalho, notou-se claramente que o aumento do CAM foi devido a um acréscimo na produção de ácidos durante a noite e não somente à ciclagem de uma reserva de ácidos préexistente (**figura 7**). De fato, o aumento no acúmulo de ácidos se correlaciona com o aumento na atividade da PEPC (**figura 6**), que é a
enzima responsável pela fixação de CO_2 durante a noite em G. monostachia.

Existe um termo conhecido como "CAM latente", usado para indicar espécies que possuem altas quantidades de ácidos mas não mostram variações diárias desses compostos (Schuber & Kluge, 1981). Foi inclusive especulado que essa característica poderia ser considerada um intermediário entre o metabolismo C₃ e o CAM (Cushman & Borland, 2002; Silvera et al., 2010). No caso de *G. monostachia*, porém, nenhuma reserva prévia de ácidos foi detectada antes do aumento no CAM (**figura** 7).

São relativamente raros estudos que monitoram dia-a-dia a modulação do CAM. O único artigo encontrado com esse delineamento constatou que na espécie *Mesembryanthemum crystallinum* ocorre um aumento no acúmulo noturno de ácidos após seis dias do início do estresse salino (Gawronska & Niewiadomska, 2015). Nessa mesma espécie, em experimentos feitos com folhas destacadas, foi detectado aumento na expressão gênica em um intervalo de apenas algumas horas após o início de um tratamento no qual as folhas foram imersas em soluções contendo NaCl e ABA (Taybi & Cushman, 1999).

Ao contrário dos seis dias necessários para o incremento do CAM no presente trabalho (**figuras 6 e 7**), foi detectado que o CAM aumentou em cerca de quatro dias após a exposição ao PEG em plantas intactas de *G*.

monostachia, indicando que as respostas à falta d'água podem ser mais rápidas e intensas se a folha estiver aderida à planta-mãe (Pikart 2014). De fato, a comunicação entre as folhas parece ser um fator determinante nas respostas de déficit hídrico. Conforme demonstrado no experimento paralelo realizado (**anexo 2**), as folhas no contexto da planta sofrem a falta de água de maneira diferente umas das outras, conforme sua posição na roseta ou a sua idade. Ao serem destacadas, as respostas aparentam ser mais uniformes.

Ao compararmos os valores máximos de acúmulo noturno de ácidos em G. monostachia, nota-se que eles são bastante inferiores ao de espécies CAM clássico. que apresentam 0 como Ananas comosus. Mesembryanthemum crystallinum, Kalanchoe daigremontiana, K. pinnata, Clusia rosea e C. minor (Borland et al., 1998; Chen et al., 2002; Hurst et al., 2004; Freschi et al., 2010). Por outro lado, espécies apresentando um CAM mais próximo do "CAM-idling", como Clusia airipoensis e Tillandsia schiedeana sob déficit hídrico, mostraram valores de flutuação de ácidos mais próximos aos obtidos no presente trabalho (Borland et al., 1998; Martin & Adams, 1987). Esse tipo de comparação indica que G. monostachia seria uma espécie que, embora apresente a maquinaria do CAM, não a usa como forma principal de aquisição de carbono. Mesmo assim, o CAM poderia ser importante em momentos onde a entrada de CO₂ atmosférico é baixa. Conforme proposto por Pikart (2014), o CAM em G.

monostachia parece fazer a diferença em situações nas quais há falta de CO_2 nos tecidos, como durante um período de seca. Isso poderia levar à hipótese de que as concentrações de CO_2 poderiam ser um sinal importante para a regulação da maquinaria CAM nesta espécie.

O acúmulo de citrato durante a noite já foi visto em algumas plantas capazes de realizar o CAM, como *Kalanchoe daigremontiana*, *K. pinnata*, *M. crystallinum* e a bromélia *Tillandsia pohliana* (Chen et al., 2002; Freschi et al., 2010b; Gawronska & Niewiadomska, 2015). Mesmo assim, os motivos pelos quais algumas plantas acumulariam citrato ainda não estão claros. A descarboxilação de 1 mol de citrato gera 3 mols de CO_2 contra apenas 1 mol no caso do malato. Em outras palavras, seria possível ter mais CO_2 armazenado em uma molécula de citrato do que de malato. No entanto, a formação de citrato durante a noite não resultaria em um ganho líquido de CO_2 , uma vez que ele não é produzido a partir de uma carboxilação e, portanto, seus precursores têm o mesmo número de carbonos que ele (Lüttge, 2006).

Uma vez que existe a possibilidade de bromélias pertencentes à subfamília Tillandsioideae acumularem também citrato durante a noite (Freschi et al., 2010b), esse composto foi monitorado (**figura 7B**), indicando que o acúmulo cíclico dia/noite parece não ocorrer em G. *monstachia*. Mesmo assim, pode ser notado um aumento desse ânion ao longo dos sete dias de tratamento com PEG na porção apical. De fato,

parece que esse aumento se estabeleceu a partir do terceiro dia, seguindo os teores de proteínas e retomada de valores de porcentagem de água similares ao controle na porção apical (**figuras 2, 5** e 7). Apesar desse acúmulo ser muito pequeno se comparado à variação diária no conteúdo de malato (ver as diferenças entre os eixos das **figuras 7A** e **B** com os da **7C** e **D**), no final do dia as quantidades dos dois ácidos podem ser comparáveis. Embora bastante especulativo, acredita-se que esse aumento de citrato possa se dar devido a um incremento do metabolismo respiratório, relacionado com um provável início das respostas ao déficit hídrico no quarto dia, quando também se detectou uma retomada no teor de proteínas e na porcentagem de água (**figuras 2A** e **5A**).

6.3. Investigação da participação do NO durante a indução do CAM

O monitoramento da emissão de NO ao longo do período de déficit hídrico mostrou um aumento dessa espécie reativa de nitrogênio, do quinto dia em diante na porção apical (**figura 8**). Da mesma forma como foi observado por Mioto & Mercier (2013), o aumento da emissão de NO coincidiu tanto temporal quanto espacialmente com o incremento do CAM. Esses dados apontam para uma possível relação entre esses dois fatores. Essa correlação entre aumento do CAM e emissão de NO também foi observada por Freschi et al. (2010) na espécie *A.comosus*, sugerindo que os dois fenômenos podem estar relacionados. Quando a emissão de NO foi monitorada continuamente por 24 horas após a aplicação de PEG por sete dias, foi visto que ela permanece mais elevada no tratamento em quase todos os horários de coleta na porção apical (**figura 9**). A atividade da PEPC, por sua vez, se mostrou mais elevada durante a noite, tanto no controle quanto no tratamento (**figura 10**). Isso sugere algum tipo de controle na quantidade de enzima disponível, uma vez que a técnica usada para avaliar a atividade dessa enzima focou em sua atividade máxima. Sendo assim, uma das formas prováveis de regulação desse parâmetro é a síntese/degradação da PEPC.

A emissão de NO, por outro lado, não apresentou muitas diferenças se comparamos o período claro com o escuro, sugerindo que esse aumento de atividade da PEPC no escuro não se dá diretamente por causa do NO. Curiosamente, o primeiro horário de coleta do período escuro e o primeiro ponto do período claro seguinte mostraram valores similares entre as folhas tratadas ou não com PEG. Recentemente, Pikart (2014) demonstrou que plantas de *G. monostachia* com restrição hídrica causada por aplicação de PEG 30% apresentaram abertura estomática somente no início da manhã e no final da tarde. Tendo em vista que o NO parece atuar no mecanismo de controle estomático (Bright et al., 2006; García-Mata & Lamattina, 2001), talvez a queda no teor desse radical livre no final da tarde e no início da manhã (ponto das 12 e das 24 horas) na porção apical esteja relacionada com esse padrão de abertura estomática.

Sobre a origem do NO produzido em *G. monostachia*, muito pouco se sabe. Foram feitos alguns testes no nosso laboratório (resultados não mostrados) que apontam para a possibilidade de haver síntese desse radical livre à partir da arginina, através de um ensaio capaz de detectar atividade semelhante à NOS em plantas. Esses resultados, no entanto, permaneceram inconclusivos e tiveram que ser momentaneamente interrompidos. A via de produção baseada na NR não se mostraria uma boa candidata, uma vez que sua atividade não foi detectada sem a aplicação de nitrato na planta e também porque em outras bromélias foi visto que sua atividade parece se concentrar na porção basal da folha (Takahashi et al., 2011), local com menor produção de NO. Uma vez que as plantas usadas neste trabalho foram mantidas sem nenhuma adubação, é de se esperar que a atividade da NR estivesse baixa demais para ser detectada.

Além dos mecanismos de biossíntese, é bastante provável que os mecanismos de turnover do NO estejam envolvidos na manutenção dos níveis endógenos dessa molécula. A nitrosilação de moléculas, por ser reversível, parece ter um papel bastante importante nesse sentido. Infelizmente, técnicas para a quantificação de GSNO se mostraram ineficazes para G. monostachia. Para contornar esse problema, foram feitas tentativas para se medir a quantidade de proteínas nitrosiladas através das técnicas redução com iodo associada à quantificação de por quimioluminescência (Gow et al., 2007) e da quantificação por

espectrofotometria, também conhecida como reação de Saville (Palmer & Gaston, 2008). Mesmo com extensivos testes, ambas se mostraram ineficientes para medições em extratos de *G. monostachia*.

Sendo assim, foi desenvolvida uma técnica nova para dosar a quantidade total de proteínas nitrosiladas. Tal técnica se baseou no princípio apresentado por King et al. (2005), que consistia na fotólise de proteínas ou peptídeos nitrosilados através de luz UV. Na técnica original, era feito um gel de proteínas, com uma série de proteções para que a nitrosilação proteica não se perdesse, e, no final, esse gel era incubado com DAF2 (um fluoróforo usado na detecção de NO) e exposto à luz UV. Dessa forma, o NO liberado das proteínas por fotólise se ligaria imediatamente ao DAF2 e as bandas podiam ser visualizadas. A crítica apresentada a essa técnica na literatura é a sua baixa sensibilidade (Gow et al., 2007). Porém, pensou-se que se fosse possível usar um extrato proteico, o sinal de todas as proteínas seria somado e a sensibilidade do ensaio aumentaria. Assim, mesmo sem identificar as proteínas, seria possível obter uma estimativa da quantidade total de compostos nitrosilados.

Baseando-se nesses indícios, no presente trabalho, desenvolveu-se um protocolo no qual as proteínas no extrato foram parcialmente purificadas através de uma precipitação com acetona, sendo que esse passo permitiu a eliminação de vários possíveis artefatos. Em seguida, foi adicionado o fluoróforo DAR4M às amostras e cada uma delas foi dividida

em uma alíquota que recebe luz UV e outra que permaneceu no escuro. A estimativa do conteúdo de compostos nitrosilados foi feita com base na diferença de fluorescência entre a alíquota exposta ao UV e a que permaneceu no escuro. Os valores obtidos foram comparados a uma curva padrão de GSNO (ver **anexo 4**). Essa técnica mostrou ser altamente reproduzível e também funcionou em testes feitos com outras espécies, como o tomateiro (resultados não mostrados).

Surpreendentemente, houve uma queda na quantidade de compostos nitrosilados na região apical das folhas submetidas ao tratamento com PEG, enquanto a porção basal mostrou poucas alterações (figura 11). A tendência observada no ápice foi também confirmada pelo ensaio do biotinswitch (figura 12). Uma vez que os teores de NO estavam mais altos nas folhas expostas ao PEG, esperava-se que a nitrosilação de compostos seguiria o mesmo padrão. Foram encontrados na literatura alguns trabalhos que também mostraram que a presença de NO e de nitrosotiós não seguem necessariamente a mesma tendência. Maiti et al. (2012), por exemplo, detectaram altas quantidades de S-nitrosotióis, através de técnicas histoquímicas, mas não detectaram uma emissão correspondente de NO em nódulos de Arachis hypogaea. Tanou et al. (2012) também não observaram uma relação clara entre a produção de NO livre e o nível de nitrosilação de proteínas (comparado pelo ensaio de "biotin-switch") em Citrus aurantium durante respostas de adaptação ao frio. Bai et al. (2011) notaram que durante o processo de desidratação do embrião de *Antiaris toxicaria* ocorreu um grande aumento na emissão de NO no terceiro dia de dessecamento, mas, nesse mesmo momento, houve uma queda nos teores de nitrosilação das enzimas glutationa redutase, ascorbato peroxidase e desidroascorbato redutase.

Das proteínas nitrosiladas detectadas, as três principais bandas possuíam tamanho próximo a 80, 10 e 20 KDa. As bandas de 80 e 10 KDa se mostraram mais intensas no controle do que no tratamento. O próximo passo nessa investigação seria sequenciar as proteínas que apresentaram nitrosilação diferencial para poder identificá-las, o que se pretende fazer em breve.

Independente da identidade das proteínas, elas estavam menos nitrosiladas no tratamento, o qual apresentou maior emissão de NO. Acredita-se que, no presente experimento, o aumento de NO possa ser fruto de um processo de desnitrosilação de proteínas. Esses resultados são corroborados tanto pela análise do perfil de proteínas nitrosiladas quanto pela atividade de enzimas em resposta à nitrosilação, conforme será discutido em seguida.

6.4. Regulação da atividade de enzimas por nitrosilação em *G. monostachia*.

Geralmente, observa-se que a nitrosilação de proteínas pode ter impacto positivo, negativo ou neutro sobre a atividade de enzimas (Abat & Deswal, 2009; Yun et al., 2011; Tavares et al., 2014; Begara-Morales et al., 2015; Yang et al., 2015). Para verificar o possível papel da nitrosilação na atividade de algumas enzimas, foi feito um experimento buscando promover essa alteração *in vitro*, investigando qual seria o resultado. Uma vez que a GSNO foi usada como doador de NO, um controle contendo somente água não seria suficiente para afirmar que as alterações detectadas seriam devidas ao NO. Existem casos nos quais a glutationa pode se ligar em resíduos de cisteína, um processo conhecido como glutationilação (Astier et al., 2011; 2012; Begara-Morales et al., 2014). Para poder descartar essa possibilidade, optou-se por fazer um controle adicional com GSH.

Não foram encontrados na literatura resultados referentes a alterações da atividade em resposta à nitrosilação da PEPC nem da MDH. O que foi visto até agora é que na espécie *Kalanchoe pinnata*, uma espécie CAM, a PEPC pode ser nitrosilada pela aplicação de GSNO (Abat et al., 2008). Através de análises de RNA-seq feitas em um trabalho paralelo no nosso laboratório, foram identificadas três isoformas da PEPC em *G. monostachia*, denominadas PEPC1a, PEPC1b e PEPC2. Foi também visto que, dessas três isoformas, a PEPC1a parece ser a mais envolvida com o CAM, uma vez que aumentou sua expressão durante a noite em plantas que sofreram déficit hídrico. A sequência de aminoácidos dessas proteínas foi submetida à análise pelo programa GPS-SNO 1.0, capaz de prever

possíveis sítios de nitrosilação de proteínas. Das três isoformas, a PEPC1a e a PEPC1b mostraram maior probabilidade de nitrosilação do que a PEPC2.

Corroborando essas previsões, a PEPC mostrou uma diminuição da atividade em resposta à GSNO (**figura 13**). Isso é bastante interessante se pensarmos que o conteúdo de proteínas nitrosiladas diminui no ápice das folhas mantidas em PEG (**figuras 11e 12**). Dessa forma, é possível supor que parte do aumento de NO detectado no ápice fosse devido a uma desnitrosilação de proteínas como a PEPC. Já a MDH parece não ser afetada pela nitrosilação.

Para enzimas não diretamente relacionadas ao CAM em *G. monostachia*, foi observado que a APX e a NADP-ICDH mostraram inibição devido à nitrosilação (**figura 14**). De maneira interessante, essas enzimas são mais ativas em folhas de *G. monostachia* sob déficit hídrico (**figura 15**). Para as enzimas do sistema antioxidante, é interessante notar que a APX é inibida tanto por nitração quanto por nitrosilação (resultados não mostrados), enquanto que a CAT mostrou poucas alterações em resposta à nitrosilação. Isso faz com que a atividade da APX seja inibida tanto na presença de NO quanto na de peroxinitrito (o agente que causa nitração em proteínas), ao passo que a CAT é menos sensível ao NO mas também reduz sua atividade com o peroxinitrito. Isso pode ser um mecanismo interessante de controle do sistema antioxidante, uma vez que, em teoria, a atividade da APX seria inibida na presença de NO, ao passo que a CAT dependeria da presença de NO juntamente com o superóxido para que o peroxinitrito fosse formado e a enzima sofresse uma inativação mais forte.

Na literatura, já foi descrito tanto o controle positivo quanto o negativo da APX por nitrosilação. As espécies que mostraram aumento na atividade dessa enzima foram A. thaliana e Pisum sativum (Begara-Morales et al., 2015; Yang et al., 2015), enquanto que, além de G. monostachia, a APX de Nicotiana tabacum também apresentou uma redução na atividade em resposta à nitrosilação (Pinto et al., 2013). É bastante interessante essa diferença de respostas de uma mesma enzima à nitrosilação. Provavelmente, estudos cuidadosos da estrutura de cada uma dessas APXs poderiam ajudar a explicar o porquê dessas diferenças. De qualquer forma, é importante lembrar que um dos substratos da APX é o ascorbato, um composto capaz de quebrar a ligação entre a cisteína e o NO. Sendo assim, no caso de G. monostachia e N. tabacum, a presença de ascorbato poderia aumentar a atividade da enzima. Certamente mais estudos são necessários, mas esse poderia ser um mecanismo interessante de regulação da atividade da APX por um de seus substratos.

O tratamento de plantas inteiras com GSNO ou peroxinitrito causou uma redução na atividade da CAT em tabaco (Arora et al., 2015), mas não foram encontrados trabalhos que mostram a regulação *in vitro* dessa

enzima em resposta às modificações provocadas pelo NO. No entanto, já foi proposto um mecanismo pelo qual o NO poderia causar a inibição da atividade da CAT através da S-nitrosilação. A atividade dessa enzima aparentemente depende de um átomo de ferro contido em um grupo heme, capaz de se ligar ao H_2O_2 . No mecanismo proposto, o NO se ligaria ao ferro e impediria a ligação do H_2O_2 (Arora et al., 2015).

Das cinco enzimas testadas neste trabalho, nenhuma mostrou maior atividade em resposta à nitrosilação. No entanto, quatro delas aumentaram suas atividades na condição de déficit hídrico. Somando-se essas observações com os resultados obtidos de emissão de NO e de nitrosilação de proteínas (**figuras 8, 11 e 12**), é possível supor que exista algum mecanismo de desnitrosilação de proteínas na condição de déficit hídrico, e que o aumento na quantidade de NO detectado seja resultante do desligamento desse radical livre das proteínas. Caso exista esse mecanismo, ele poderia representar uma resposta muito rápida a estímulos, uma vez que não necessitaria da síntese *de novo* de proteínas, deixando mais rápida a adaptação das plantas a condições adversas, como, por exemplo, a falta d'água.

6.5. Doação e sequestro de NO nas folhas

Buscando-se estabelecer uma relação causal entre a presença de NO e a modulação do CAM, procurou-se trabalhar com doação e sequestro dessa molécula. A tentativa de remover o NO endógeno das folhas através da aplicação de cPTIO não se mostrou muito efetiva (figura 16). Mesmo que esse composto tenha sido reposto diariamente na solução do borel, os níveis endógenos de NO se mostraram pouco alterados. De fato, somente na porção basal foi detectada uma pequena queda na emissão de NO, muito inferior à esperada. Acredita-se que o fechamento estomático aliado à pouca entrada de água causados pelo PEG prejudicaram muito o transporte via xilema, impossibilitando o cPTIO de atingir as regiões apicais da folha. Condizente com o fato de que os teores endógenos de NO não mostraram alterações, poucas diferenças foram vistas referentes aos parâmetros indicativos de CAM analisados. Sendo assim, essa parte se mostrou pouco conclusiva no caso de G. monostachia, porque o sequestrador de NO não atingiu todas as regiões da folha. A aplicação de SNP também não mostrou resultados promissores, provavelmente pelo mesmo motivo (dados não mostrados).

Por outro lado, esse tipo de tratamento funcionou em plantas jovens de *A. comosus*, reduzindo os níveis detectáveis de NO mas, mesmo assim, o tratamento não foi suficiente para impedir totalmente o aumento do CAM provocado pelo déficit hídrico (Freschi et al., 2010). Tendo em vista esses resultados, os autores propuseram que provavelmente existe outra via de controle do CAM independente do NO. É provável que o tratamento com cPTIO tenha sido eficaz no abacaxizeiro porque as plantas eram pequenas e o inibidor não necessitava ser transportado por longas distâncias, diferente das folhas destacadas de *G. monostachia* usadas neste trabalho.

Baseando-se nisso, optou-se por não usar uma solução doadora de NO, como o SNP, e sim a aplicação de NO gasoso diretamente às folhas. Por se tratar de uma molécula altamente difusível através das membranas, o gás seria capaz de penetrar em todas as porções da folha. Mais ainda, foi desenhada e confeccionada uma câmara vedada que permitiu que um fluxo de NO passasse pelas plantas (ver **anexo 1**). Dessa forma, a possibilidade de outros gases se acumularem nessa câmara vedada foi bastante reduzida.

Em resposta a esse tratamento, todos os parâmetros relacionados ao CAM mostraram um forte aumento em todas as porções foliares. De todas as concentrações e tempo de exposição testados, a concentração de 50 ppm durante cinco dias foi a que mostrou resultados mais efetivos sem provocar outras respostas visíveis, como necrose (figura 17). Uma vez que foi demonstrado neste trabalho que o NO parece não ativar a PEPC nem a MDH de forma pós-traducional, é possível pensar que o aumento na atividade das enzimas observado em resposta ao NO na figura 17 tenha se dado em nível de expressão gênica. Somado a isso, como foram detectadas alterações em ambas as enzimas, é possível que o NO esteja regulando algum elemento *upstream* dessas enzimas e não elas diretamente. Freschi et al. (2010) encontraram resultados similares em *A. comosus*. Nessas plantas, o tratamento com um doador de NO foi capaz de aumentar a atividade das

enzimas PEPC, MDH e PEPCK (esta última relacionada com a descarboxilação do malato no ciclo CAM). Uma vez que os ensaios de atividade usados em Freschi et al. (2010) eram similares aos do presente trabalho, acredita-se que no caso do abacaxizeiro essas mudanças também foram devidas a diferenças de expressão gênica e não à nitrosilação direta dessas enzimas.

Embora a atividade das enzimas PEPC e MDH tenha mostrado aumento mesmo após três dias de aplicação de NO, um maior acúmulo noturno de ácidos só foi se manifestar após, no mínimo, cinco dias de tratamento. Isso poderia sugerir que as mudanças que permitiriam o acúmulo de ácidos demorou mais para ocorrer (pelo menos dois dias), se as comparamos com as mudanças na atividade enzimática. Baseando-se nessa observação, é possível supor um papel múltiplo da sinalização do NO, com alguns eventos mais imediatos, como regulação de atividade de enzimas, e outros tardios, como o acúmulo de ácidos durante a noite no vacúolo.

Conforme esperado, as folhas tratadas com NO mostraram maior emissão desta espécie reativa de nitrogênio (**figura 18**). Intrigantemente, a maior alteração na quantidade de NO ocorreu na região basal da folha, ao passo que na região apical o aumento não foi significativo. Isso leva a especular que podem existir diferenças quanto ao *turnover* desse composto de acordo com a porção foliar ou transporte de uma porção para outra. Quantificações de compostos nitrosilados nesses tratamentos com NO certamente forneceriam mais pistas de como as folhas estão lidando com o NO exógeno.

É bastante comum encontrar na literatura trabalhos que envolvem doação ou sequestro de NO, principalmente como uma forma de avaliar sua participação em respostas de estresse (Mioto et al., 2014). No entanto, são relativamente raros os trabalhos que buscam investigar os mecanismos por trás dessas respostas.

No caso do presente trabalho, foi demonstrado que o mecanismo de atuação do NO parece ser bastante complexa. Também não se pode descartar a possibilidade de uma atuação indireta desse composto. Por exemplo, sabe-se que uma resposta comum à aplicação de NO é o fechamento dos estômatos. Também não se descarta a possibilidade de que o CAM seja regulado por uma limitação de CO₂. Sendo assim, o NO poderia estar causando o fechamento estomático e, consequentemente, uma limitação de CO₂, o que seria suficiente para causar o aumento do CAM. Alterações no estado redox das folhas também poderiam ser outros mecanismos indiretos pelos quais o NO poderia atuar positivamente sobre o CAM.

7. Conclusões

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, algumas conclusões podem ser traçadas.

Conclui-se que:1) o tratamento de déficit hídrico foi efetivo, uma vez que as folhas destacadas de *G. monostachia* submetidas à deficiência hídrica mostraram uma queda na porcentagem de água nos dias iniciais de estresse tanto na porção basal quanto na apical. Após o quarto dia, no entanto, o teor de água parecem se restabelecer na porção apical. Simultaneamente, houve um aumento na quantidade de proteínas e citrato na folha. Esses resultados, somados ao fato de que os teores de pigmentos mostraram pouca alteração ao longo desse período, indicam que a planta estava metabolicamente ativa e respondendo ao tratamento;

2) G. monostachia parece levar seis dias para apresentar um aumento do CAM, avaliado pelo acúmulo noturno de malato e atividade da enzima PEPC. Essa resposta está presente apenas na porção apical da folha. Adicionalmente, o principal ácido gerado pela carboxilação noturna em G. monostachia é o ácido málico;

3) existe um aumento significativo de NO no ápice das folhas após seis dias de exposição ao PEG, concomitante com o aumento do CAM. O teor de proteínas nitrosiladas, no entanto, apresenta uma queda, indicando que a produção aumentada de NO não necessariamente resultou em uma maior quantidade de compostos nitrosilados. É possível que o aumento na emissão de NO seja devido a um processo de desnitrosilação de proteínas. Corroborando essa possibilidade, constatou-se que a nitrosilação atua

negativamente na atividade das enzimas PEPC, APX e NADP-ICDH. A CAT e a MDH, por outro lado, mostraram poucas alterações;

4) a aplicação de NO exógeno nas folhas mantidas em água promove um aumento no CAM, tanto em nível de atividade enzimática (PEPC e MDH) quanto em nível de acúmulo noturno de ácidos. Mesmo assim, a resposta enzimática parece ser mais rápida se comparada ao acúmulo de ácidos durante a noite. Uma vez que o NO atua negativamente no controle pós-traducional dessas enzimas (via S-nitrosilação), acredita-se que o aumento de atividade da PEPC e MDH em resposta à aplicação de NO seja devido às diferenças de expressão gênica e não à ligação direta do NO nessas proteínas.

8. Perspectivas

Mesmo trazendo muitas novidades referentes ao metabolismo do NO, ainda restam muitos questionamentos de como o NO atuaria na modulação do CAM em *G. monostachia*. Com base nos resultados obtidos, seria possível desenhar uma série de novos experimentos, visando responder a perguntas como:

Qual seria a sequência de aminoácidos das proteínas que mostraram diferenças no padrão de nitrosilação? O que aconteceria com a expressão de genes da PEPC ou da MDH em resposta ao NO?Uma vez que a PEPC parece apresentar isoformas relacionadas e não relacionadas ao CAM, será

que elas responderiam ao NO de forma diferente ao longo do tempo? Seriam essas diferenças as responsáveis pela defasagem observada entre o aumento da atividade das enzimas e o aumento no acúmulo noturno de ácidos em resposta ao tratamento com NO? O NO teria um efeito indireto sobre a modulação do CAM (por meio de alterações na concentração de CO₂-via fechamento estomático ou ROS nos tecidos, por exemplo) ou ele seria capaz de regular diretamente algum fator de transcrição que resultaria na diferença de expressão de enzimas?

Embora tenha sido mostrado neste trabalho que o NO tem um papel importante no metabolismo da planta sob déficit hídrico, ainda resta descobrir se ele seria um sinal específico do CAM ou um sinal indireto que regularia respostas mais gerais relacionadas ao déficit hídrico.

9. Resumo

Guzmania monostachia é uma bromélia-tanque epífita que apresenta uma alta plasticidade fotossintética, sendo capaz de regular positivamente o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em resposta ao déficit hídrico. Também foi visto para essa espécie que o incremento do CAM se dá de forma diferente ao longo do comprimento da folha, sendo mais intenso na região apical do que na basal. Trabalhos anteriores indicaram que o óxido nítrico (NO) parece estar envolvido na regulação do CAM, mas nada se sabe dos mecanismos pelos quais isso ocorre. Uma vez que parecem não

existir receptores específicos de NO, acredita-se que ele seja capaz de se ligar diretamente às proteínas, através de um processo conhecido como nitrosilação. O presente trabalho visou determinar se o NO estaria atuando na regulação do CAM em G. monostachia através da nitrosilação de proteínas relacionadas a esse metabolsimo. Para tanto, foram feitos três experimentais. No primeiro, folhas destacadas de desenhos G. mosnostachia foram mantidas por 7 dias em água (controle) ou em uma solução contendo 30% de PEG (déficit hídrico). Durante esse período, foram monitorados parâmetros indicativos de estresse (porcentagem de água, potencial hídrico, além dos teores de clorofilas, carotenoides e proteínas), CAM (atividade da fosfoenolpiruvato carboxilase - PEPC - e acúmulo noturno de malato e citrato) e emissão de NO. Todas as análises foram feitas nas porções basal e apical das folhas. Ao final dos 7 dias de escassez hídrica, também foram feitas dosagens de nitrosotióis totais e a visualização em gel de proteínas nitrosiladas na porção apical. O segundo experimento visou verificar a modulação da atividade de enzimas pela nitrosilação. Para tanto, extratos proteicos de folhas de G. monostachia foram incubados com glutationa reduzida (GSH) ou S-nitrosoglutationa (GSNO) para, em seguida, verificar diferenças nas atividades das enzimas PEPC, malato desidrogenase (MDH), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT) e isocitrato desidrogenase dependente de NADP⁺ (NADP-ICDH). No terceiro experimento foi feita a aplicação do sequestrador de NO 2-(4carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) ou de gasoso em folhas destacadas mantidas em PEG ou água, NO respectivamente. Os resultados mostraram que o aumento do CAM se dá seis dias após o início do tratamento de déficit hídrico, concomitantemente com o aumento na produção de NO. Esses dois fenômenos ocorreram somente na porção apical da folha. A quantidade de proteínas nitrosiladas, no entanto, diminuiu em resposta ao déficit hídrico nesta porção, indicando que o aumento na emissão de NO pode ser oriundo de uma desnitrosilação de proteínas. De fato, a atividade de três (PEPC, APX e NADP-ICDH) das cinco enzimas analisadas mostraram uma diminuição em resposta ao tratamento com GSNO. Dessa forma, o NO parece não se ligar diretamente às enzimas do CAM para regular sua atividade. Mesmo assim, a aplicação de NO gasoso causou um aumento em todos os parâmetros relacionados ao CAM após 5 dias, sugerindo algum tipo de controle transcricional sobre genes relacionados a esse tipo de fotossíntese.

10. Abstract

Guzmania monstachia is an epiphytic tank-bromeliad capable of upregulating CAM under water deficit. Moreover, the increase in CAM is stronger in the apical portion of the leaf, when compared to the base. Nitric oxide (NO) is a signaling molecule involved in the regulation of CAM, but the mechanisms underlying this phenomenon are still largely unknown. NO

is capable of interacting with proteins through a process known as nitrosylation. Here, we investigated whether NO could regulate CAM by protein nitrosylation. In order to do so, we performed three experiments. In the first one, detached leaves were maintained for 7 days in water or in a solution containing 30% of poliethylene glycol 6000 (PEG). During this period, the water percentage, water potential, contents of chlorophylls and carotenoids, phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) activity, nocturnal malate and citrate accumulation, and NO emission were monitored daily in the basal and apical portions of the leaf. At the seventh day of the water shortage, quantification of total nitrosothiols and in-gel visualization of nitrosylated proteins were also performed in the apical portion. The second experiment consisted in incubating proteic extracts of G. monostachia with reduced glutathione (GSH) or S-nitrosoglutathione (GSNO) to assess the impact of nitrosylation in enzymatic activity. The enzymes selected to this step were PEPC, malate dehydrogenase (MDH), ascorbate peroxydase (APX), catalase (CAT) and NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-ICDH). The third experiment consisted in the application of the scavenger 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-NO óxido (cPTIO) or gaseous NO to leaves maintained in water or in PEG 30%, respectively. The results show that there was an increase of both CAM and NO in the leaf apex at the sixth day of water deficit. The level of nitrosylated proteins, however, decreased in this portion, indicating that the

emission of NO may be the result of a de-nitrosylation process. In fact, the activity of three (PEPC, APX and NADP-ICDH) out of five enzymes analyzed decreased with nitrosylation. Therefore, NO does not regulate directly the activity of CAM enzymes. Nevertheless, exogenous NO increased all of the assayed CAM parameters after 5 days, indicating transcriptional control of CAM-related genes.

11. Referências bibliográficas

- ABAT, J.K.; MATTOO, A.; DESWAL, R. (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *FEBS Journal* 275: 2862-2872.
- ABAT, J.K.; DESWAL, R. (2009) Differential modulation of Snitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in Snitrosylation of Rubisco is responsible for the inactivation of its carboxylase activity. *Proteomics* 9: 4368-4380.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYZAK-WIECZOREK, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* 172: 876-887.
- ARORA, D.; JAIN, P.; SINGH, N.; KAUR, H.; BHATLA, S.C. (2015) Mechanisms of nitric oxide crosstalk with reactive oxygen species

scavenging enzymes during abiotic stress tolerance in plants. *Free Radical Res.* 5762: 1-44.

- ASTIER, J.; RASUL, S.; KOEN, E.; MANZOOR, H.; BESSON-BARD,
 A.; LAMOTTE, O.; JEANDROZ, S.; DURNER, J.; LINDERMAYR, C.;
 WENDEHENNE, D. (2011) S-nitrosylation: an emerging posttranslational protein modification in plants. *Plant Sci.* 181: 527-533.
- ASTIER, J.; KULIK, A.; KOEN, E.; BESSON-BARD, A.; BOURQUE, S.; JEANDROZ, S.; LAMOTTE, O.; WENDEHENNE, D. (2012) Protein Snitrosylation: what's going on in plants? *Free Radical Biol. Med.* 53: 1101-1110.
- BAI, X.; YANG, L.; TIAN, M.; CHEN, J.; SHI, J.; YANG, Y.; HU, X.
 (2011) Nitric oxide enhances desiccation tolerance of recalcitrant *Antiaris toxicaria* seeds via protein S-nitrosylation and carbonylation. *PloS ONE* 6: 1-5.
- BARROSO, J.B.; CORPAS, F.J.; CARRERAS, A.; RODRÍGUES-SERRANO, M.; ESTEBAN, F.J.; FERNÁNDES-OCAÑA, A.; CHAKI, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; VADERRAMA, R.; SANDALIO, L.M.; DEL RÍO, L.A. (2006) Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J. Exp. Bot.* 57: 1785-1793.
- BAUDOUIN, E. (2010) The language of nitric oxide signaling. *Plant Biology 13:* 233-242.

- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta 210*: 215-221.
- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. (2001) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* 6: 508-509.
- BENZING, D.H. (1998) Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change 39:* 519– 540.
- BEGARA-MORALES, J.C.; SÁNCHES-CALVO, B.; CHAKI, M.;
 VALDERRAMA, R.; MATA-PÉREZ, C.; LÓPEZ-JARAMILLO, J.;
 PADILLA, M.N.; CARRERAS, A.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B.
 (2014) Dual regulation of cytosolic ascorbate peroxidase (APX) by
 tyrosine nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 65: 527-538.
- BEGARA-MORALES, J.C.; SÁNCHES-CALVO, B.; CHAKI, M.;
 MATA-PÉREZ, C.; VALDERRAMA, R.; PADILLA, M.N.; LÓPEZ-JARAMILLO, J.; LUQUE, F.; CORPAS, F.J.; BARROSO, J.B. (2015)
 Differential molecular response of monodehydroascorbate reductase and glutathione reductase by nitration and S-nitrosylation. *J. Exp. Bot.* 65: 527-538.
- BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. (2008) New insightsinto nitric oxide signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.59*: 21-39.

- BETHKE, P.C.; BADGER, M.R. JONES, R.L. (2004) Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *The Plant Cell 16:* 332-341.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; AOYAMA, N.; GHUNG, Y-Y.; STILL, D.W.; JONES, R.L. (2007) The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Phys.* 143: 1173-1188.
- BORLAND, A.M.; ZAMBRANO, V.A.B.; CEUSTERS, J.; SHORROCK,K. (2011) The photosynthetic plasticity of Crassulacean acid metabolism:an evolutionary innovation for sustainable productivity in a changingworld. *New Phytol. 191:* 619-633.
- BORLAND, A.M.; TÉCSI, L.I.; LEEGOOD, R.C.; WALKER, R.P. (1998) Inducibility of Crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterization and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta 205:* 342-351.
- BORLAND, A. M.; HARTWELL, J.; WESTON, D.J.; SCHLAUCH, K.A.;
 TSCHAPLINSKI, T.J.; TUSKAN, G.A.; YANG, X.; CUSHMAN, J.C.
 (2014) Engineering Crassulacean acid metabolism to improve water-use efficiency. *Trends in plant sci.* 19: 327-338.
- BOTTARI, S.P. (2015) Protein tyrosine nitration: a signaling mechanism conserved from yeast to man. *Proteomics 15:* 185-187.

- BRADFORD, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T.; WIR, I.S.; NEILL, S.J.
 (2006) ABA-induced NO generation and stomatal closure in *Arabidopsis* are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant Journal 45:* 113-122.
- CHEN, L.S.; LIN, Q.; NOSE, A. (2002) A comparative study on diurnal changes in metabolite levels in the leaves of three Crassulacean acid metabolism (CAM) species, *Ananas comosus, Kalanchoë daigremontiana* and *K. pinnata*. *J. Exp. Bot.* 53: 341-350.
- CLAEYS, H.; INZÉ, D. (2013) The agony of choice: how plants balance growth and survival under water-limiting conditions. *Plant Phys. 162:* 1768-1779.
- CORPAS, F.J.; DEL RIO, L.A.; BARROSO, J.B. (2007) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *TRENDS in Plant Science 12* (10): 436-438.
- CORPAS, F.J.; CHAKI, M.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.;
 VALDERRAMA, R.; PALMA, J.M.; CARRERAS, A. (2008)
 Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant Cell Physiol 49:* 1711-1722.
- CORPAS, F.J.; CHAKI, M.; LETERRIER, M.; BARROSO, J.B. (2009) Protein tyrosine nitration. *Plant Signaling & Behavior 4 (10):* 920-923.

- CRAWFORD, N.M.; GALLI, M.; TISCHNER, R.; HEIMER, Y.M.; OKAMOTO, M.; MACK, A. (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci. 11:* 526-527.
- CRISTOPHER, J.T.; HOLTUM, J.A.M. (1998) Carbohydrate partitioning in the leaves of Bromeliaceae performing C₃ photosynthesis or Crassulacean acid metabolism. *Aust. J. Plant Physiol.* 25: 371-376.
- CUETO, M.; HERNFINDEZ-PERERA, O.; MARTIN, R.; BENTURA,
 M.L.; RODRIGO, J.;LAMAS, S.; GOLVANO, M.P. (1996) Presence of
 nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*.
 FEBS letters 398: 159-164.
- CUSHMAN, J.C.; BORLAND, A.M. (2002) Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment 25:* 295–310.
- DEEB, R.S.; NURIEL, T.; CHEUNG, C.; SUMMERS, B.; LAMON,
 B.D.; GROSS, S.S.; HAJJAR, D.P. (2013) Characterization of a cellular denitrase activity that reverses nitration of cyclooxygenase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 305: H687–H698.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature 394:* 585-588.
- DESIKAN, R., GRIFFITS, R., HANCOCK, J., NEILL, S.(2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation

is required for abscisic acidinduced stomatal closure in Arabidopsis thaliana. PNAS 99: 16314-16318.

- DODD, A.N.; BORLAND, A.M.; HASLAM, R.P.; GRIFFITHS, H.;
 MAXWELL, K. (2002) Crassulacean acid metabolism: plastic, fantastic.
 J. Exp. Bot. 53: 569-580.
- DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:* 10328-10333.
- DURNER, J.; KLESSIG, D.F. (1999) Nitric oxide as signal in plants. *Cur. Opin.Plant Biol. 2:* 369-374.
- FORESI, N.; CORREA-ARAGUNDE, N.; PARISI, G.; CALÓ, G.; SALERNO,G.; LAMATTINA, L. (2011) Characterization of a nitric oxidesynthase from the plant kingdom: NO generation from the green algaOstreococcus tauris light irradiance and growth phase dependent. The Plant Cell 22: 3816-3830.
- FORESI, N.; MAYTA, M.L.; LODEYRO, A.F.; SCUFFI, D.; CORREA-ARAGUNDE, N.; GARCÍA-MATA, C.; CASALONGUÉ, C.; CARRILLO, N.; LAMATTINA, L. (2015) Expression of the tetrahydrofolate-dependent nitric oxide synthase from the green alga *Ostreococcus tauri* increases tolerance to abiotic stresses and influences stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant J.* 82: 806-821.

- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M.A.; DOMINGUES, D.S.; PURGATTO,
 E.; VANSYLUS, M.A.; MAGALHÃES, J.R.; KAISER, W.M.; MECIER,
 H. (2010) Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiol 4:* 1971-85.
- FRESCHI, L.; TAKAHASI, C.A.; CAMBUI, C.A.; SEMPREBOM, T.R.;
 CRUZ, A.B.; MIOTO, P.T.; VERSIEUX, L.M.; CALVENTE, A.;
 LATANSIO-AIDAR, S.R.; AIDAR, M.P.M.; MERCIER, H. (2010a)
 Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform
 distinct functions in response to water shortage. *J Plant Physiol*, 167(7): 526-533.
- FRESCHI, L.; RODRIGUES, M.A.; TINÉ, M.A.S.; MERCIER, H. (2010b) Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. *J. Plant Phys.* 167: 1577-1583.
- FRESCHI, L.; MERCIER, H. (2011) Connecting environmental stimuli and Crassulacean acid metabolism expression: phytohormones and other signaling molecules. In: Lüttge, U; Beyschlag, W; Büdel, B; Francis, D. (Org.). Progress in Botany. *Berlin Heidelberg: Springer-Verlag GmbH* 73: (no prelo)

- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci. 8:* 20-26.
- GARCÍA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2007) Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide 17:* 143-151.
- GAWRONSKA, K.; NIEWIADOMSKA, E. (2015) Participation of citric acid and isocitric acid in the diurnal cycle of carboxylation and decarboxylation in the common ice plant. *Acta Physiol. Plant 37:* 60-68.
- GOBARA, B.N.T. (2014)Caracterização da capacidade de indução ao
 CAM em plantas de *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae) sob déficit hídrico.
 Dissertação apresentada para o título de Mestre em ciências no
 departamento de Botânica IB Universidade de São Paulo.
- GOW, A.; DOCTOR, A.; MANNICK, J.; GASTON, B. (2007) S-Nitrosothiol measurements in biological systems. *J. Chromatography B* 851: 140-151.
- HASLAM, R.; BORLAND, A.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. (2003)
 Physiological responses of the CAM epiphyte *Tillandsia usneoides* L.
 (Bromeliaceae) to variations in light and water supply. *J. Plant Physiol. 160:* 627-634.
- HE,Y.; TANG, R-H.; HAO, Y.; STEVENS, R.D.; COOK, C.W.; AHN, S.M.; JING, L.; YANG, Z.; CHEN, L.; GUO, F.; FIORANI, F.;

JACKSON, R.B.; CRAWFORD, N.M.; PEI, Z-M. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition *Science 305:* 1968-1971.

- HERRERA, M.; HONG, N.J.; GARVIN, J.L. (2006) Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* 48:157–164.
- HERRERA, A. (2009) Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany 103:* 645–653.
- HUNG, K.T.; KAO, C.H. (2003) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J. Plant Physiol. 160:* 871–879.
- HURST, A.C.; GRAMS, T.E.E.; RATAJCZAK, R. (2004) Effects of salinity, high irradiance, ozone, and ethylene on mode of photosynthesis, oxidative stress and oxidative damage in the C3/CAM intermediate plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Envir.* 27: 187-197.
- KERBAUY, G.B.; TAKAHASHI, C.A.; MATIZ, A.; MATSUMURA, A.;
 HAMACHI, L.; FÉLIX, L.M.; PEREIRA, P.N.; FRESCHI, L.;
 MERCIER, H. (2012) Crassulacean acid metabolism in epiphytic orchids:
 current knowledge, future perspectives In: Najafpour, M.M. (2012)
 Applied Photosynthesis. InTech. pp. 81-104.
- KING, M.; GILDEMEISTER, O.; GASTON, B.; MANNICK, J.B. (2005)
 Assessment of S-nitrosothiols on diaminofluorescein gels. *Anal. Bioch.*346: 69-76.

- KLEPPER, L. (1979) Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment 13:* 537-542.
- KNUDSON, L. (1946) A new nutrient solution for the germination of orchid seed. *American Orchid Society Bulletin 14:* 214- 217.
- LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. (2003) Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule.*Annu. Rev. Plant Biol.54:*109-136.
- LAUBE, S.; ZOTZ, G. (2003) Which abiotic factors limit vegetative growth in a vascular epiphyte? *Functional Ecology17:* 598-604.
- LEITNER, M.; VANDELLE, E.; GAUPELS, F.; BELLIN, D.; DELLEDONNE, M. (2009) NO signals in the haze: nitric oxide signaling in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 451-458.
- LIBOUREL, I.; BETHKE, P.C.; DE MICHELE, R.; JONES, R.L. (2006) Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta 223:* 813-820.
- LINDERMAYR, C.; SAALBACH, G.; DURNER, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 137 (3): 921-930.
- LIU, W.Z.; KONG, D.D.; GU, X.X.; GAO, H.B.; WANG, J.Z; XIA, M.; GAO, Q.; TIAN, L.L.; XU, Z.H.; BAO, F.; HU, Y.; YE, N.S.; PEI, Z.M.;

HE, Y.K. (2013) Cytokinins can act as suppressors of nitric oxide in Arabidopsis. PNAS 110(4): 1548-1553.

- LOESCHEN, V.S.; MARTIN, C.E.; SMITH, M.; EDER, S.L (1993) Leaf anatomy and CO₂recycling during Crassulacean acid metabolism in twelve epiphytic species of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Int. J. Plant Sci.* 154: 100-106.
- LOUNIFI, I.; ARC, E.; MOLASSIOTIS, A.; JOB, D.; RAJJOU, L.; TANOU, G. (2013) Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. *Proteomics* 13: 568-578.
- LOZANO-JUSTE, J.; LEÓN, J. (2011) Nitric Oxide Regulates DELLA Content and PIF expression to promote photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology 156:* 1410-1423.
- LÜTTGE, U. (2002) CO₂-concentrating: consequences in Crassulacean acid metabolism. *J. Exp. Bot.* 53: 2131-2142.
- LÜTTGE, U. (2004) Ecophysiology of Crassulacean acid metabolism (CAM). *Annals of Botany 93:* 629-652.
- LÜTTGE, U. (2006) Photosynthetic flexibility and ecophysiological plasticity: questions and lessons from *Clusia*, the only CAM tree, in the neotropics. *New Phytologist 171:* 7-25.
- MAITI, D.; SARKAR, T.S.; GHOSH, S. (2012) Detection of S-nitrosothiol and nitrosylated proteins in *Arachis hypogaea*functional nodule: response of the nitrogen fixing symbiont. *PLOS one 7:* 1-5.

- MARTIN, C.E.; ADAMS, W.W. (1987) Crassulacean acid metabolism, CO₂-recycling, and tissue desiccation in the mexican epiphyte *Tillandsia schiedeana* Steud (Bromeliaceae). *Photos. Research 11:* 237-244.
- MATIZ, A.; MIOTO, P.; MAYORGA, A.Y.; FRESCHI, L.; MERCIER, H.
 (2013). CAM photosynthesis in bromeliads and agaves: what can we learn from these plants? In: Dubinsky, Z. (2013) Photosynthesis.
 InTech. DOI: 10.5772/56219.
- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; YOUNG, A.J. (1994) Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C,-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. *Functional Ecology 8:* 746-754.
- MINOCHA, R.; MARTINEZ, G.; LYONS, B.; LONG, S. (2009) Development of a standardized methodology for quantifying total chlorophyll and carotenoids from foliage of hardwood and conifer tree species. *Canadian J. Forest Res.* 39: 849-861.
- MIOTO, P.; MERCIER, H. (2013) Abscisic acid and nitric oxide signaling in two different portions of detached leaves of *Guzmania monostachia* with CAM up-regulated by drought. *J. Plant Physiol.* 170: 996-1002.
- MIOTO, P.; FRESCHI, L.; MERCEIR, H. (2014) Phytohormones and nitric oxide interactions during abiotic stress responses. In:Khan M.N. et al. (eds.), Nitric Oxide in Plants: Metabolism and Role in Stress Physiology. Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-06710-0_13
- MIOTO, P.; RODRIGUES, M.A.; MATIZ, A.; MERCIER, H. (2015)
 CAM-like traits in C₃ plants: biochemistry and stomatal behavior. In:
 Lüttge, U.; Beyschlag, W. (2014) Progress in Botany 76 DOI: 10.1007/978-3-319-08807-5 8.
- NEILL, S.J., DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.* 159: 11-35.
- NEILL, S.J., BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T.; HARRISON,
 J.; WILSON, I. (2008) Nitric oxide evolution and perception. *J. Exp. Bot.*59 (1): 25-35.
- NIEVOLA, C.C.; KRAUS, J.E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER,
 - H. (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C₃
 photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant 41:* 832-387.
- NINNEMANN, H.; MAIER, J. (1996) Implications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem. Photobiol.* 64: 393-398.
- NOWAK E.J.; MARTIN C.E. (1997) Physiological and anatomical responses to water deficits in the CAM epiphyte *Tillandsia ionantha* (Bromeliaceae). *Int. J. Plant Sci. 158:* 818-826.
- OWEN, N.A.; GRIFFITHS, H. (2013)A system dynamics model integrating physiology and biochemical regulation predicts extent of

Crassulacean acid metabolism (CAM) phases. *New Phytologist 200:* 1116-1131.

- PALAVAN-UNSAL, N.; ARISAN, D. (2009) Nitric oxide signalling in plants. *Bot. Rev.* 75: 203-229.
- PALMER, L.A.; GASTON, B. (2008) S-Nitrosothiol assays that avoid the use of iodine.*Methods Enzymol.* 07: 157-176.
- PANTIN, F.; RENAUD, J.; BARBIER, F.; VAVASSEUR, A.; THIEC,
 D.L.; ROSE, C.; BARIAC, T.; CASSON, S.; MCLACHLAN, D.H.;
 HETHERINGTON, A.M.; MULLER, B.; SIMONNEAU, T. (2013)
 Developmental priming of stomatal sensitivity to abscisic acid by leaf
 microclimate. *Curr. Biol. 23:* 1805-1811.
- PETERS, W.; BECK, E.; PIEPENBROCK, M.; LENZ, B.; SCHIMITT, J.M. (1997) Cytokinin as a negative effector of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in *Mesembryanthemum crystallinum*. J. Plant Physiol. 151: 362-367.
- PIKART, F.C. (2014) Heterogeneidade fotossintética em folhas de *Guzmania monostachia* (L) RUSBY ex MEZ (BROMELIACEAE).
 Dissertação apresentada para a obtenção do título de mestre em Biologia Vegetal.
- PINTO, M.C.; LOCATO, V.; SGOBBA, A.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; GADALETA, C.; DELLEDONNE, M.; DE GARA, L. (2013) S-

nitrosylation of ascorbate peroxidase is part of programmed cell death signaling in tobacco bright yellow-2 cells. *Plant Phys. 163:* 1766-1775.

- POPP M.; JANETT H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol.* 157: 649-656.
- PLANCHET, E.; GRUPTA, K.J.; SONODA, M.; KAISER, W.M. (2005) Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. *Plant J. 41:* 732-743.
- ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* 53 (366): 103-110.
- ROUHIER, N.; CERVEAU, D.; COUTURIER, J.; REICHHELD, J.P.;
 REY, P. (2015) Involvement of thiol-based mechanisms in plant development. *Biochimica et Biophysica Acta 1850:* 1479-1496.
- RUMER, S.; GUPTA, K.J.; KAISER, W.M. (2009) Plant cells oxidize hydroxylamines to NO. J. Exp. Bot. 60 (7):2065-2072.
- SAITO, S.; YAMAMOTO-KATOU, A.; YOSHIOKA, H.; DOKE, N.; KAWAKITA, K. (2006) Peroxynitrite generation and tyrosine nitration in defense responses in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 47:689-697.

- SAKAI, W.S.; SANDFORD, W.G. (1980) Ultrastructure of the waterabsorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Ann. Bot.* 46: 7-11.
- SAKIHAMA, Y.; NAKAMURA, S.; YAMASAKI, H. (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* 43: 290-297.
- SANTOS, I.; SALEMA, R. (1992) Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. *Plant Science 84:*145-152.
- SCHMITT, J.M; PIEPENBROCK, M. (1992) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase and Crassulacean acid metabolism induction in *Mesembryanthemum crystallinum* L. by cytokinin: Modulation of leaf gene expression by roots? *Plant Physiology 99(4):* 1664-1669.
- SCHUBER, M.; KLUGE, M. (1981) In situ studies on Crassulacean acid metabolism in *Sedum acre* L. and *Sedum mite* Gil. *Oecologia 50:* 82-87.
 SELIGMANN, K.; SAVIANI, E.E.; OLIVEIRA, H.C.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; SALGADO, I. (2008). Floral transition and nitric oxide emission during flower development in *Arabidopsis thaliana* is affected in nitrate reductase-deficient plants. *Plant Cell Physiol. 49 (7):* 1112-1121.

- SILVERA, K.; NEUBIG, K.M.; WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; WINTER, K.; CUSHMAN, J.C. (2010) Evolution along the Crassulacean acid metabolism continuum. *Functional plant biology* 37:995-1010.
- SLESLAK, I.; KARPINSKA, B.; SURÓWKA, E.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKI, S. (2003) Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C3-CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol.* 44: 573-581.
- SPOEL, S.H.; VAN, O.(2014) Circadian redox signaling in plant immunity and abiotic stress. *Antiox. Redox Signal.* 20: 3024-3039.
- STILES, K.C.; MARTIN, C.E. (1996) Effects of drought stress on CO₂ exchange and water relations in the CAM epiphyte *Tillandsia utriculata* (Bromeliaceae). *J. Plant Phys.* 149: 721-728.
- STÖHR, C.; STRUBE, F.; MARX, G.; ULLRICH, W.R.; ROCKEL, P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta 212:* 835-841.
- TADA, Y.; SPOEL, S.H.; PAJEROWSKA-MUKHTAR, K.; MOU, Z.;
 SONG, J.; DONG, X. (2008) S-nitrosylation and thioredoxins regulate conformational changes of NPR1 in establishing plant immunity. *Science* 321: 952-955.
- TAKAHASHI, C.A.; CECCANTINI, G.C.T.; MERCIER, H. (2007) Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal

leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Braz. J.Plant Physiol.* 19: 119-126.

- TAKAHASHI, C.A.; MERCIER, H. (2011) Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: characterization of a spatial and functional division. *J.Plant Physiol.* 168:1208-1216.
- TANOU, G.; FILIPPOU, P.; BELGHAZI, M.; JOB, D.; DIAMANTIDIS,
 G.; FOTOPOULOS, V.; MOLASSIOTIS, A. (2012) Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant J.* 72: 585-599.
- TAVARES, C.P.; VERNAL, J.; DELENA, R.A.; LAMATTINA, L.; CASSIA, R.; TERENZI, H. (2014) S-nitrosylation influences the structure and DNA binding activity of AtMYB30 transcription factor from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta 1844:* 810-817.
- TAYBI, T.; SOTTA, B.; GEHRIG, H.; GUCLU, S.; KLUGE, M.; BRULFERT, J. (1995) Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate carboxylase and CAM operation in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Bot Acta 198:* 240-246.
- TAYBI, T.; CUSHMAN, J. (1999) Signaling events leading to Crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Phys. 121*: 545-555.

105

- TAYBI, T.; CUSHMAN, J.C.; BORLAND, A.M. (2001) Environmental, hormonal and circadian regulation of Crassulacean acid metabolism expression. *Func. Plant Biol.* 29: 669-678.
- TAYBI, T.; CUSHMAN, J. (2002) Abscisic acid signaling and protein synthesis requirements for phosphoenolpyruvate carboxylase transcript induction in the common ice plant. *J. Plant Phys.* 159: 1235–1243.
- TING, I.P. (1981) Effects of abscisic acid on CAM in *Potulacaria afra*.*Photosynthesis Research 1 (2):* 39-48.
- TUN, N.; SANTA-CATARINA, C.; BEGUM, T.; SILVEIRA, V.; HANDRO, W.; FLOH, E.I.S.; SCHERER, G.F.E. (2006) Polyamines induce rapid biosynthesis of nitric oxide (NO) in *Arabidopsis thaliana*seedlings. *Plant Cell Physiol.* 47(3): 364-354.
- VALDERRAMA, R.; CORPAS, F.J.; CARRERAS, A.; FERNÁNDEZ-OCAÑA, A.; CHAKI, M.; LUQUE, F. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Letts* 581: 453-461.
- WANG, B.L.; TANG, X.Y.; CHENG, L.Y.; ZHANG, A.Z.; ZHANG,
 W.H.; ZHANG, F.S.; LIU, J.Q.; CAO, Y.; ALLAN, D.L.; VANCE, C.P.;
 SHEN, J.B. (2010) Nitric oxide is involved in phosphorus deficiencyinduced cluster-root development and citrate exudation in white lupin. *New Phytologist 187:* 1112-1123.

- WENDEHENNE, D.; PUGIN, A.; KLESSIG, D.F.; DURNER, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* 6: 177-183.
- WEST-EBERHARD, M.J.; SMITH, J.A.C.; WINTER, K. (2011) Photosynthesis, reorganized. *Science 322:* 311-312.
- WILDT, J.; KLEY, D.; ROCKEL, A.; ROCKEL, P.; SEGSCHNEIDER,
 H.J. (1997) Emission of NO from several higher plant species. J.
 Geophys. Res. 102: 5919–5927.
- WILKINSON, J.Q.; CRAWFORD, N.M. (1993) Identification and characterization of a chlorate-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* with mutations in both nitrate reductase structural genes NIA1 and NIA2. *Molecular and General Genetics 239 (1-2):* 289-297.
- WINTER, K.; ARANDA, J.; HILTUM, J.A.M. (2005) Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with Crassulacean acid metabolism. *Functional Plant Biology* 32: 381-388.
- WINTER, K.; HOLTUM, J.A.M. (2007) Environment or development? Lifetime net CO₂exchange and control of the expression of Crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology* 143: 98-107.
- WINTER, K.; GARCIA, M.; HOLTUM, J.A.M. (2008) On the nature of facultative and constitutive CAM: environmental and developmental

control of CAM expression during early growth of *Clusia*, *Kalanchoe*, and *Opuntia*. J. Exp. Bot. 59 (7): 1829-1840.

- WINTER, K.; HOLTUM, J.A.M.; SMITH A.C. (2015) Crassulacean acid metabolism: a continuous or discrete trait ? *New Phytologist 208:* 73-78.
- WOJTASZEK, P. (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry 54:* 1-4.
- XU, Y.C.; ZHAO, B.L. (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Phys. And Bioch.* 41: 833-838.
- YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS letters:* 468 89-92.
- YAMASAKI, H.; COHEN, M. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants?*Trends in Plant Sci.* 11: 522-524.
- YANG, Z.; DE STEFANO, R.; ROBINE, M.; BUTELLI, E.; BULLING,
 K.; HILL, L.; REJZEK, M.; MARTIN, C.; SCHOONBEEK, H. (2015)
 Different ROS-scavenging properties of flavonoids determine their abilities to extend shelf life of tomato. *Plant Phys.* 169: 1568-1583.
- YUN, B-W.; FEECHAN, A.; YIN, M.; SAIDI, N.B.B.; BIHAN, T.L.; YU, M.; MOORE, J.W.; KANG, J-G.; KWON, E.; SPOEL, S.H.; PALLAS,

J.A.; LOAKE, G.J. (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 478: 264-268.

- ZEMOJTEL, T.; FRÖHLICH, A.; PALMIERI, C.; KOLANCZYK, M.; MIKULA, I.; WYRWICZ, L.; WANKER, E.E. MUNDLOS, S.; VINGRON, M.; MARTASEK, P.; DURNER, J. (2006) Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci. 11:* 524-525.
- ZHAO, M.; CHEN, L.; ZHANG, L.; ZHANG, W. (2009) Nitric reductasedependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151: 755-767.



Anexo 1: Esquema da câmara para aplicação de NO em fluxo contínuo. O fluxo de ar é gerado através de uma bomba de aquário e o fluxo ajustado. O NO é adicionado a partir de um cilindro, controlando a entrada até obter a concentração desejada. O ar carregado de NO passa por uma câmara transparente onde estão as folhas e logo vai para a saída, onde é coletado e injetado em um aparelho de quimioluminescência para o monitoramento dos níveis de NO.



Anexo 2: Porcentagem de água das porções basal (B), mediana (M) e apical (A) de folhas jovens (3° ao 7 ° nós), intermediárias (8° ao 12 ° nós) ou maduras (13° ao 17 ° nós) expostas a uma solução de PEG 30% por quatro dias. As barras brancas correspondem a folhas ligadas à planta-mãe, enquanto as pretas correspondem a folhas que foram destacadas previamente ao tratamento com PEG. Asteriscos indicam diferença entre a folha na planta e a folha destacada segundo o teste T de Student (P<0,05).



Anexo 3: Comparação entre a proporção da região com pouca clorofila de uma folha interna da roseta (5° nó -à esquerda) com uma intermediária (15° nó -à direita).



Anexo 4: Curva padrão feita com concentrações crescentes de GSNO para testar o protocolo de quantificação de compostos nitrosilados. Visualização da curva em um transluminador sob luz UV (A) e valores da diferença entre a fluorescência emitida após a aplicação de UV com a inicial (B).