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

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*

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

2016

Ficha Catalográfica

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)

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 CO_2 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 CO_2 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 CO_2 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 C_3, mas ocorre uma refixação do CO_2 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 CO_2 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 CO_2 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 CO_2, como em uma condição de déficit hídrico (Pikart, 2014). Esse mesmo autor mostrou que em condições bem hidratadas a fixação noturna de CO_2 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 C_3 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 "C_3-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 C_3 para CAM e também de fazer o caminho inverso. Assim, mesmo plantas consideradas CAM podem apresentar metabolismo C_3 em seus estágios mais jovens (Winter et al., 2008). Até agora, apenas três espécies são aceitas como "verdadeiras" C_3-CAM facultativas: *Calandrinia poliandra*, *Clusia pratensis* e *Clusia minor* (Mioto et al., 2015). Freschi & Mercier (2011) argumentaram que a mudança do metabolismo C_3 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 C_3 (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, CO_2 e ritmo circadiano poderiam levar a formas rudimentares de CAM. De qualquer forma, acredita-se que o passo evolutivo que levaria uma planta C_3 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 C_3, 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 abacaxizeiro, foi sugerida 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 O_2, 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 *nia1/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 ($S-O_2H$) e o de ácido sulfênico ($S-O_3H$). 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 C_3, 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.

2) 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.

3) 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.

3. 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.

4. 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 CO_2-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.

5. 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 desenhos experimentais. No primeiro, folhas destacadas de *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-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-óxido (cPTIO) ou de NO gasoso em folhas destacadas mantidas em PEG ou água, 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.

6. Abstract

Guzmania monstachia is an epiphytic tank-bromeliad capable of up-regulating 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 reducedglutathione (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 NO scavenger 2-(4-carboxifenil)-4,4,5,5-tetrametilimidazolina-1-oxil-3-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.

7. 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 S-nitrosoproteome of *Brassica juncea* by low temperature: change in S-nitrosylation 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 post-translational 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 S-nitrosylation: 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 changing world. ***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 H_2O_2 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 C_3 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 alga*Ostreococcus tauri*is 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 (NO_2) 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 CO_2recycling 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) CO_2-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, CO_2-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 C_3 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 C_3

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 water-absorbing 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 CO_2 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.

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 deficiency-induced 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 CO_2exchange 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.

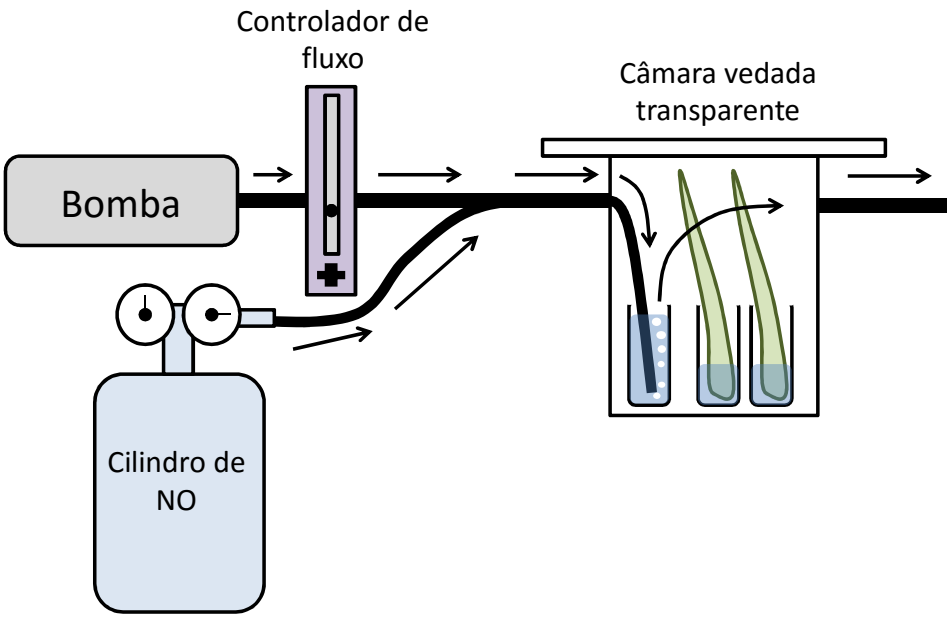
YAMASAKI, H.; COHEN, M. (2006) NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants?***Trends in Plant Sci. 11:*** 522-524.

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.

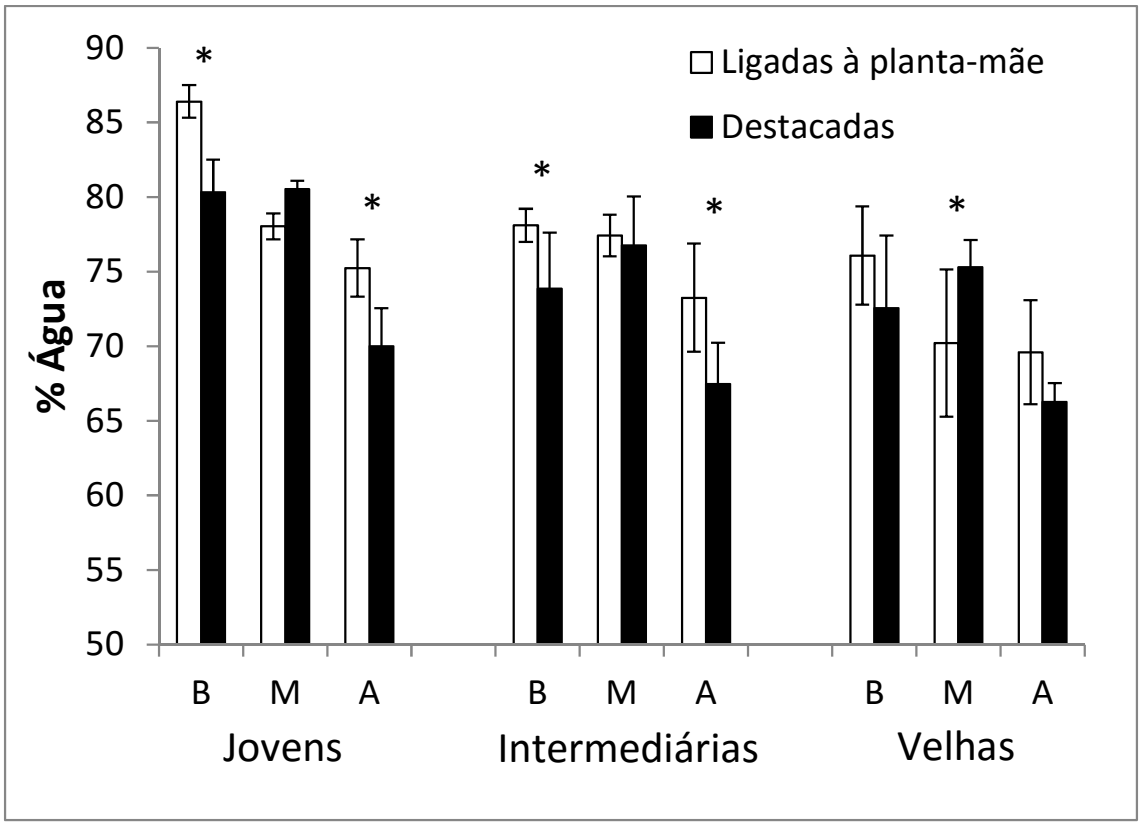
YUN, B-W.; FEECHAN, A.; YIN, M.; SAIDI, N.B.B.; BIHAN, T.L.; YU, M.; MOORE, J.W.; KANG, J-G.; KWON, E.; SPOEL, S.H.; PALLAS, J.A.; LOAKE, G.J. (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. ***Nature 478:*** 264-268.

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.

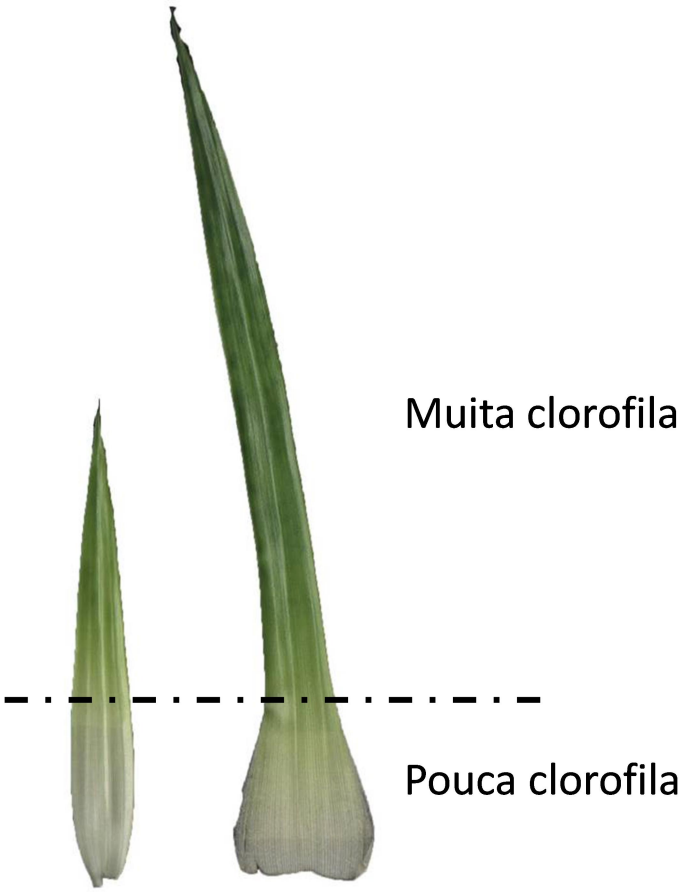
ZHAO, M.; CHEN, L.; ZHANG, L.; ZHANG, W. (2009) Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. ***Plant Physiology 151:*** 755-767.



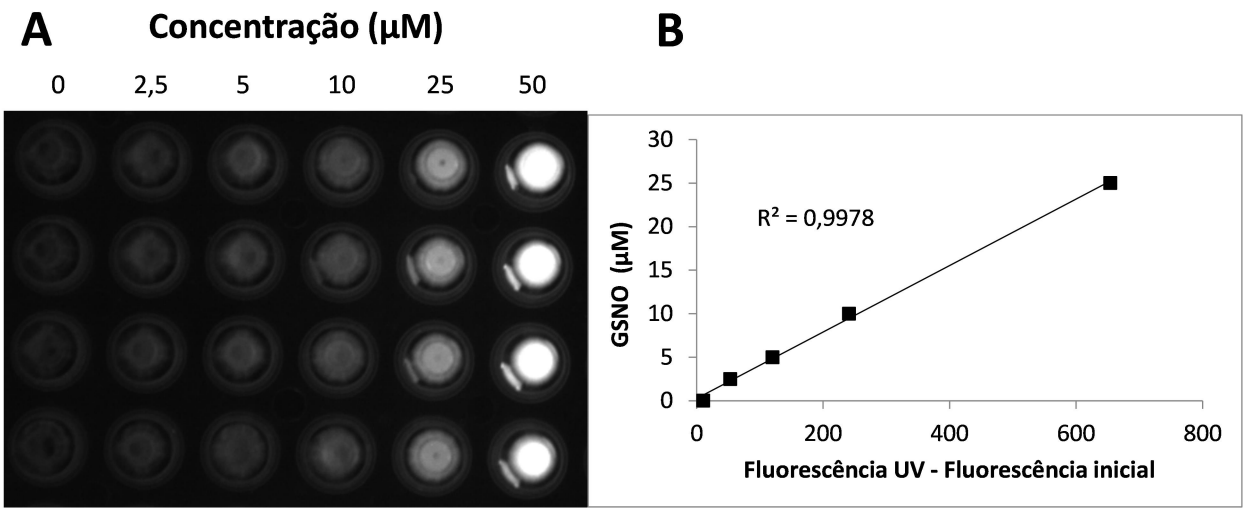
Anexo 1: Esquema da câmara para aplicação de NO em fluxo contínuo. O fluxo de ar é gerado através de uma bomba de aquário e o fluxo ajustado. O NO é adicionado a partir de um cilindro, controlando a entrada até obter a concentração desejada. O ar carregado de NO passa por uma câmara transparente onde 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).