Aline Tiemi Matsumura

Controle da atividade da nitrato redutase em plantas de
abacaxizeiro submetidas a baixas temperaturas em
diferentes fases do ciclo diurno

Nitrate reductase activity control in pineapple plants subject to
low temperatures in different phases of diurnal cycle

São Paulo

2012

Aline Tiemi Matsumura

Controle da atividade da nitrato redutase em plantas de
abacaxizeiro submetidas a baixas temperaturas em
diferentes fases do ciclo diurno

Nitrate reductase activity control in pineapple plants subject to
low temperatures in different phases of diurnal cycle

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Helenice Mercier

São Paulo

2012

Ficha Catalográfica

Matsumura, Aline Tiemi

Controle da atividade da nitrato redutase em plantas de abacaxizeiro submetidas a baixas temperaturas em diferentes fases do ciclo diurno.

Número de páginas: 78p.

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

1. nitrato redutase 2. Baixa temperatura 3.
Ananas comosus

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 Helenice Mercier

Orientadora

Epígrafe

---

*Science is cool and fun because you get to do stuff that
no one has ever done before*

(Children from Blackawton)
Biology Letters (2011) 7, 168-172

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

À Profa Dra Helenice Mercier pela oportunidade e orientação, pelo incentivo e apoio em todos os momentos de meu mestrado e por ser um exemplo de dedicação.

Ao Prof. Dr. Luciano Freschi pela ajuda em diversos momentos e por sempre estar disposto a ouvir e aconselhar.

Ao Prof. Dr. Gilberto Kerbauy pelo apoio e por ser um exemplo de dedicação e entusiasmo pela pesquisa.

À doutoranda Cássia pela ajuda com os experimentos e pela orientação em diversos momentos.

À mestre Alessandra pelo auxílio com as técnicas da NR *in vitro* e fracionamento e pela disposição em ajudar.

A todos do laboratório (alunos e ex-alunos) pela amizade, apoio e pelo ambiente sempre agradável: Alejandra, Paulo, Paula, Perdigão, Auri, Lucas, Rafael, Nielda, Bruno, Dioceni, Ilton, Lia, Michael, Bruna. Ao Leonardo e Oscar pela ajuda com os experimentos.

Aos técnicos e ex-técnicos do laboratório pelo trabalho, amizade e disposição em ajudar: Ana Maria, Aline, Maxuell, Rita, Rodrigo, Alex, Willian, Cíntia e André.

Ao Laboratório de Algas Marinhas pelo auxílio em diversos momentos, em especial ao técnico Rosário. À Profa Dra Fanly Fungyi Chow Ho pela ajuda com a interpretação de resultados.

Ao Laboratório de Biologia Molecular de Plantas pelo uso da ultracentrífuga, em especial à técnica Tatiana pela disposição em ajudar.

A todos os funcionários do Departamento de Botânica.

Ao pessoal do Botânica no Inverno (Zé, Aline, Adne, Manu, Bia, Lagosta, Janaina, Leo e Cíntia) por todos os momentos que passamos para fazer o curso acontecer.

Ao pessoal do laboratório de Cronobiologia (Patricia, Danilo, Babi e Cíntia) pelas convsersas, apoio e por sempre me ajudarem com dúvidas da área. À Profa Dra Gisele Akemi Oda pelos conselhos no início de meu projeto.

Aos meus amigos da graduação pelo apoio e incentivo em todos esses anos de convívio: Patricia, Simone, Janaina, Oscar, Clarice, Daizo, Fernanda, Diego, André e Sheina.

Um agradecimento especial ao Fábio, pelo suporte e incentivo em todos os momentos e pelas diversas vezes em que ele me ajudou nos experimentos e me fez companhia nos ciclos.

Aos meus pais, irmãos (Rafael e Danilo), avô e avós e às minhas primas Daniela e Adriana pelo apoio.

Agradeço a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro.

São Paulo

2012

Índice

---

1 – Introdução.....	01
1.1. Absorção e assimilação do nitrato.....	01
1.2. Nitrato redutase: estrutura e mecanismos gerais de regulação.....	03
1.3. Influência da luz e ritmo endógeno na nitrato redutase.....	06
1.4. Influência do frio na nitrato redutase.....	08
1.5. A nitrato redutase de membrana plasmática (NRPM).....	09
1.6. O abacaxizeiro como modelo de estudo.....	11
 2 – Objetivos.....	 14
2.1. Estratégias	14
 3 – Material e Métodos.....	 15
3.1. Obtenção do material vegetal.....	15
3.2. Delineamento experimental.....	16
3.3. Ensaios bioquímicos.....	19
3.4. Análises estatística dos dados.....	24
 4 – Resultados.....	 25
4.1. Padronização da metodologia da NR <i>in vitro</i> para as folhas.....	25
4.2. Efeito da duração do estímulo do frio (10°C) sobre a atividade da NR <i>in vitro</i> em folhas e raízes de abacaxizeiro na presença de luz ou no escuro.....	27
4.3. Padronização do método do fracionamento celular para atividade da NRc e NRPM.....	33
4.4. Efeito da aplicação do estímulo de frio (10°C) sobre as atividades das NRs de citossol e de membrana plasmática com diferentes doadores de elétrons (NADH, NADPH e succinato).....	37

4.5. Efeito da aplicação do estímulo de frio (10°C) sobre a emissão de NO por folhas e raízes de abacaxizeiro.....	43
4.6. Efeito da aplicação do frio na atividade da NR (<i>in vitro</i>) em diferentes fases do ciclo de 24 horas em folhas e raízes de abacaxizeiro.....	46
4.7. Alterações no ritmo de atividade da NR (<i>in vivo</i>) após 6 horas submetidas a temperatura de 10°C em diferentes fases do ciclo de 24 horas.....	49
5 – Discussão.....	56
6 – Conclusão.....	67
7 – Resumo.....	68
8 – Abstract.....	70
9 – Referências Bibliográficas.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP – adenosina monofosfato

ATPase – adenosina trifosfatase

BSA – albumina de soro bovino

BTP – bis-tris-propano

CAM – metabolismo ácido crassuláceo

DAR4M – diaminorodamina-4M

DP – desvio padrão

DTT – ditionitrito

EDTA – etilenodiamino tetra-acetato

FAD – flavina adenina dinucleotídeo

GPI – glicosil-fosfatidilinositol

GS – glutamina sintetase

GOGAT – glutamato sintase

HATS – sistema de transporte de alta afinidade

HEPES – ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico

kDa - kilodalton

LATS – sistema de transporte de baixa afinidade

MES – 2-(N-morfolino)ethanesulfonic

BTP – bis-tris-propano

MoCo – complexo molibdênio

MOPS – ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico

NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida

NO – óxido nítrico

NO_3^- – nitrato

NO_2^- – nitrito

NRc – nitrato redutase de citosol

NRPM – nitrato redutase de membrana plasmática

NRi – nitrito redutase

ONOO^- – peróxido nitrito

PEG - polietilenoglicol

PP2A – proteína fosfatase 2A

RNA_m – RNA mensageiro

SDS – dodecilsulfato de sódio

SNP – nitroprussiato de sódio

TRIS – tris-(hidrometil)-aminometano-hidroclorídrico

1 - INTRODUÇÃO

1.1) Absorção e assimilação do nitrato

O nitrato (NO_3^-) é comumente considerado uma das fontes de nitrogênio mais abundantes para as plantas no solo em condições aeróbicas, além de agir como sinal para vários processos. Sua origem no solo provém principalmente de micro-organismos, por meio da conversão de outras fontes de nitrogênio, como amônio e nitrito (Miller *et al.*, 2007).

A absorção do nitrato através da membrana plasmática pode ocorrer por dois mecanismos do tipo simporte: o de baixa afinidade (LATS) e o de alta afinidade (HATS), codificados pelas famílias gênicas *NRT1* e *NRT2*. O HATS pode ser classificado em: sistema induzível de alta afinidade (iHATS), que é fortemente estimulado pelo seu próprio substrato, possuindo uma maior capacidade para captura de nitrato; ou sistema constitutivo de alta afinidade (cHATS), que é expresso constitutivamente e tem a maior afinidade pelo nitrato. O LATS, aparentemente, é expresso constitutivamente, apresentando maior relevância quando o NO_3^- está em concentrações acima de 1mM (Aslam *et al.*, 1992; Forde, 2000; Tischner, 2000).

A regulação dos transportadores ocorre principalmente pela oferta de nitrogênio e carbono, como apontam estudos com *Arabidopsis thaliana*. Sabe-se que o nitrato induz a transcrição dos genes envolvidos no seu transporte, enquanto o nitrito e produtos da assimilação do nitrogênio são capazes de inibi-lo em parte. Além disso, esses genes apresentam variações diurnas, provavelmente reguladas pela fotossíntese, já que a sacarose induz o aumento de transcritos mesmo à noite (Lejay *et al.*, 1999; Forde, 2000).

Após a absorção pelas raízes, o nitrato pode ser reduzido a nitrito, estocado nos vacúolos, ou transportado para a parte aérea, onde poderá ser assimilado ou estocado (Forde,

2000; Miller *et al.*, 2007). A assimilação do nitrato tem início com a enzima nitrato redutase (NR), que o transforma em nitrito (NO_2^-), o qual é reduzido, então, a amônia pela nitrito redutase (NiR) no citosol. A amônia encaminha-se aos plastídios, onde é incorporada ao glutamato formando a glutamina. Esta última reação é catalisada pela ação das enzimas glutamina sintetase (GS) e glutamato sintase (GOGAT) (Crawford, 1995; Lam *et al.*, 1995). O processo está representado na figura 1.

Figura 1: Rota de incorporação do nitrato em aminoácido. Baseado em Lam *et al.* (1995).

Por ser um soluto móvel, o nitrato pode variar rapidamente em concentração, sendo considerado um poluente em altas concentrações. Considerado um problema ambiental, torna-se importante, neste contexto, compreender a sinalização envolvida nos seus processos de absorção e assimilação (Krouk *et al.*, 2010).

1.2) Nitrato redutase: estrutura e mecanismos gerais de regulação

A redução do nitrato a nitrito é considerada o passo limitante e principal na sua assimilação (Lillo *et al.*, 2003). A NR representa uma curta cadeia de transporte de elétrons localizada no citosol, que catalisa a transferência de dois elétrons do NAD(P)H para o nitrato (Tischner, 2000; Kaiser e Huber, 2001). Esta enzima pode ser classificada em três grupos: NADH específica, a forma mais comum encontrada em algas e plantas; NADPH específica, exclusiva de fungos e NAD(P)H biespecífica (pode usar tanto o NADH como NADPH), mais comum em fungos, porém presente também em algas e plantas (Guerrero *et al.*, 1981). Além dessas isoformas, já foi relatada para diversas espécies vegetais a existência de uma NR associada à membrana plasmática (NRPM). Sua função ainda não foi totalmente elucidada, visto que a NR citossólica (NRc) é a principal forma de catalisar a redução do nitrato a nitrito (Stöhr e Ullrich, 1997).

Em *Arabidopsis*, foram identificados dois genes para a NR NADH específica, *NIA1* e *NIA2*, sendo esse último responsável por 90% de toda a atividade de redução do nitrato. A sequência e número de cópias desses genes podem variar de acordo com a espécie, assim como as isoformas presentes (Wilkinson e Crawford, 1991; Zhou e Kleinhofs, 1996).

Sabe-se que a NR é um homodímero, sendo cada monômero composto por três subunidades e duas regiões de ligação: complexo molibdênio (MoCo), onde se encontra o domínio de dimerização; a região de ligação *hinge 1* (onde ocorrem as ligações para inativação da enzima); grupo Fe-heme, onde se encontra o domínio citocromo *b5*; a região de ligação *hinge 2* e cofator flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Fig. 2). A redução do nitrato tem início com a transferência de elétrons do NAD(P)H para o cofator FAD, que os transferem para o citocromo *b5* (no grupo heme) e depois para o centro molibdênio, no qual o nitrato será reduzido a nitrito (Campbell, 1999; Fischer *et al.*, 2005).

Além da redução do nitrato, sabe-se que a NR tem a capacidade de transferir elétrons do NAD(P)H para o nitrito gerando óxido nítrico (NO) e para o oxigênio (O₂), formando íons superóxidos (O₂⁻), que podem reagir com o NO, gerando os íons tóxicos de peróxido nitrito (ONOO⁻) (Fig. 2). Acredita-se que todas essas reações ocorrem no mesmo sítio da enzima, ou seja, no domínio MoCo, sendo que o nitrato parece ter preferência nessas reações (Ruoff e Lillo, 1990; Yamasaki e Sakihama, 2000; Meyer *et al.*, 2005).

Figura 2 – Homodímero da NR, representando em cada monômero as três subunidades e as duas regiões de ligação. Em a) está representado o processo de inativação da enzima por fosforilação e em b) as possíveis reações de redução utilizando o NAD(P)H como doador de elétrons. Baseado em Kaiser e Hubber (2001) e Fischer *et al.* (2005).

A NR possui diversos mecanismos de regulação, os quais são necessários para evitar o acúmulo de nitrito, considerado tóxico. As principais formas de controle estão em nível transcricional e pós-traducional (Tischner, 2000; Kaiser e Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2003).

O controle transcricional ocorre em longo prazo (horas) e pode ser induzido pelo nitrato como sinal primário, luz, citocininas, sacarose e CO₂. Sinais como a ausência de substrato e a presença de glutamina atuam de forma negativa (Crawford e Campbell, 1990). De acordo com Pouteau *et al.* (1989), outro fator de controle na expressão da NR é a própria enzima. Em trabalho com *Nicotiana plumbaginifoli*, foram utilizados o mutante *nia*, no qual a estrutura do gene da NR foi danificada e o mutante *cnx*, no qual a biossíntese do cofator molibdênio foi danificada. Nesses casos, a NR deixa de ser sintetizada ou torna-se parcial ou completamente inativada, resultando em perda ou dano de seu sítio catalítico e consequente acúmulo de nitrato. Em todos os casos, houve aumento dos níveis de RNAm, que se mantiveram permanentemente elevados, demonstrando um controle da enzima sobre seu próprio RNAm.

O controle pós-traducional é rápido (em minutos), sendo essencial na adaptação do metabolismo para mudanças diárias de luz/escuro e variações de intensidade luminosa. A atividade da NR é modulada por proteínas cinases dependentes de cálcio, que levam a NR a um estado fosforilado. Para sua inativação completa, é necessária a ligação da NR fosforilada ao grupo de proteínas 14-3-3, na presença de magnésio (Mg²⁺) (Fig. 2a). A reativação ocorre por proteínas fosfatases (provavelmente, do grupo PP2A), que podem promover a desfosforilação da enzima ou mesmo inativar um grupo específico de proteínas cinases (Lillo, 2008). Luz, açúcares, acidificação do citosol, hipóxia ou anóxia e anaerobiose são fatores reconhecidamente relacionados com a ativação da NR em folhas e raízes, ao passo que a falta de luz provoca sua inativação. (Lillo *et al.*, 1997; Kaiser e Huber, 1997; Buchanan, 2000; Kaiser e Huber, 2001; Lillo *et al.*, 2004).

1.3) Influência da luz e ritmo endógeno na nitrato redutase

A luz está envolvida na indução da NR em todos os níveis de controle, podendo atuar de forma direta, mediada pelo fitocromo (Rajasekhar, 1988), ou indireta, através da ativação da fotossíntese e produção de açúcares (Vincentz *et al.*, 1993; Lillo *et al.*, 2004).

Assim como o nitrato, sabe-se que a luz induz uma alta expressão dos genes da NR (Tischner, 2000; Lillo *et al.*, 2001). Em trabalho com *Arabidopsis thaliana*, observou-se que os fatores de transcrição HY5/HYH, componentes da sinalização do fitocromo, podem atuar como possíveis ativadores diretos da transcrição da NR, visto que já foi demonstrado haver duas regiões de ligação para HY5 no promotor da NR (Jonassen *et al.*; 2008). Na ausência de luz, a presença de sacarose também foi capaz de induzir acúmulo de RNAm da NR, demonstrando que a luz também pode induzir a expressão da NR por meio de produtos da fotossíntese (Cheng *et al.*, 1992).

A luz atua na indução do estado desfosforilado da NR, impedindo a ação das proteínas 14-3-3 e mantendo a estabilidade da proteína (Provan *et al.*, 2000; Lea *et al.*, 2006). Em trabalho com folhas de espinafre, onde foram aplicados diversos tratamentos que impedem a fosforilação da enzima, mostrou-se que a inativação da NR pode ser evitada no escuro (Kaiser e Huber, 1997). Em experimento com transgênico para *Nicotiana plumbaginifolia*, no qual a NR não é mais inativada por transições de claro/escuro, observou-se que, sem o controle pós-traducional, ocorreu acúmulo de nitrito durante a fase escura, mostrando a importância dessa forma de controle (Lillo *et al.* 2003).

As folhas assimilam nitrato principalmente na fase iluminada, porém, a assimilação também pode ocorrer na ausência de luz, em taxas menores. A proporção de uma para outra varia muito entre espécies e mesmo dentro delas. Enquanto no claro, os elétrons para a redução do nitrato provem direto da cadeia fotossintética, no escuro, o poder redutor é gerado

durante a oxidação de compostos orgânicos (Lillo, 2008). Na presença do ciclo de claro/escuro, a atividade da NR atinge o maior valor perto do meio da fase clara, decrescendo a partir daí até níveis mais baixos na fase escura (Lillo, 2008). Com relação ao RNAm da NR, Galangau *et al.* (1988) observaram em folhas de tomateiro e tabaco que seus níveis atingiram valores máximos perto do início da fase luminosa, decrescendo até se tornarem indetectáveis ao fim da fase escura. Foi, então, proposto que o RNAm da NR possui um ritmo endógeno, o qual intermedeia a regulação da luz na expressão da NR. Já foi relatado para diversas espécies que a NR possui um ritmo circadiano, ou seja, as variações diurnas ocorrem mesmo em luz constante e com período próximo de 24 horas (Jones *et al.*, 1998; Lillo *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2004).

A NR também é uma das poucas proteínas em que foi demonstrado haver oscilações circadianas na atividade enzimática já que, na maioria dos casos, os grandes estoques de proteínas estáveis impedem variações diurnas de atividade correspondente à sua expressão gênica (Jones *et al.*, 1998; Lillo e Ruoff, 1984). Em experimentos nos quais os níveis de RNAm da NR, a atividade da NR e os níveis de nitrato foram estimados por equações matemáticas, foi demonstrado que o ritmo de atividade da NR pode ser mantido apenas na presença da luz, sob condições constantes, pois no escuro constante ocorre um aumento na taxa de degradação da enzima (Yang e Mildmore, 2005). Esses experimentos reforçam a idéia de que o ritmo da NR não está ligado ao relógio biológico, mas é mantido por oscilações metabólicas de retroalimentação (Lillo *et al.*, 2001).

1.4) Influência do frio na nitrato redutase

Existem poucos trabalhos que buscam analisar os efeitos da temperatura na assimilação do nitrogênio, sendo a maioria deles no frio. Em experimentos com plantas de trigo (*Triticum aestivum*), aclimatadas por 7 dias a 2°C, foi demonstrado um aumento na atividade da NR NADH dependente e na quantidade de proteína, indicando que a atividade da enzima foi relacionada à NR já presente e à sua síntese *de novo* (Yaneva *et al.*, 1996). Em outro estudo com a mesma planta, folhas foram mantidas por 2 horas a 4°C, em comparação com o controle, mantido a 20°C. Observou-se que as folhas mantidas no frio apresentaram aumento na atividade da NR desfosforilada (ativa) ao final de 8 horas no escuro e após 2 horas na luz. Já a atividade da NR total (NR fosforilada e desfosforilada) aumentou apenas na presença da luz. As taxas de absorção de nitrato a 4°C decresceram quase a zero, permanecendo reduzidas durante todo o experimento, embora não tenham afetado a ativação da NR (Yaneva *et al.*, 2002). Por esse trabalho, concluiu-se que baixas temperaturas aumentam a atividade da NR via desfosforilação da enzima.

Em experimento com folhas de tomateiro, 6 horas de exposição a 4°C provocaram 6 horas de atraso no ritmo de atividade da NR em luz constante, demonstrando que o ritmo de atividade parece parar durante o choque térmico. O experimento foi repetido mantendo a condição escura após a exposição ao frio, e o mesmo resultado foi observado (Jones *et al.*, 1988). Em outro trabalho com a mesma espécie, as folhas permaneceram novamente por 6 horas a 4°C sob luz constante. Foi demonstrado que a baixa temperatura aumentou tanto a transcrição como a atividade da NR 2 horas após o reaquecimento das plantas. Sugeriu-se que essa resposta rápida ao frio deveu-se à transcrição *de novo* da enzima, e que aparentemente o controle pós-traducional não teve influência nos resultados obtidos. Nos dias seguintes, a 26°C, constatou-se retomada de fase no ritmo circadiano, tanto da proteína como do transcrito

da NR, mostrando que o frio afetou o ritmo de atividade, porém sem interferir no relógio biológico (Tucker e Ort, 2002).

Em estudos mais recentes, foi demonstrado que a NR pode estar envolvida na aclimação pelo frio por intermédio da produção de NO, como demonstrado em trabalhos com *Arabidopsis thaliana*. Zhao *et al.* (2009) relataram que a produção de NO pela NR está vinculada ao gene *nial1*, enquanto a maior parte da produção de nitrito parece relacionada ao *nial2*. A taxa de sobrevivência ao congelamento (-7°C) foi correlacionada com uma maior taxa na produção de NO dependente da NR, visto que emissão de NO foi maior em plantas selvagens aclimatadas e esse aumento não ocorreu em mutantes *nial1 nial2* (deficiente em NR), na qual a taxa de sobrevivência foi menor. Também foi constatado um aumento na síntese e redução na degradação de prolina, um osmólito que auxilia na aclimação pelo frio. Acredita-se que o NO gerado pela NR possa atuar por meio do aumento dos níveis de prolina. Cantrel *et al.* (2011) mostraram que tanto a atividade da NR como a produção de NO podem ser detectados após apenas uma hora de exposição a 4°C, e que esta produção estaria ligada à expressão de membros da família CBF (fator de transcrição respondíveis ao frio e ao congelamento), indicando a participação do NO na regulação gênica por via dependente do CBF durante a resposta ao frio.

1.5) A nitrato redutase de membrana plasmática (NRPM)

Por muito tempo acreditou-se que a atividade da NR, observada em frações de membrana plasmática de plantas, seria apenas fruto de contaminação (Askerlund *et al.*, 1991). Os primeiros trabalhos a confirmarem a presença da NRPM em plantas derivadas foram os de Ward *et al.* (1988) e Ward *et al.* (1989), nos quais ficou demonstrada a atividade da NR associada a frações de membrana plasmática isoladas e purificadas em raízes de cevada e

milho, respectivamente. A atividade da NR manteve-se mesmo após lavagens com NaCl, demonstrando que a NRPM é uma proteína integral de membrana. Em 1989, Tischner *et al.* encontraram a NRPM na alga *Chlorella sorokiniana*, observando-se que tanto a NRc como a NRPM foram inibidas pelo mesmo anticorpo. Isso sugeriu que as duas formas estariam relacionadas. O tamanho da subunidade da NRPM apresentou-se menor, com 60 kDa, em comparação com a da NRc (95 kDa). Essa redução de tamanho parece ocorrer no domínio FAD, como sugerido por Wienkoop *et al.* (2001) em raízes de tabaco.

Tanto no trabalho com cevada como o da *Chlorella sorokiniana*, foi proposto que a atividade da NRPM e o transporte de nitrato podem estar associados, já que ambos foram inativados na presença de anti-NR. Já na alga *Chlorella saccharophila*, foi discutido um possível estímulo na absorção de nitrato sob luz azul, inibido pela adição externa de fragmentos de imunoglobulina (IgG) anti-NR, indicando que a NRPM pode ser o receptor para esse comprimento de luz (Stöhr *et al.*, 1995a). Em trabalho com a mesma alga, Stöhr *et al.* (1995b) demonstraram que a NRPM está ligada à membrana por meio de uma âncora de glicosil-fosfatidilinositol (GPI).

De Marco *et al.* (1994) mostraram em raízes de milho que a NRPM pode utilizar tanto o NADH como o NADPH como doadores de elétrons, com dependência por diferentes pHs, sugerindo a coexistência de diferentes isoformas. A resposta em diferentes fontes de nitrogênio foi diferente, se comparada à NRc. Em raízes de *Nicotiana tabacum* observou-se que a NRPM pode empregar também o succinato como doador de elétrons, indicando que ela pode servir de regulador entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio (Stöhr, 1997). Em geral, a atividade foi menor com o NADH, se comparada com o succinato. Ainda não foi esclarecido se a NRPM que utiliza succinato é diferente da que utiliza NADH ou se estes doadores se ligariam em sítios diferentes da mesma enzima, já que o efeito da presença de ambos não é aditivo (Wienkoop *et al.*, 1999).

Em 2001, Stöhr e Mäck realizaram ensaios visando determinar o ciclo diurno da NR em raízes de tabaco, separando a atividade da NRPM e da NRc. Empregou-se o isolamento da membrana plasmática por fracionamento de duas fases. A maior atividade da NRPM foi encontrada durante a fase escura, com pico uma hora após o fim da fase clara, ao contrário da NRc. Inclusive, a atividade da NRPM excedeu a da NRc durante o ciclo diurno, indicando que a NRPM das raízes pode ser a responsável pela redução do nitrato durante a fase escura. A maior atividade da NR citossólica foi observada na primeira parte da fase clara, decrescendo ao longo do dia e atingindo níveis mínimos na fase escura. O mesmo resultado foi encontrado para os seus correspondentes transcritos (Wienkoop *et al.*, 2001). Para a NRPM, foram empregados como doadores de elétrons o succinato e o NADH, sendo que novamente a maior atividade foi encontrada com o succinato.

Apesar da presença da NRPM em plantas estar claramente demonstrada para diversas espécies, a maior parte dos trabalhos sobre NR trata-a como uma enzima exclusiva de citoplasma, tornando difícil distinguir os efeitos de cada uma delas nos trabalhos apresentados nos itens anteriores.

1.6) O abacaxizeiro como modelo de estudo

A família Bromeliaceae representa um grupo extremamente diverso em termos ecológicos e de formas de vida, contendo espécies terrestres e epífitas (Martin, 1994). O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) é nativo de regiões quentes da América (Wall, 1988). Apesar de ser considerada uma planta de sombra em condições naturais, o cultivo do abacaxizeiro no campo é, frequentemente, realizado em solos secos e expostos a altas irradiâncias (Medina *et al.*, 1993).

Um número considerável de membros da família Bromeliaceae, dentre eles o abacaxizeiro, apresenta o metabolismo ácido das crassuláceas (CAM), o que poderia explicar o sucesso dessa família em ocupar o ambiente aéreo (Smith *et al.*, 1986; Benzing, 2000). Apesar do abacaxizeiro ser considerado uma planta CAM constitutiva em muitos estudos, alguns autores, como Ting (1985) e Nievola *et al.* (2005), classificam-no como uma planta C₃-CAM facultativa, ou seja, capaz de transitar de C₃ para CAM em certas condições de temperatura, luminosidade ou disponibilidade hídrica (Benzing, 2000; Cushman e Borland, 2002; Lüttge, 2004).

Diversos trabalhos com esse modelo vêm sendo conduzidos no grupo a respeito de sua fotossíntese, organogênese e nutrição, dentre eles os de Nievola *et al.* (2005) e Freschi *et al.* (2009). Neles, plantas de abacaxizeiro foram avaliadas em relação ao seu metabolismo fotossintético (Nievola *et al.*, 2005) e atividade da NR (Freschi *et al.*, 2009) após 3 meses de cultivo *in vitro* em condições de termoperíodo de 28°C claro/15°C escuro ou temperatura constante de 28°C (controle). Verificou-se que as plantas em termoperíodo apresentaram fotossíntese CAM e a atividade passou a acontecer preferencialmente na fase escura nas raízes. O controle apresentou-se C₃, com a atividade da NR ocorrendo preferencialmente na fase clara e nas folhas. Foi observado um pico de citocininas ao final da fase clara em raízes submetidas ao mesmo termoperíodo, que antecedeu um aumento na expressão de RNAm da NR na fase escura, 4 horas antes do aumento de atividade da NR. Em pesquisa mais recente, o aumento na atividade da NR foi associado à NRPM, já que a diferença em relação ao controle (temperatura constante) somente se manteve nas frações de membrana plasmática (Santos, 2010).

Esses trabalhos também sugeriram uma possível correlação entre o metabolismo fotossintético e a atividade noturna da NR em raízes, contudo, experimentos posteriores concluíram não ser a indução ao CAM o fator responsável por esse resultado. Plantas de

abacaxizeiro mantidas em condições constantes de temperatura e induzidas ao CAM pelo aumento de intensidade luminosa não mostraram diferenças quanto à atividade da NR em comparação ao controle C_3 , mantido em baixa intensidade luminosa. Não foi encontrado aumento significativo na atividade noturna da NR nas raízes das plantas CAM, concluindo, portanto, que as baixas temperaturas noturnas foram as prováveis responsáveis pela mudança do comportamento da NR em raízes de abacaxizeiro submetidas ao termoperíodo de 28°C claro/ 15°C escuro (Matsumura, 2009).

Considerando que o frio noturno pode causar esse estímulo positivo na atividade da NR de abacaxizeiro, questionou-se como seria a reação ao frio em um prazo curto de tempo e qual seria sua influência em diferentes fases do ciclo de claro/escuro, assim como se as folhas também poderiam apresentar alguma resposta imediata na atividade da sua NRc ou NRPM.

2) OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos investigar os efeitos do frio na atividade da NR em folhas e raízes de abacaxizeiro em diferentes tempos de exposição, na presença ou ausência da luz e em diferentes fases do ciclo de 24 horas (claro/escuro). Buscou-se averiguar qual NR estaria envolvida nessas respostas: a NR citossólica (NRc) ou de membrana plasmática (NRPM), assim como verificar o envolvimento do NO na sinalização pela baixa temperatura. O ritmo diário de atividade da NR também foi avaliado, logo após a exposição ao frio, em diferentes fases do ciclo de claro/escuro.

2.1) Estratégias

Para caracterizar os efeitos do frio e da luz na atividade da NR, analisou-se inicialmente a atividade da NR *in vitro* em folhas e raízes de abacaxizeiro após exposição ao frio em diferentes períodos de exposição (1, 3, 6 ou 9 horas) a 10°C, na presença ou na ausência da luz. A emissão do NO foi estimada nas mesmas condições, por leitura em espectrofluorímetro. As atividades da NRPM e da NRc foram avaliadas após o fracionamento e separação das membranas plasmáticas do citossol em pontos em que houve indução de atividade nas folhas e raízes.

Para análise do efeito do frio no ritmo diário de atividade, plantas foram expostas por 6 horas a 10°C em diferentes fases do ciclo de claro/escuro e a atividade da NR foi avaliada *in vivo*, em condições de reaquecimento por 24 horas em intervalos de 3 horas.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Obtenção do material vegetal

Plantas de *Ananas comosus* foram obtidas por micropropagação, por meio de segmentos nodais como explantes (Mercier & Nievola, 2002). Esses foram inoculados em meio de cultura Murashigue & Skoog (MS) (1962), com pH 5,8 acrescido de 2 g/L de Phytigel. Os segmentos foram obtidos a partir de plantas submetidas ao estiolamento caular no escuro, crescidas em meio de mesma composição por um tempo mínimo de 2 meses. Os frascos contendo os nós foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 12 horas, 50 $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (Fig. 3).

Figura 3 – Obtenção de plantas de *Ananas comosus* por micropropagação. Plantas mais antigas tiveram suas folhas e raízes removidas e foram mantidas por aproximadamente 2 meses no escuro em meio de cultura MS para estiolamento (A). As plantas estioladas tiveram seus nós incisados (B) e inoculados em novo meio de cultura, dando origem às novas plantas (C). As coletas para os experimentos ocorreram com plantas de 3 meses, a partir de sua inoculação (D).

3.2) Delineamento experimental

As plantas foram mantidas em câmaras de temperatura e fotoperíodo controlados (12hs claro/12hs escuro), utilizando temperatura de 25°C e intensidade luminosa de 50 $\mu\text{moles f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As plantas possuíam 3 meses de idade no momento da coleta para cada experimental, sendo que 10 dias antes houve transferência para meio de cultura novo, de forma a evitar possíveis deficiências nutricionais.

A técnica utilizada para avaliar a influência do frio na atividade da NR foi o método *in vitro*, já que o método *in vivo* implicaria em submeter o tecido ainda vivo por 1 hora de incubação a 30°C, podendo modificar sua resposta. Testes preliminares foram realizados para otimização desta técnica para as folhas de abacaxizeiro (mudanças no tampão de reação) e para separar as atividades da NR ativa e total.

Inicialmente verificou-se a influência da duração do tempo de exposição ao frio e da presença ou ausência de luz em um horário fixo do ciclo de 24 horas. As plantas foram expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 1, 3, 6 ou 9 horas, a partir do meio da fase clara. A exposição ao frio ocorreu tanto na presença da luz quanto na ausência de luz, sendo que o controle (25°C constante) foi submetido às mesmas condições luminosas. O esquema representativo do experimental dessa etapa encontra-se na figura 4.

Figura 4 – Esquema representativo do delineamento experimental, onde se testou a influência do tempo de exposição a 10°C ou 25°C (controle) na atividade da NR em folhas e raízes de abacaxizeiro. Os ensaios foram realizados após 1, 3, 6 ou 9 horas no claro (A) ou no escuro (B), pelo método *in vitro*.

Para distinguir a atividade da NRc da NRPM, foi utilizada a técnica do fracionamento celular seguido do ensaio da NR *in vitro* nas respectivas frações celulares. Testes preliminares foram realizados para verificar a existência da NRPM em folhas e para aumentar a sensibilidade da técnica em raízes. Foi também testado o ensaio para a atividade da ATPase de membrana plasmática, utilizada como controle para verificar a pureza de cada fração celular. As plantas foram submetidas ao frio nas condições com maior indução da atividade da NR para as folhas e para as raízes, de acordo com os resultados obtidos nos experimentos anteriormente descritos. O ensaio enzimático foi realizado nas frações de citossol e de membrana plasmática com diferentes doadores de elétrons (NADH, NADPH e succinato).

Todos os resultados de atividade da NR foram expressos em conteúdo de proteína presente na amostra do ensaio (atividade específica).

Além dos ensaios para determinar a atividade da NR, procurou-se verificar o envolvimento do óxido nítrico (NO) nessas condições. A quantificação da emissão de NO foi realizada *in vivo* nas mesmas condições da figura 4, isto é, exposição a 1, 3, 6 ou 9 horas a 10°C ou 25°C (controle), na presença ou ausência da luz.

Finalmente, avaliou-se se haveria influência na resposta ao frio de acordo com sua aplicação em diferentes momentos da fase clara ou escura do ciclo de 24 horas. Plantas de abacaxizeiro foram mantidas a 10°C ou a 25°C (controle) por 6 horas a partir de 4 horários selecionados (início da fase clara, meio da fase clara, início da fase escura, meio da fase escura). A atividade da NR foi avaliada por ensaio *in vitro*. Já para analisar o efeito posterior a exposição ao frio, ou seja, o efeito do reaquecimento a 25°C no ciclo de atividade da NR (24 horas), utilizou-se o método *in vivo*, já que a temperatura foi mantida constante nos dois tratamentos e o método *in vitro* seria muito longo para ensaios com intervalos curtos de tempo. As coletas foram realizadas em folhas e raízes em intervalos de 3 horas nas 24 horas seguintes de cada tratamento. O esquema representativo do experimental dessa etapa encontra-se na figura 5.

Figura 5 – Esquema representativo do delineamento experimental, onde se testou a influência da exposição a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas na atividade da NR em diferentes fases do ciclo de claro/escuro: início da fase clara (A), meio da fase clara (B), início da fase escura (C), meio da fase escura (D). A atividade da NR logo após a exposição ao frio foi avaliada por ensaios *in vitro* e *in vivo*. As coletas foram realizadas em intervalos de 3 horas por 24 horas, na temperatura de 25°C (ensaio *in vivo*).

3.3) Ensaios bioquímicos

Atividade in vivo da NR

A análise da atividade *in vivo* da NR foi baseada no método descrito por Jaworski (1971) adaptado para *Ananas comosus* por Nievola e Mercier (2001). Folhas e raízes foram fragmentadas separadamente para a obtenção de 1 g e 0,5 g de massa fresca, respectivamente. Foram adicionados, em cada tubo, 6 mL da solução de incubação contendo tampão fosfato (pH 7,5) (KH_2PO_4 0,1 M, NaOH 0,1M), KNO_3 50 mM e n-Propanol 3%, previamente

aquecido a 30°C após desaeração. As amostras foram infiltradas a vácuo por 3 vezes de 1 minuto e alíquotas de 1 mL foram coletadas em seguida para determinar o nitrito no tempo zero. O restante foi mantido em banho-maria à temperatura de 30°C por 1 hora. Ao final da incubação, alíquotas de 1 mL foram coletadas para a determinação do nitrito no tempo de 60 minutos, seguindo a metodologia de Hageman and Reed (1980). O experimento foi realizado em triplicatas.

Atividade in vitro da NR (ativa e total)

A atividade *in vitro* da NR foi realizada nas plantas mantidas em baixa temperatura, seguindo a metodologia de Long e Oaks (1990), adaptado para raízes de *Ananas comosus* por Santos (2010). Para separar a atividade da NR total da enzima ativa (desfosforilada), utilizou-se como base o trabalho de Kaiser e Spill (1991). Como o protocolo era específico para as raízes e não detectava atividade significativa nas folhas, foram feitos alguns testes posteriores de padronização, entretanto, apenas a concentração de leupeptina no tampão de extração foi alterada no protocolo final. Folhas e raízes foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido e as amostras foram acrescidas de tampão de extração na proporção de 1 g/2 mL (folhas) e 1 g/4 mL (raízes), respectivamente. Esse tampão, cuja preparação ocorreu minutos antes de iniciar a coleta, foi mantido em gelo e teve como composição: Tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8.5), EDTA 1 M, DTT 1 mM, BSA 1 %, FAD 20 µM e leupeptina 200 µM. A centrifugação foi feita a 14.000 g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em 4 camadas de gaze e reservados em tubos acondicionados em gelo. Alíquotas de 200 µL do extrato foram colocadas em microtubos que continham o tampão de reação para um volume final de 0,5 mL. A constituição desse tampão foi: Hepes-KOH 650 mM (pH 7.0), FAD 10 µM, DTT 1 mM, EDTA 10 mM (total) ou MgCl₂ 15 mM (ativa) e KNO₃ 10 mM. O extrato para

NR total foi incubado previamente por 12 minutos em 11 μ L de solução contendo AMP 250 mM e EDTA 500 mM. Após uma pré-incubação de 5 minutos a reação foi iniciada com a adição de 25 μ L de NADH 5 mM, preparado na hora e diluído em tampão fosfato-potássio (KPO_4 100 mM) (pH 7,0). A incubação ocorreu por 30 minutos a 28°C. Para interromper a reação acrescentaram-se 62,5 μ L de acetato de zinco 500 mM e os tubos de reação foram transferidos imediatamente para o gelo. Em seguida foram centrifugados a 13.000 g por 10 minutos à temperatura ambiente.

O sobrenadante foi usado para determinação colorimétrica do nitrito formado (Hageman and Reed, 1980). O experimento foi realizado em triplicata.

Determinação do nitrito formado

A metodologia usada para medir o nitrito formado foi a descrita por Hageman e Reed (1980). Alíquotas de 1 mL da solução foram adicionadas de 0,3 mL da solução de sulfanilamida 1% (em HCl 3M) seguido de 0,3 mL da solução de n-naftil-diamino 0,02%. Os tubos permaneceram em repouso por aproximadamente 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Ao final desse período, foi adicionada 0,9 mL de água ultra-filtrada (apenas para NR *in vivo*) e a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Fracionamento celular

Para identificar a atividade da NRPM e da NRc, foi utilizada a técnica de fracionamento celular por partição com sistema de duas fases (Dextran T-500 e PEG 3350), segundo Larsson *et al.* (1994), adaptado para *Ananas comosus* por Santos (2010). Folhas e

raízes foram separadas e homogeneizadas com tampão (sacarose 250 mM, glicerol 10%, Tris-Mes 25 mM (pH 7.7), EDTA 3 mM, DTT 2,5 mM, BSA 1%, leupeptina 50 μ M para raízes e 200 μ M para folhas, FAD 20 μ M). A proporção foi de 1 g/3 mL. O material homogeneizado foi, então, filtrado em 4 camadas de gaze no qual plastídeos, mitocôndrias etc foram precipitados, após centrifugação a 10.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 85.000 g por 50 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuspenso com 4 mL de tampão de ressuspensão (sacarose 330 mM, tampão fosfato-potássio (KPO_4 5 mM) (pH 7,8), KCl 5 mM, DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM), formando a fração microssomal.

Para a partição de fases, os microssomos (1,5 ml) foram acrescentados em um sistema pré-preparado de duas fases. O sistema de fases foi composto por 7% (raízes) ou 7,2% (folhas) (m/m) de dextran T-500, 6% (raízes) ou 6,2% (folhas) (m/m) de polietilenoglicol (PEG) 3350, sacarose 330 mM, tampão fosfato-potássio (KPO_4 5 mM) (pH 7,8). O material foi, então, misturado, submetendo-se os tubos a 30 inversões. Uma nova centrifugação foi feita a 1.500 g por 5 minutos. Foram observadas duas fases distintas: uma superior, composta por membranas plasmáticas e uma fase inferior, composta por membranas intracelulares. A atividade da NR foi avaliada segundo a metodologia *in vitro* já descrita, utilizando como doadores de elétrons o NADH 0,25 mM, NADPH 0,25 mM (ambos diluídos em tampão fosfato-potássio (KPO_4 100 mM) (pH 7,0)) ou succinato de sódio 5 mM diluído em água ultrapurificada.

Atividade da H^+ -ATPase de membrana plasmática

Como controle positivo para a fração de membrana plasmática, foi utilizado o ensaio da H^+ -ATPase de membrana plasmática (PM- H^+ -ATPase), baseado no protocolo de Santos *et*

al. (2009). Para tanto, os extratos de citoplasma e membranas totais, obtidos no fracionamento celular, foram incubados em meio de reação contendo MES-BTP 30 mM (pH 6,5), MgSO_4 5 mM, KCl 50 mM, Na_2MoO_4 1 mM, Triton X-1000 2 mL/L, KNO_3 50 mM, NaN_3 1 mM e ATP 5 mM. Em cada tubo foram adicionados 20 μL de citoplasma ou 50 μL de membrana, completando 500 μL com o tampão de reação. Para diferenciar a produção de fosfato da membrana plasmática da produção por outras vias, utilizou-se como branco a mesma reação contendo vanadato de sódio a 0,2 mmol L^{-1} , um inibidor conhecido da $\text{PM-H}^+\text{-ATPase}$. Após 30 minutos a 30°C, a reação foi interrompida com a adição de 1 mL do meio de parada de reação (H_2SO_4 2% v/v, SDS 5% m/v, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 0,7% m/v) e 50 μL de ácido ascórbico 10% m/v. Após 10 minutos, a coloração foi cessada com a aplicação de 1,45 mL do meio contendo citrato (4% de citrato de sódio e 2% ácido acético glacial), e a leitura feita em espectrofotômetro a 820 nm. As reações foram feitas em duplicatas e a atividade da $\text{PM-H}^+\text{-ATPase}$ foi calculada com base na diferença da média com e sem vanadato.

Quantificação de proteínas

Os ensaios para fracionamento celular foram baseados no conteúdo de proteína total das amostras (mg), segundo o método de Bradford (1976). Alíquotas de 10 a 100 μL de cada amostra foram diluídas em água até completar 790 μL . Foram adicionados em cada tubo 200 μL da solução pronta de Bradford da Sigma® e a leitura foi feita a 590 nm em espectrofotômetro. As análises foram feitas em triplicata.

Quantificação de Óxido Nítrico (NO)

O protocolo para quantificação de NO foi baseado no trabalho de Mito (2011), para *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). Folhas (0,15 g) e raízes (0,1 g) foram fragmentados em microtubos e incubados em solução de DAR4M 75 μ M em tampão fosfato (KH_2PO_4 50 mM, NaOH 50 mM) (pH 7,2) por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,5 mL do mesmo tampão fosfato e as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante, após coletado, foi acrescido de mais 1,5 mL de tampão fosfato. Finalmente, as amostras foram lidas em espectrofluorímetro com comprimentos de onda de 560 nm (excitação) e 575 nm (emissão). Os valores foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, isto é, a fluorescência quantificada e corrigida pelo tempo de incubação e quantidade de massa fresca utilizada.

3.4) Análise estatística dos dados

Os dados obtidos foram submetidos ao teste T de Student (dois tratamentos) ou ao teste Tuckey ($p < 5\%$) (mais de dois tratamentos) quando necessário, para verificar diferenças significativas com relação ao controle de cada experimental (Zar, 1996).

4 – RESULTADOS

4.1) Padronização da metodologia da NR *in vitro* para as folhas

Considerando que no ensaio para a atividade da NR *in vivo*, o tecido é mantido vivo a 30°C durante o período de incubação, questionou-se se essa metodologia seria adequada para avaliar seu estado em baixas temperaturas. Por esse motivo, o método *in vitro*, recentemente padronizado para raízes de abacaxizeiro, foi selecionado. Como estavam sendo obtidas atividades muito baixas nas folhas, foram testadas algumas mudanças no protocolo. Na figura 6 estão representados os resultados para alterações na composição do tampão de extração:

Figura 6: Atividade da NR *in vitro* em folhas de abacaxizeiro, com mudanças no tampão de extração: controle, com tampão de extração original; tampão de extração com todos os componentes duas vezes mais concentrados; tampão com leupeptina e albumina bovina (BSA) duas vezes mais concentrados; tampão com leupeptina 100 µM e tampão com BSA a 2%. As barras representam o desvio-padrão e letras diferentes indicam diferenças significativas apontadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Observou-se que aumentar a concentração de leupeptina, sem modificar a concentração dos outros componentes do tampão de extração, trouxe maior eficácia para

obtenção de maior atividade da NR em folhas. A partir desses dados, foram testadas diferentes concentrações de leupeptina, conforme mostrado na figura 7.

Figura 7: Atividade da NR *in vitro* em folhas de abacaxizeiro com mudanças na concentração de leupeptina no tampão de extração (aumentado em duas, quatro ou oito vezes em relação à concentração no protocolo original). As barras representam o desvio-padrão e letras diferentes indicam diferenças significativas apontadas pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Optou-se por utilizar a leupeptina com concentração de 200 μM , já que em 400 μM não houve diferença significativa. Desta forma, foi possível aumentar a sensibilidade do método *in vitro* para detectar a atividade da NR em folhas de abacaxizeiro, permitindo seu uso para as análises futuras.

Para separar a atividade da NR ativa (proteína desfosforilada) e total (proteína fosforilada e desfosforilada), foram empregados diferentes tampões de reação, sendo que para a NR total o extrato foi incubado previamente em solução contendo AMP e EDTA. Como essa metodologia não havia sido testada ainda para plantas de abacaxizeiro, efetuou-se um teste com folhas ou raízes, como demonstrado na figura 8.

Figura 8: Atividade da NR ativa e total (*in vitro*) em folhas e raízes de abacaxizeiro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre a NR ativa e total pelo teste t ($p < 0,05$).

Percebeu-se um aumento significativo na atividade da NR total quando comparada com a ativa, tanto nas folhas como nas raízes, demonstrando que essa metodologia é possível de ser empregada para o abacaxizeiro. As folhas apresentaram taxa de ativação em torno de 60%, enquanto as raízes apresentaram taxa de ativação em torno de 70% (baseado apenas nas médias).

4.2) Efeito da duração do estímulo do frio (10°C) sobre a atividade da NR *in vitro* em folhas e raízes de abacaxizeiro na presença de luz ou no escuro

Para verificar as influências do tempo de exposição ao frio e da luz na NR, todos os experimentos tiveram início no meio da fase clara, já que é quando a atividade da NR, geralmente, atinge valores máximos em um ciclo de claro/escuro, sendo possível observar tanto um incremento como possíveis quedas de atividade de forma detectável (ver item 3.2 – Fig. 4). A partir daí, as plantas foram expostas a 10°C na presença ou na ausência da luz por 1,

3, 6 ou 9 horas, utilizando-se o ensaio *in vitro* para a atividade da NR. O método *in vivo* também foi empregado, entretanto, como previsto, apresentou uma variação muito grande em suas respostas (dados não apresentados). A atividade da NR foi separada em ativa (enzima desfosforilada) e total (enzima desfosforilada e fosforilada).

Na figura 9 foram representados os resultados obtidos para as folhas, em plantas de abacaxizeiro expostas a 10°C a partir do meio da fase clara e mantidas na presença de luz.

Figura 9: Atividade da NR *in vitro* ativa (a) e total (b) em folhas de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) a partir do meio da fase clara em diferentes intervalos de tempo. O experimento foi inteiramente conduzido na presença de luz. As barras representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Observou-se um estímulo positivo na atividade da NR nas folhas expostas a 10°C após 1 e 6 horas, tanto na NR ativa (Fig. 9a) como na total (Fig. 9b). Após 9 horas as plantas submetidas ao frio sofreram uma queda brusca de atividade comparado ao controle.

Na figura 10 apresentaram-se os dados obtidos para a NR ativa e NR total das raízes, submetidas às mesmas condições anteriores (frio na presença de luz).

Figura 10: Atividade da NR *in vitro* ativa (a) e total (b) em raízes de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) a partir do meio da fase clara em diferentes intervalos de tempo. O experimento foi inteiramente conduzido na presença de luz. As barras representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Percebeu-se um incremento após 3 horas de exposição a 10°C na atividade da NR ativa (Fig. 10a) e total (Fig. 10b) das raízes, contudo, em menor intensidade se comparado aos aumentos encontrados nas folhas (Fig. 9). Após 6 horas a 10°C, houve queda na atividade da NR ativa.

Este experimento foi repetido na ausência da luz, iniciando-se no meio da fase clara, como anteriormente descrito, mas com a luz apagada a partir daí. A atividade encontrada para a NR em folhas foi representada na figura 11.

Figura 11: Atividade da NR *in vitro* ativa (a) e total (b) em folhas de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) a partir do meio da fase clara em diferentes intervalos de tempo. O experimento foi inteiramente conduzido na ausência de luz. As barras representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Foi possível observar um estímulo positivo pelo frio nas folhas após 1 hora de exposição, tanto na atividade da NR ativa (Fig. 11a) quanto na total (Fig. 11b), seguido de queda às 3 horas e subsequente aumento às 6 horas, apenas para a NR ativa. Tanto o controle como as plantas submetidas ao frio apresentaram queda de atividade nos tempos de coleta de 6 e 9 horas.

Na figura 12 foram mostrados os resultados obtidos para as raízes, submetidas a 10°C no escuro.

Figura 12: Atividade da NR *in vitro* ativa (a) e total (b) em raízes de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) a partir do meio da fase clara em diferentes intervalos de tempo. O experimento foi inteiramente conduzido na ausência de luz. As barras representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

As raízes mostraram aumentos das atividades da NR ativa (Fig. 12a) e NR total (Fig. 12b) nas raízes após 1, 3 e 6 horas a 10°C, sendo que, às 6 horas, o estímulo foi mais intenso.

Ao comparar os resultados na luz (Figs. 9 e 10) e no escuro (Figs. 11 e 12), notou-se que, de maneira geral, a atividade de folhas e raízes foram mais baixas no escuro.

Todos os experimentos apresentados neste item foram repetidos, confirmando o aumento na atividade da NR após 1 e 6 horas a 10°C no claro. Na raízes ratificou-se o incremento da NR após 3 horas de frio no claro e 6 horas de frio no escuro.

A seguir, foram selecionados os pontos de maior indução pelo frio para repetição do experimental (6 horas a 10°C no claro para as folhas e no escuro para as raízes), nos quais a atividade da NR de citoplasma e de membrana plasmática foram separadas.

4.3) Padronização do método do fracionamento celular para atividade da NRc e NRPM

Assim como ocorreu com o ensaio da NR *in vitro*, a técnica do fracionamento celular não havia sido padronizada para as folhas, apenas para as raízes do abacaxizeiro. Nos primeiros ensaios as atividades da NRPM e da NRc em folhas foram indetectáveis. A atividade da NRPM encontrada em raízes também foi inesperadamente muito baixa, sendo necessários testes adicionais para detecção de atividade nos dois órgãos. Ademais, para confirmar o isolamento das frações celulares foi preciso um ensaio para a atividade de uma enzima exclusiva de citoplasma ou de membrana plasmática. Selecionou-se como controle a PM-H⁺-ATPase, enzima exclusiva de membrana plasmática e comumente utilizada em trabalhos envolvendo a NRPM.

Para as raízes foram testadas mudanças na concentração de massa (de 3 g/ mL para 6 g/ mL), na velocidade de centrifugação para separação das frações (de 26.000 rpm para 32.000 rpm) e na composição do tampão de reação (acrescentou-se o detergente Triton X-100), como apresentado na figura 13.

Figura 13: Atividade da NRPM total em raízes de abacaxizeiro submetidas a diferentes mudanças de protocolo: aumento na concentração da massa (dobro da original), velocidades de centrifugação aumentada de 26000rpm para 32000rpm ou adição de Triton X-100 na reação (0,1%). Os valores foram expressos em mg de proteína solúvel. As barras representam o desvio-padrão e o asterisco aponta diferença significativa com relação ao controle pelo teste t ($p < 0,05$).

Nota-se pelos resultados obtidos que nenhuma das alterações propostas foi capaz de promover um aumento de atividade da NRPM com relação ao protocolo original. O mesmo foi realizado para as folhas, entretanto, foi observada atividade detectável ao modificar a velocidade de centrifugação, como mostrado na figura 14.

Figura 14: Atividade da NRPM total em folhas de abacaxizeiro submetidas a diferentes velocidades de centrifugação (fracionamento celular). Os valores foram expressos em mg de proteína solúvel. As barras representam o desvio-padrão e o asterisco apontam diferenças significativas entre os tratamentos pelo teste t ($p < 0,05$).

Atentou-se que, aumentando a velocidade de centrifugação nas folhas, constatou-se uma atividade razoável para a fração de membrana plasmática. Para a NRc nas folhas, ao aplicar a mesma concentração de leupeptina do ensaio da NR *in vitro* no tampão de extração foi possível detectar atividade da NR no citoplasma. Já a NRPM de folhas e raízes apresentaram-se insensíveis ao aumento na concentração de leupeptina.

Para confirmar se a fração de membrana estava de fato sendo isolada e que as enzimas contidas nessa fração estivessem com o sítio catalítico exposto, efetuou-se o ensaio da PM- H^+ -ATPase, que serviu de controle positivo para o ensaio da NRPM, além de verificar possíveis contaminações de membrana plasmática na fração de citoplasma.

Nos primeiros ensaios para a PM- H^+ -ATPase não se obteve atividade na fração de membrana plasmática, na qual revelou, posteriormente, interferência do PEG 3350 e/ou do Dextran T-500 na coloração. Outros ensaios foram, então, executados utilizando-se a fração de membranas totais, isto é, antes da separação entre as membranas, obtendo desta forma

leitura no espectrofotômetro. Para garantir que a atividade encontrada pertencia de fato à membrana plasmática, utilizou-se como controle o vanadato de sódio, um inibidor específico para a PM-H⁺-ATPase. Os valores representados na figura 15 são a diferença entre o fosfato total produzido no extrato e o fosfato produzido no mesmo extrato na presença do vanadato de sódio.

Figura 15: Atividade da PM-H⁺-ATPase em folhas e raízes de abacaxizeiro. Os valores representados são a diferença entre a média do conteúdo de fosfato com e sem vanadato de sódio. As barras verticais representam o desvio-padrão, calculado pela fórmula: $\sqrt{[(DP \text{ com vanadato})^2 + (DP \text{ sem vanadato})^2]}$.

Os resultados indicam que, de fato, existe atividade da PM-H⁺-ATPase nas membranas de raízes e que a contaminação no citoplasma foi baixa (representou aproximadamente 12% da atividade da membrana plasmática nas folhas e 5% nas raízes), comprovando a eficiência do protocolo utilizado.

Desta forma, concluiu-se que os baixos valores encontrados para a NRPM (em folhas e raízes) podem refletir uma condição natural desta forma da enzima. Optou-se, portanto, em prosseguir os experimentos com as modificações incorporadas nos protocolos.

4.4) Efeito da aplicação do estímulo de frio (10°C) sobre as atividades das NRs de citossol e de membrana plasmática com diferentes doadores de elétrons (NADH, NADPH e succinato)

Para avaliar a influência do frio na atividade da NRc e NRPM utilizaram-se o NADPH e o succinato como doadores de elétrons, além do NADH, visando verificar qual isoforma estaria envolvida nos resultados obtidos anteriormente. Na figura 16 foram mostrados os dados obtidos para a NRc nas folhas após 6 horas de exposição a 10°C na presença de luz.

Figura 16: Atividade da NR ativa (a) e total (b) em frações de citoplasma de folhas de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas na presença de luz. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Foi possível visualizar nas folhas um estímulo positivo do frio na atividade da NRc total (Fig. 16b) na presença de NADH e na atividade da NRc ativa (Fig. 16a) e total (Fig. 16b) na presença de NADPH. Os mesmos dados foram submetidos ao teste Tuckey, para verificar diferenças na atividade da NR entre os diferentes doadores de elétrons (dados não apresentados). Os valores com o NADH foram os maiores encontrados, enquanto os observados com NADPH e succinato não exibiram diferenças significativas, exceto para a NR ativa em plantas submetidas ao frio, que foi maior na presença do NADPH.

Na figura 17 foram representados os dados para a NRPM em folhas.

Figura 17: Atividade da NR ativa (a) e total (b) em frações de membrana plasmática de folhas de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas na presença de luz. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Notou-se que a NRPM ativa (Fig. 17a) teve um estímulo positivo pelo frio com NADH, que não se repetiu na NRPM total (Fig. 17b). As atividades da NRPM ativa com NADPH e total com NADH foram próximas de zero, considerando-se o desvio-padrão, assim como as atividades com succinato no controle (ativa) e no frio (total).

As atividades da NRPM e da NRc foram expressas por conteúdo de proteína (Fig. 18a). O ensaio da PM-H⁺-ATPase também foi realizado como controle em ambos os tratamentos (Fig. 18b).

Figura 18: Conteúdo de proteínas solúveis (a) e atividade da PM-H⁺-ATPase (b) do citoplasma e da membrana plasmática em folhas expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas na presença de luz. As barras verticais representam o desvio-padrão e as setas representam aumento significativo em relação ao controle pelo teste t ($p < 0,05$). O desvio-padrão da atividade da PM-H⁺-ATPase foi calculado pela fórmula: $\sqrt{[(DP \text{ com vanadato})^2 + (DP \text{ sem vanadato})^2]}$.

Percebeu-se que, após a exposição ao frio, ocorreu uma redução na quantidade de proteínas solúveis na fração de citoplasma e um aumento na fração de membrana plasmática (Fig. 18a). Apesar de essa diferença influenciar nos resultados obtidos para a atividade da NR, o estímulo positivo na atividade a 10°C permaneceu mesmo antes da conversão por proteínas. A atividade da PM-H⁺-ATPase foi baixa no citoplasma em ambos os tratamentos, enquanto na membrana foi alta, indicando pouca contaminação nos extratos do ensaio (Fig. 18b).

Na figura 19 foram apresentados os resultados para a atividade da NRc em raízes expostas ao frio no escuro (6 horas).

Figura 19: Atividade da NR ativa (a) e total (b) em frações de citoplasma de raízes de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas no escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Observou-se um estímulo positivo pelo frio na NRc ativa (Fig. 19a) e total (Fig.19b), tanto na presença de NADH quanto na de NADPH. A atividade com o succinato foi próxima de zero em todos os tratamentos. Comparando as atividades entre os diferentes doadores de elétrons, ela foi maior com o NADH, seguido do NADPH e por último com o succinato, no qual os valores foram os mais baixos (teste Tuckey entre doadores de elétrons, dados não apresentados).

Os dados para atividade da NRPM do mesmo experimento encontram-se na figura 20.

Figura 20: Atividade da NR ativa (a) e total (b) em frações de membrana plasmática de raízes de abacaxizeiro expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas no escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Ao contrário do encontrado para a NRc (Fig. 19), as atividades da NRPM ativa (Fig. 20a) e total (Fig. 20b) não mostraram alterações no frio com relação ao controle (25°C), apenas queda na presença de succinato para a NRPM ativa. Assim como ocorreu com as folhas (Fig. 17), os desvios-padrão em geral foram altos, tornando os resultados imprecisos.

A quantificação de proteínas solúveis e de atividade da PM-H⁺-ATPase foram apresentados na figura 21.

Figura 21: Conteúdo de proteínas solúveis (a) e atividade da PM-H⁺-ATPase (b) do citoplasma e da membrana plasmática em raízes expostas a 10°C ou 25°C (controle) por 6 horas no escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e as setas representam aumento significativo em relação ao controle pelo teste t ($p < 0,05$). O desvio-padrão da atividade da PM-H⁺-ATPase foi calculado pela fórmula: $\sqrt{[(DP \text{ com vanadato})^2 + (DP \text{ sem vanadato})^2]}$.

Assim como ocorreu nas folhas (Fig. 18a), houve redução na quantidade de proteínas do citoplasma a 10°C e aumento da membrana plasmática nas raízes (Fig. 21a). Essa redução no conteúdo de proteínas do citoplasma foi responsável pelas diferenças de atividade entre os tratamentos na NRc, já que elas surgem somente após a conversão por proteínas. Assim como nas folhas (Fig. 18b), a atividade da PM-H⁺-ATPase foi próxima de zero no citoplasma e alta na membrana, indicando baixa contaminação do ensaio.

4.5) Efeito da aplicação do estímulo de frio (10°C) sobre a emissão de NO por folhas e raízes de abacaxizeiro

Para investigar possíveis efeitos do incremento na atividade da NR encontrado no frio, foi quantificada a emissão de NO em folhas e raízes nas mesmas condições ilustradas no item 3.2 (Fig. 4). Na figura 22 foram representados os resultados para a quantificação de NO na presença de luz.

Figura 22: Emissão de NO em folhas (a) e raízes (b) de abacaxizeiro após 1, 3, 6 ou 9 horas de exposição a 10°C ou 25°C (controle), na presença de luz. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias de NO por hora e por massa fresca. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Observou-se nas folhas (Fig. 22a) um estímulo positivo pela baixa temperatura na emissão de NO após 1 e 3 horas de exposição e redução após 9 horas a 10°C, enquanto as raízes (Fig. 22b) apresentaram apenas queda após 6 horas com relação ao controle (25°C).

Na figura 23 foram mostrados os valores para a quantificação de NO na ausência da luz.

Figura 23: Emissão de NO em folhas (a) e raízes (b) de abacaxizeiro após 1, 3, 6 e 9 horas de exposição a 10°C ou 25°C (controle), no escuro. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias de NO por hora e por massa fresca. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Notou-se que no escuro, as folhas (Fig. 23a) exibiram acréscimo na emissão de NO após 1 e 9 horas de exposição a 10°C, enquanto as raízes (Fig. 23b) sofreram diminuição após 1 hora e aumento em 9 horas com relação ao controle (25°C).

Ao comparar os resultados encontrados para folhas (Figs. 22a e 23a) e raízes (Figs. 22b e 23b), percebeu-se que a emissão de NO nas raízes foi mais baixa, ao contrário do que ocorreu com a atividade da NR. A quantificação do NO foi realizada pela primeira vez em raízes de abacaxizeiro *in vitro*.

4.6) Efeito da aplicação do frio na atividade da NR (*in vitro*) em diferentes fases do ciclo de 24 horas em folhas e raízes de abacaxizeiro

Visto que a presença de luz ou de escuro em um horário fixo exerceu influência na resposta da NR ao frio (10°C), buscou-se avaliar a influência da fase do ciclo de 24 horas (fotoperíodo de 12hs claro/12hs escuro) na qual as plantas foram expostas à baixa temperatura. Folhas e raízes foram submetidas a 10°C por 6 horas em 4 momentos do ciclo (ver item 3.2 – Fig. 5). Os resultados obtidos para as folhas encontram-se na figura 24.

Figura 24: Atividade da NR *in vitro* ativa (a) e total (b) em folhas de abacaxizeiro mantidas por 6 horas a 25°C (controle) ou 10°C. Os experimentos foram realizados em diferentes fases do ciclo de 12hs claro/12hs escuro. A fase escura é representada pela área em cinza do gráfico. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Observou-se nas folhas um estímulo positivo pelo frio às 8hs (frio no meio da fase escura) e às 20hs (frio no meio da fase clara), tanto na atividade da NR ativa (Fig. 24a) quanto na total (Fig. 24b), enquanto às 14hs (início da fase clara), o aumento foi apenas na atividade da NR total. Às 2hs houve queda na NR ativa com relação ao controle (25°C).

Na figura 25 foram representados os resultados para as raízes.

Figura 25: Atividade da NR *in vitro* ativa (a) e total em raízes (b) de abacaxizeiro mantidas por 6 horas a 25°C (controle) ou 10°C. Os experimentos foram realizados em diferentes fases do ciclo de 12hs claro/12hs escuro. A fase escura é representada pela área em cinza do gráfico. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (10°C) e controle (25°C) pelo teste t ($p < 0,05$).

Foi constatado nas raízes um incremento na atividade da NR ativa (Fig. 25a) e total (Fig. 25b) quando exposta a 10°C às 2hs (início da fase escura) e às 8hs (meio da fase escura). Às 14hs houve um aumento de atividade apenas para a NR total.

Tendo em vista os dados obtidos, notou-se que as raízes tiveram um estímulo positivo pelo frio preferencialmente quando este foi aplicado na ausência de luz, independente da fase (Figs. 12 e 25). Já as folhas mostraram indução na atividade da NR a 10°C na fase clara e na escura (Fig. 24), ao contrário do que ocorreu em horário fixo, na qual houve dependência da presença de luz (Fig. 9). Na tentativa de esclarecer os fenômenos visualizados, avaliou-se o efeito da baixa temperatura sobre o ritmo diário de atividade da NR, apresentado no próximo item.

4.7) Alterações no ritmo de atividade da NR (*in vivo*) após 6 horas submetidas a temperatura de 10°C em diferentes fases do ciclo de 24 horas

Plantas de abacaxizeiro foram expostas a 10°C por 6 horas nas mesmas fases do item anterior, transferidas em seguida a 25°C e mantidas nessa temperatura por 24 horas. O método utilizado para quantificar a atividade da NR foi o *in vivo*, já que todos os tratamentos nestes experimentos se encontrariam na temperatura de 25°C. Além disso, a metodologia *in vitro* é mais longa e complexa, sendo inviável para experimentos com tempos consecutivos curtos.

Na figura 26 encontram-se os resultados para as plantas expostas ao frio no início da fase clara, com os ensaios iniciando-se no claro (ver item 3.2 - Fig. 5A).

Figura 26: Atividade da NR em folhas (a) e raízes (b) de abacaxizeiro após 6 horas de exposição a 10°C ou 25°C (controle) no início da fase clara. A área em cinza representa a fase escura do ciclo de 12hs claro/12hs escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (6hs a 10°C) e controle (25°C constante) pelo teste t ($p < 0,05$).

Observou-se que, nas folhas (Fig. 26a), inicialmente (14 horas) o controle apresentou maior atividade da NR, seguido de queda e aumento a partir do início da fase clara. As plantas submetidas ao frio exibiram um incremento de atividade seguido de queda na fase escura, com aumento significativo em relação ao controle 6 horas após o início dos ensaios e durante toda a fase escura (coleta das 23, 2, 5 e 8 horas). Nas raízes (Fig. 26b) não houve diferenças

de comportamento na atividade da NR ao longo do ciclo, sendo que as plantas expostas a 10°C exibiram maior atividade em relação ao controle às 20, 2 e 5 horas.

Na figura 27 representou-se a atividade da NR em folhas e raízes após 6hs em baixa temperatura a partir do meio da fase clara. Os ensaios iniciaram-se no escuro (ver item 3.2 - Fig. 5B).

Figura 27: Atividade da NR em folhas (a) e raízes (b) de abacaxizeiro após 6 horas de exposição a 10°C ou 25°C (controle) no meio da fase clara. A área em cinza representa a fase escura do ciclo de 12hs claro/12hs escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (6hs a 10°C) e controle (25°C constante) pelo teste t ($p < 0,05$).

Percebeu-se nas folhas (Fig. 27a) que a atividade da NR no controle caiu na fase escura e aumentou com a presença da luz. Já o grupo exposto ao frio mostrou um incremento na atividade da NR no escuro (coletas das 23 e 2 horas), mas mantiveram níveis baixos mesmo com a chegada da fase clara. Nas raízes (Fig. 27b) não houve grandes diferenças no comportamento ao longo do ciclo. Se comparados por horários, ocorreu aumento significativo nas raízes submetidas ao frio às 2 horas.

Na figura 28 foram apresentados os dados obtidos após a exposição a 10°C de folhas e raízes no início da fase escura. Os ensaios enzimáticos começaram no escuro (ver item 3.2 – Fig. 5C).

Figura 28: Atividade da NR em folhas (a) e raízes (b) de abacaxizeiro após 6 horas de exposição a 10°C ou 25°C (controle) no início da fase escura. A área em cinza representa a fase escura do ciclo de 12hs claro/12hs escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (6hs a 10°C) e controle (25°C constante) pelo teste t ($p < 0,05$).

Notou-se que, enquanto as folhas do controle tiveram um acréscimo de atividade ao longo da fase clara, atingindo valores máximos às 14 horas e decaindo até a chegada da fase escura, as folhas que foram submetidas à temperatura de 10°C não exibiram aumento ou queda de atividade pronunciada em todo o experimento, ou seja, não houve variações no ritmo da NR, com diferença significativa em relação ao controle às 14 e 17 horas. Já as raízes

apresentaram tendências semelhantes ao controle ao longo do ciclo, apesar de haver aumento significativo nos horários das 11 e 14 horas e diminuição significativa nas coletas das 2 e 20 horas.

Na figura 29 foram mostrados os resultados quando a exposição ao frio ocorreu do meio da fase escura. Os ensaios iniciaram-se no claro (ver item 3.2 – Fig. 5D).

Figura 29: Atividade da NR em folhas (a) e raízes (b) de abacaxizeiro após 6 horas de exposição a 10°C ou 25°C (controle) no meio da fase escura. A área em cinza representa a fase escura do ciclo de 12hs claro/12hs escuro. As barras verticais representam o desvio-padrão e os asteriscos apontam diferenças significativas entre tratamento (6hs a 10°C) e controle (25°C constante) pelo teste t ($p < 0,05$).

Nas folhas (Fig. 29a), enquanto o controle evidenciou atividade máxima da NR em 11 horas, o grupo submetido ao frio atingiu maiores valores entre 14 e 17 horas, sendo que às 17 horas a diferença em relação ao controle foi significativa. Nas raízes (Fig. 29b), assim como nos outros experimentos, as tendências para controle e tratamento foram semelhantes, sendo que, às 8 e 17 horas houve aumento de atividade nas plantas expostas a 10°C e, às 11 horas, redução significativa de atividade.

De forma geral, as raízes apresentaram poucas diferenças entre controle e tratamento ao longo do ciclo de claro/escuro. No caso das folhas, a baixa temperatura exerceu um efeito de atraso no ritmo diário, exceto quando ele foi aplicado no início da fase escura, gerando aparente perda de variação ao longo do ciclo. Isto poderia explicar os resultados observados nos itens 4.2 e 4.6, pois o efeito da baixa temperatura em folhas pareceu depender da condição anterior à sua aplicação, sendo mais negativa na ausência da luz.

5 - DISCUSSÃO

A temperatura é uma das principais restrições ambientais limitando tanto a produtividade como a distribuição geográfica de plantas selvagens e cultivadas. Muitas plantações subtropicais e tropicais, tais como milho, tomate, chuchu e manga, são cultivadas em ambientes temperados, no limite de sua tolerância (Allen e Ort, 2001). O abacaxizeiro é considerado uma planta de clima tropical, com temperatura ótima de crescimento entre 22 e 32°C (Carvalho *et al.*, 2005). Apesar de seu cultivo ocorrer principalmente nas regiões Norte e Nordeste, a produção em locais de clima temperado também existe, como no estado de São Paulo (Morgado *et al.*, 2004), cuja temperatura no inverno pode chegar a valores próximos de zero dependendo da região, segundo dados da Estação Meteorológica do IAG-USP, em 2011.

O estudo dos efeitos de baixas temperaturas nessas espécies torna-se importante porque, em geral, elas não possuem adaptações genéticas de tolerância, que poderiam mascarar as reações provocadas pelo frio (Graham e Patterson, 1982; Guy *et al.*, 1990; Allen e Ort, 2001). Sabe-se que o frio provoca diversas mudanças no metabolismo da planta (Guy *et al.*, 2009), entretanto, pouco se sabe sobre as enzimas responsáveis pelo metabolismo do nitrogênio.

Neste trabalho, buscou-se averiguar inicialmente a influência do tempo de duração e da luz no estímulo do frio sobre a atividade da NR em abacaxizeiro. Os experimentos iniciaram-se em um horário fixo (meio da fase clara) e, a partir daí, a NR foi quantificada logo após a exposição a 10°C em diferentes períodos na presença ou ausência da luz, por meio de ensaios *in vitro*. Foram estimadas tanto a atividade da NR ativa (proteína desfosforilada) como a total, sendo esta última um indicador da quantidade de enzima presente (fosforilada e desfosforilada), como forma de avaliar a influência do controle transcricional (Kaiser e Huber,

1997). Todos os experimentos dessa etapa foram repetidos e, ao comparar os resultados, verificou-se nas folhas um aumento na atividade da NR após 1 hora e 6 horas de exposição ao frio no claro, sendo o último tempo mais pronunciado para a NR total. Nas raízes houve incremento na NR após 3 horas a 10°C no claro e após 6 horas no escuro, sendo mais intenso no escuro (Figs. 9 a 12).

Em trabalho com folhas de tomateiro expostas ao frio na luz, foi verificado um acúmulo de transcritos da NR, provocando um estímulo positivo na síntese de proteínas e na atividade. Houve pouca variação entre a atividade da NR com (ativa) e sem magnésio (total) (Tucker e Ort, 2002). Jones *et al.* (1988), em pesquisa realizada com a mesma planta, observou que o ácido okadáico, um inibidor da proteína fosfatase 2A (PP2A), foi capaz de impedir o aumento tanto da atividade como dos níveis de RNAm da NR.

Resultado semelhante foi encontrado para folhas de trigo, cuja atividade da NR ativa foi estimulada pelo frio apenas na presença de luz (2 horas a 20°C seguido de 2 horas a 4°C) (Yaneva *et al.*, 2002). Esse trabalho também propôs que, em baixas temperaturas, apesar de existir uma tendência de redução de proteínas fosfatases gerada por um influxo de cálcio e um aumento na taxa de fosforilação (Monroy *et al.*, 1998), podem existir membros da família PP2A insensíveis à inativação pela baixa temperatura. Essas proteínas poderiam ser responsáveis tanto pelo aumento na taxa de ativação da NR como do acúmulo de transcritos observados.

Os resultados desses estudos poderiam explicar também o incremento de atividade da NR encontrado em folhas de abacaxizeiro em baixa temperatura (10°C) apenas na presença de luz, já que ela é essencial para a ativação das fosfatases da NR (Kaiser *et al.*, 1999). Elas também atuam em conjunto na ativação da enzima sacarose-fosfato-sintase (SPS), o que poderia explicar a indução da NR por açúcares (Jones *et al.*, 1988; Yaneva *et al.*, 2002). A

sacarose é considerada um crioprotetor primário, capaz de promover mudança no potencial osmótico e de ser uma fonte de energia para processos metabólicos quando temperaturas favoráveis são retomadas. Em uma investigação com folhas de espinafre, foi constatado um aumento na atividade e no teor de proteína da SPS após 14 dias a 5°C, assim como no conteúdo de sacarose (Guy *et al.*, 1990; Guy *et al.*, 1992).

Ao analisar os metabólitos acumulados em baixas temperaturas em variedades de *Arabidopsis thaliana* com baixa e alta capacidade de aclimação, observou-se em comum a presença de açúcares em geral e de aminoácidos como prolina, além de uma regulação positiva em componentes do ciclo da ureia e do ácido cítrico. Nas primeiras horas após a submissão ao frio, os carboidratos foram predominantes (Guy *et al.*, 2007).

Como as plantas de abacaxizeiro foram cultivadas *in vitro*, suas raízes estavam em contato direto com meio contendo sacarose. Além disso, em baixas temperaturas ocorre um aumento na degradação do amido logo nas primeiras horas, promovendo um acúmulo de açúcares, que poderiam ativar a NR mesmo no escuro, possibilitando a rápida recuperação observada posteriormente (Cheng *et al.*, 1992; Ruelland *et al.*, 1992). Outras explicações plausíveis para o estímulo positivo da NR pelo frio em raízes no escuro poderiam ser uma redução na taxa de degradação e/ou um aumento na estabilidade da enzima, consequência de uma redução geral no metabolismo da planta. Neste caso, a perda de atividade, mesmo na ausência da luz, seria menor em relação ao controle (Kaiser e Hubber, 1997).

Para analisar os efeitos do frio na NRc e na NRPM, as plantas de abacaxizeiro foram mantidas a 10°C por 6 horas na presença de luz (para as folhas) ou na sua ausência (para as raízes), já que foram os horários de maior indução pelo frio (Figs. 9 e 12). Observou-se, nas folhas, um incremento provocado pelo frio associado principalmente à NRc, na presença de NADH (NR total) e de NADPH (NR ativa e total) (Fig. 16). Ao comparar a atividade com os

diferentes doadores, notou-se que a atividade da NRc com o succinato foi relevante, sendo que sua utilização deveria ser exclusiva da NRPM, indicando contaminação de membrana na fração de citoplasma ou reação com os doadores de elétrons do próprio extrato. A capacidade da NR de utilizar o succinato foi encontrada na fração de membrana plasmática de raízes de tabaco, não sendo encontrada nas folhas. De acordo com os autores, a NRPM pode ser considerada um regulador entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio (Stöhr, 1997; Wienkoop *et al.*, 1999).

O estímulo positivo pelo frio encontrado com o NADH apenas na NR total indicou um aumento na quantidade de enzima, semelhante ao encontrado para o extrato não fracionado, podendo ser fruto de controle transcricional. Já a atividade com o NADPH foi mais alta na NR ativa, sugerindo atuação do controle pós-traducional. Esses resultados mostraram que podem existir isoformas da NR que interagem de maneiras diferentes com os dois doadores de elétrons. Apesar da NR mais comumente encontrada ser NADH específica, já foi relatada a presença da isoforma NAD(P)H biespecífica, ou seja, capaz de utilizar tanto NADH como NADPH, com preferência para o NADPH. Em folhas, essa isoforma já foi relatada para soja (jovem) e cevada mutante para o gene que expressa a isoforma NADH específica, porém, em geral, ela parece ser expressa preferencialmente nas raízes (Jolly *et al.*, 1976; Sueyoshi *et al.*, 1995; Pandey *et al.*, 1997).

Este trabalho mostrou que as folhas de abacaxizeiro provavelmente possuem a forma biespecífica, entretanto, testes adicionais seriam necessários para comprovar sua existência. Apesar dos valores para atividade da NR com NADPH serem muito próximos aos encontrados com o succinato e de existir conversão do NADH para o NADPH durante a reação, que pode ter sido reduzida em parte pela presença de fosfato na solução (Dailey *et al.*, 1982), acredita-se que a NR em folhas submetidas ao frio utilizaram o NADPH como doador de elétrons, pois apenas ele foi capaz de estimular a ativação da enzima (NR ativa) comparado

ao controle. É possível que a forma NAD(P)H biespecífica seja mais suscetível à ativação pelo frio que a forma NADH específica em folhas, provavelmente porque a limitação da taxa de fotossíntese pelo frio restringe o consumo do NADPH produzido, possivelmente gerando seu acúmulo (Huner *et al.*, 1993).

Já foi relatada a possibilidade de existirem as duas isoformas da NR também na membrana plasmática para raízes de milho (De Marco *et al.*, 1994), porém, as atividades encontradas para a NRPM ativa e total em folhas de abacaxizeiro foram contraditórias, com muitos valores próximos de zero, colocando em dúvida se elas ocorreram de fato (Fig. 17). Foi encontrada atividade com o NADH e succinato a 10°C na NR ativa e com o succinato para o controle e NADPH para ambos na NR total.

O frio provoca um enrijecimento da membrana plasmática, sendo comum em plantas um aumento na insaturação dos lipídios como forma de restaurar sua fluidez (Graham e Patterson, 1982; Ruelland *et al.*, 2009). Acredita-se que a própria fluidez da membrana pode ser uma forma de sinalizar a temperatura em plantas, como ocorre com fungos e cianobactérias. Estudos farmacológicos mostraram ser possível modificar a expressão de genes regulados pela temperatura apenas alterando a fluidez da membrana (Penfield, 2008).

Segundo Graham e Patterson (1982) plantas de tomateiro expostas ao frio por 24 horas apresentaram danos em todas as suas membranas, com exceção da plasmática. Dentre os lipídios, o incremento do ácido linoleico é considerado uma adaptação não específica à baixa temperatura. Apesar da importância da membrana na regulação da temperatura, não foram observadas alterações significativas na NRPM em abacaxizeiro.

Nas raízes, assim como nas folhas, o estímulo positivo de atividade provocado pelo frio foi associado exclusivamente à NRc e não à NRPM (Figs. 19 e 20). No trabalho de Santos (2010) foi demonstrado que, após 30 dias sob termoperíodo de 28°C dia/ 15°C noite, as

raízes apresentaram um aumento na atividade da NR na fase escura, associado à NRPM. Entretanto, na presente pesquisa, os efeitos do frio foram distintos dos observados anteriormente, visto que afetaram formas diferentes da NR. A atividade da NRPM nas raízes, assim como em folhas, apresentou de forma geral desvios-padrão muito altos, tornando os resultados imprecisos.

Ao contrário da NRc, que em estudo com folha de tomateiro apresentou variações de atividade de acordo com a disponibilidade de nitrato e luz, a NRPM manteve níveis basais de atividade mesmo na ausência prolongada desses sinalizadores, indicando que ela pode ser expressa constitutivamente (Lo Piero *et al.*, 2003). É possível que o período de 6 horas selecionado para a exposição ao frio, apesar de ser suficiente para provocar mudanças transcricionais e pós-traducionais na NRc, não seja suficiente para afetar de forma significativa os níveis de atividade encontrados para a NRPM. Além disso, segundo Stöhr e Mäck (2001), a NRPM parece se manifestar principalmente na fase escura, neste caso, o tempo na qual as plantas ficaram sem luz pode não ter sido satisfatório para sua ativação.

A atividade da NRc em raízes foi estimulada pelo frio, utilizando tanto NADH como o NADPH como doadores de elétrons, sendo que praticamente o mesmo aumento foi encontrado para a NR ativa e total. Os resultados mostraram que, apesar de haver preferência pelo NADH, já que os maiores valores de atividade da NR foram encontrados na presença dele, as raízes pareceram capazes de reduzir o nitrato utilizando o NADPH como poder redutor, apontando para a existência da isoforma NR NAD(P)H biespecífica para as raízes. Assim como ocorreu com as folhas, seriam necessários testes adicionais que eliminassem a conversão do NADPH para o NADH para confirmar sua existência. Como o frio induziu aumento com os dois doadores de elétrons, com as maiores diferenças sendo com o NADH, acredita-se que as duas isoformas poderiam ser ativadas pelo frio, com predomínio da NADH específica. A atividade encontrada para o succinato no citoplasma foi baixa, conforme

esperado, já que apenas a NRPM é capaz de utilizá-lo, segundo os trabalhos de Wienkoop *et al.* (1999), Stöhr (1997) e Stöhr e Mäck (2001). Entretanto, os baixos valores para o succinato não eram esperados para a NRPM, já que a NR apresentou capacidade de utilizar o succinato em trabalho anterior com abacaxizeiro (Santos, 2010).

Nas raízes foi sugerido, portanto, dois tipos de resposta ao frio: uma a curto prazo (horas), mediada pela NRc com preferência pelo NADH e uma a longo prazo (30 dias), mediada pela NRPM (em termoperíodo de 28°C dia/15°C noite) com preferência pelo succinato.

Ao comparar o conteúdo de proteínas solúveis nas frações de membrana plasmática e citoplasma de folhas e raízes, observou-se uma redução desse conteúdo no citoplasma e um aumento no de membrana nas plantas submetidas a 10°C. Segundo Graham e Patterson (1982), uma resposta comum ao frio é o aumento de proteínas solúveis, o que não foi o caso, talvez pelo tempo curto de exposição ou devido ao fato do abacaxizeiro não ser uma planta adaptada ao frio. O conteúdo de proteínas na membrana aumentou em folhas e raízes submetidas ao frio, assim como a atividade das PM-H⁺-ATPase parece ter sido maior em relação ao controle. Segundo Guy *et al.* (2007), transcritos relacionados às proteínas de transporte atuam significativamente apenas após a exposição a baixas temperaturas por tempos curtos de tempo. O incremento na atividade da NR em baixa temperatura manteve-se mesmo antes da conversão por proteínas nas folhas, mas nas raízes as diferenças entre tratamento (10°C) e controle (25°C) só apareceram devido a essa conversão, indicando que nas raízes a capacidade de atividade em cada proteína foi maior para compensar a redução em seu conteúdo total.

Por fim, procurou-se correlacionar as respostas da NR ao frio em folhas e raízes com a emissão de NO. Essa molécula vem sendo apontada como sinalizadora para diversos eventos da planta relacionados ao estresse, tais como déficit hídrico, salinidade, injúria mecânica e,

mais recentemente, baixas temperaturas (García-Mata e Lamattina, 2001; París *et al.*, 2007; Gupta *et al.*, 2011). Sabe-se também que a NR é capaz de produzir NO através do nitrito gerado na redução do nitrato, principalmente em situações em que a nitrito redutase (NiR) está inativa, como falta de luz ou condições de fotoinibição (Yamazaki e Sakihama, 2000; Meyer *et al.*, 2005). Os resultados na presença de luz (Fig. 22a) mostraram que houve aumento de NO nas folhas na primeira hora após a exposição ao frio, condizente com os resultados encontrados para *Arabidopsis*. Segundo Cantrel *et al.*, (2011), apenas uma hora a 4°C foi suficiente para induzir aumento na produção de NO dependente da atividade da NR e nos níveis de nitrito. O estímulo positivo na emissão de NO provocado pelo frio em uma hora nas folhas de abacaxizeiro correspondeu ao resultado encontrado para a NR *in vitro* nas mesmas condições (Fig. 9). As raízes apresentaram apenas queda após 6 horas a 10°C (Fig. 22b).

Já quando a exposição à baixa temperatura ocorreu na ausência de luz, as folhas apresentaram aumento de NO após 1 hora a 10°C (Fig. 23a). Depois de 9 horas, tanto folhas como raízes (Fig. 23b) apresentaram aumento significativo em relação ao controle (25°C). Após 6 horas no frio e no escuro as raízes apresentaram um incremento na atividade da NR, como mostrado neste trabalho (Fig. 12). O nitrito gerado pode ter provocado um aumento posterior na produção de NO, tanto em raízes como em folhas, já que na ausência de luz a NiR é inibida (Crawford, 1995). Apesar do NO ser apontado como uma peça chave nas respostas de aclimação ao frio, envolvido na expressão de genes de resposta ao frio e na síntese de crioprotetores como a prolina (Zhao *et al.*, 2009; Cantrel *et al.*, 2011), não se tem certeza da sua função em uma planta tropical como o abacaxizeiro. Acredita-se que ele pode servir tanto como um sinalizador como uma forma de reduzir o excesso de nitrito gerado pela NR. Sua origem biossintética, entretanto, não foi esclarecida, necessitando experimentos

adicionais. Em revisão, foi sugerido que tanto a NR como a enzima semelhante ao NOS poderiam ser fontes de NO na resposta ao frio (Gupta *et al.*, 2011).

Por meio das figuras 24 e 25 percebeu-se que a influência do frio na atividade da NR não dependeu apenas da condição de claro ou escuro, mas da fase do ciclo de 24 horas na qual as plantas foram submetidas ao frio. Enquanto as raízes apresentaram aumento apenas quando a baixa temperatura foi aplicada na fase escura, as folhas sofreram estímulo positivo tanto na fase clara como na escura.

Ao avaliar o efeito do frio no ritmo diário de atividade da NR, observou-se que as folhas previamente expostas a 10°C (por 6 horas), quando em reaquecimento (25°C), atingiram valores máximos 3 a 6 horas após as folhas submetidas a 25°C constante (controle) (Figs. 26a, 27a e 29a). Esses resultados estão de acordo com os relatados nos trabalhos de Jones *et al.* (1998) e Tucker e Ort (2002), nos quais a exposição de folhas de tomateiro a 4°C, submetidas em regime de luz constante, provocou o mesmo atraso no ritmo de transcritos, proteínas e atividade da NR, independente da fase na qual elas foram submetidas. Foi sugerido que, durante a exposição ao frio, houve parada no metabolismo da enzima. Entretanto, esse atraso foi rapidamente recuperado (5 a 7 horas), possivelmente pela presença da luz (Tucker e Ort, 2002), ao contrário do observado nas folhas de abacaxizeiro em ciclo de claro/escuro, na qual as diferenças entre tratamento (6 horas a 10°C) e controle (25°C constante) foram mantidas ao longo dos experimentos. Os efeitos da falta de luz foram marcantes (Fig. 28), já que a exposição ao frio no escuro seguido de reaquecimento no escuro provocou aparente perda de variações na atividade da NR.

Nas folhas, a fotossíntese é necessária para a ativação da NR, provavelmente através de assimilados que funcionam como sinais ao saírem do cloroplasto, provocando mudanças rápidas em sua atividade (Kaiser e Huber, 2001). Existem relatos de que o frio pode

interromper praticamente todos os principais componentes da fotossíntese, incluindo o transporte de elétrons das tilacóides, o ciclo de redução do carbono e o controle da condutância estomática (Allen e Ort, 2001). A fotoinibição ocorre com a exposição ao frio tanto na fase clara como na escura do fotoperíodo, mas nesse último caso ela é intensificada, como mostram estudos com manga (Flórida, Estados Unidos) realizados por Allen *et al.* (2000). Segundo Martin *et al.* (1981), em uma investigação semelhante com tomateiro, mesmo restaurando as condições de temperatura ideais, as plantas demoraram pelo menos um dia para se recuperarem da exposição à baixa temperatura.

Também já foi relatada para o tomateiro que a baixa temperatura (4°C) é capaz de atrasar o ritmo endógeno da sacarose-fosfato sintase, uma enzima chave no metabolismo do carbono, causando dessincronização dos processos envolvidos na fotossíntese (Jones *et al.*, 1988). Segundo Tucker e Ort (2002), em plantas sensíveis ao frio (no caso, o tomateiro) ocorreu o desacoplamento entre o metabolismo do carbono e do nitrogênio, reduzindo a disponibilidade de esqueletos carbônicos para a fixação do nitrogênio e consequente acúmulo de intermediários tóxicos.

Comparando todos os ciclos realizados para o abacaxizeiro (Figs. 26 a 29), notou-se que, diferente das folhas, as raízes não apresentaram um padrão rítmico definido. A atividade da NR nas folhas submetidas a 25°C aumentou ao longo da fase clara e diminuiu com a chegada da fase escura, estando de acordo com resultados obtidos para outras espécies (Lillo, 2008).

Estudos recentes mostraram que o relógio circadiano em plantas é específico de cada órgão, mas não autônomo. A geração de ritmo em raízes de *Arabidopsis* pareceu depender em parte do relógio da parte aérea, através de sinalização dependente da fotossíntese. A sacarose foi apontada como possível responsável por essa comunicação entre os órgãos, visto que sua

aplicação exógena resultou em mudanças no ritmo de expressão de alguns genes do relógio em raízes, tornando-os insensíveis ao ciclo de claro/escuro. Já as folhas não apresentaram modificações (James *et al.*, 2008). Segundo Glaab e Kaiser (1993), a inativação da atividade da NR em raízes de ervilha ocorreu de forma mais lenta no escuro se comparada às folhas, mostrando novamente dependência entre os órgãos. Isso pode ter ocorrido devido a uma redução na transferência de assimilados para as raízes na fase escura ou porque na ausência de transpiração, algum componente sinalizador deixaria de ser enviado para a parte aérea.

Esses dados poderiam explicar o comportamento diurno na atividade da NR em raízes de abacaxizeiro, que foram independentes do ciclo de claro/escuro, já que as plantas utilizadas estavam em meio contendo sacarose. Sabe-se que a sacarose também é capaz de evitar a queda dos níveis da NR mesmo na ausência de luz, o que também poderia explicar a rápida retomada na atividade das raízes após a exposição ao frio (Cheng *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos para plantas de abacaxizeiro mostraram diferenças entre folhas e raízes. Enquanto a atividade da NR em folhas dependeram da fase do ciclo de 24 horas na qual foram submetidas a 10°C, apresentando atraso no seu ritmo diário, as raízes apresentaram um estímulo positivo pelo frio apenas na ausência de luz, independente da fase do dia na qual ele foi aplicado. As modificações provocadas pela baixa temperatura foram observadas nas folhas tanto pela metodologia *in vitro* como *in vivo*, sendo que para as raízes é possível que o método *in vivo* impeça a visualização de respostas, por ser suficiente para a recuperação dos efeitos do frio.

6 - CONCLUSÕES

- Este trabalho mostrou que folhas e raízes de abacaxizeiro apresentaram respostas distintas em relação à baixa temperatura (10°C) na presença de luz ou escuro. Enquanto as folhas mostraram um estímulo positivo na atividade da NR pelo frio principalmente na presença de luz, as raízes tiveram maior incremento no escuro. Dentre os tempos testados, o de 6 horas foi o mais adequado.
- Ao separar as atividades da NR de membrana plasmática (NRPM) e da citossólica (NRc), após 6 horas a 10°C no claro (folhas) ou no escuro (raízes), demonstrou-se que em folhas e raízes o estímulo do frio incrementou a atividade da NRc.
- A emissão de NO aumentou com a exposição a 10°C em folhas tanto na presença como na ausência da luz e em raízes apenas no escuro, sugerindo um possível envolvimento do NO na sinalização pela baixa temperatura.
- Após 6 horas de exposição a 10°C, as folhas apresentaram um atraso no ritmo diário da atividade da NR quando a temperatura ambiente foi retomada (25°C), exceto quando o frio foi aplicado no início da fase escura, ocorrendo diminuição da atividade e menor variação ao longo do ciclo. A NR das raízes foi estimulada positivamente pela baixa temperatura apenas na fase escura, sendo que não houve grandes alterações em seu ritmo diário no reaquecimento.

7 - RESUMO

O nitrato é uma das principais fontes de nitrogênio disponível para as plantas, sendo a nitrato redutase (NR) a enzima responsável pela sua redução a nitrito. O nitrito é considerado tóxico em altas concentrações e, por esse motivo, a atividade da NR possui uma regulação complexa, principalmente em nível transcricional e pós-traducional. Trabalhos anteriores do nosso grupo, utilizando plantas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro*, demonstraram que, em condições de termoperíodo de 28°C dia/15°C noite, as raízes apresentaram um estímulo positivo de atividade da NR na ausência de luz quando comparado às plantas crescidas em temperatura constante de 28°C, associado posteriormente à atividade da NR de membrana plasmática (NRPM). Baseado nesses resultados questionou-se qual seria a influência da aplicação do estímulo de frio associado ou não à presença de luz na atividade da NR em folhas e raízes de abacaxizeiro. Este trabalho teve como objetivos investigar os efeitos do frio na atividade da NR em folhas e raízes de abacaxizeiro em diferentes tempos de exposição, na presença ou ausência da luz e em diferentes fases do ciclo de 24 horas (claro/escuro). Buscou-se averiguar qual NR estaria envolvida nessas respostas: a NR citossólica (NRc) ou de membrana plasmática (NRPM), assim como verificar o envolvimento do NO na sinalização pela baixa temperatura. O ritmo diário de atividade da NR também foi avaliado, logo após a exposição ao frio, em diferentes fases do ciclo de claro/escuro. As plantas foram expostas a 1, 3, 6 ou 9 horas a 10°C ou 25°C (controle) na luz ou no escuro. A NR foi avaliada pelo método *in vitro*. O estímulo positivo na atividade da NR pelo frio ocorreu principalmente após 6 horas no claro, para as folhas, e após 6 horas no escuro, para as raízes. Novas plantas foram submetidas às mesmas condições para o fracionamento celular, mostrando que, tanto em folhas como em raízes, o incremento de atividade da NR observado a 10°C foi associado à NR citossólica (NRc). Em ambos os casos, o estímulo ocorreu utilizando-se o NADPH como

doador de elétrons, sugerindo o possível envolvimento de uma isoforma NAD(P)H biespecífica. A quantificação do NO foi realizada por leitura em espectrofluorímetro, apontando uma maior emissão induzida pelo frio para as folhas tanto na presença da luz (após 1 e 3 horas) como em sua ausência (1 e 9 horas) e em raízes apenas no escuro (9 horas), sugerindo o envolvimento do NO na sinalização da baixa temperatura. Para verificar a influência do frio em diferentes fases do dia, 4 horários foram selecionados (início da fase clara, meio da fase clara, início da fase escura, meio da fase escura) para início de cada experimento. A NR foi medida logo após a exposição ao frio (6 horas a 10°C), pelo método *in vitro* e durante 24 horas em reaquecimento (25°C), quantificada a cada 3 horas pelo método *in vivo*. As raízes apresentaram aumento da atividade da NR apenas quando o estímulo da baixa temperatura foi aplicado na fase escura, enquanto as folhas sofreram incremento da atividade da NR independente da condição luminosa. Em reaquecimento, a NR das folhas teve seu ritmo atrasado em todas as situações, com exceção quando o frio foi aplicado no início da fase escura, na qual houve perda quase completa de variação ao longo do dia. As raízes não mostraram grandes alterações no ritmo diário da NR. Este trabalho mostrou que a temperatura de 10°C tem efeitos diferentes sobre folhas e raízes, sendo que as modificações na atividade da NR, em curto prazo, parecem ocorrer por alterações na NRc. O NO parece estar envolvido na sinalização do frio, mas não se determinou sua origem biossintética. As raízes tiveram um aumento da atividade da NR pela baixa temperatura, que foi dependente do escuro, enquanto as respostas das folhas dependeram da fase do ciclo na qual foram submetidas a 10°C.

Nitrate is the main nitrogen source available to plants, and nitrate reductase (NR) is the enzyme responsible for its reduction to nitrite. Because of its toxicity in high concentrations, nitrite production by NR has a complex regulation, especially at transcriptional and post-translational level. A previous work from our group, using pineapple plants cultivated *in vitro*, showed that, under thermoperiod of 28°C day/15°C night, NR activity increased in roots during absence of light compared to activity in plants grown under constant temperature of 28°C. Based on these results it was questioned what would be the effect of cold stimulus application with or without light on NR activity in leaves and roots of pineapple plants. This study aimed to investigate the effects of low temperature on NR activity in leaves and roots of pineapple plants at different exposure times in the presence or absence of light and at different phases of a 24 hour cycle (light/darkness). We also investigated which NR was involved in these responses: cytosolic (cNR) or plasma membrane NR (PMNR), as well as verifying the role of nitric oxide (NO) signaling at low temperature. Furthermore, the NR daily rhythm activity was measured after cold exposure, in different phases of the light/dark cycle. Plants were exposed to 10°C or 25°C (control group) during 1, 3, 6 or 9 hours. NR was quantified by *in vitro* method. In the leaves, the increase of NR activity by low temperature (10°C) occurred mainly after 6 hours in the presence of light, while in the roots the highest NR activity occurred after 6 hours at 10°C in darkness. Based on these results, other groups of plants were subjected to the same conditions for cell partitioning, showing that in both leaves and roots the increase of NR activity by cold was associated with cytosolic NR (NRc). In both cases, the positive stimulation occurred with NADPH as the electron donor, suggesting the possible involvement of a NAD(P)H bispecific isoform. NO quantification, measured by spectrofluorimetry, indicated a greater emission induced by cold

in the leaves both in the presence (after 1 and 3 hours) and absence (1 and 9 hours) of light and in roots only in darkness (9 hours), suggesting an involvement of NO in low temperature signaling. To evaluate the influence of cold at different day phases, we performed 4 experiments beginning at different times of the 24-hour cycle (beginning of light phase, middle of light phase, beginning of dark phase, middle of dark phase). NR activity was measured immediately after cold exposure (6 hours at 10°C) by *in vitro* method and after rewarming at 25°C during 24 hours, quantified by *in vivo* method every 3 hours. In roots, NR activity showed an increase only when the cold stimulus was applied at dark phase, while in leaves, NR was independent of the light condition. Upon rewarming, leaves presented a delay in NR daily behavior in all situations, except when low temperature was applied at the beginning of dark phase, showing almost no variation throughout the day. This study demonstrated that the temperature of 10°C affected leaves and roots differently, and the changes in NR activity after short exposure time could be associated with NRc. NO seemed to be involved in cold signaling, but its biosynthetic origin has not been determined yet. Roots showed an increment of NR activity by low temperature dependent of the dark condition, while the responses of leaves depended on the phase of the 24-hour cycle in which they were subjected to 10°C.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D.J.; ORT, D.R. (2001) Impacts of chilling temperatures on photosynthesis in warm-climate plants. **Trends in plant science** **6** (1): 36-42.
- ASLAM, M.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. (1992) Comparative kinetics and reciprocal inhibition of nitrate and nitrite uptake in roots of uninduced and induced barley (*Hordeum vulgare* L.) Seedlings. **Plant Physiol.** **99**: 1124-1133.
- ASKERLUND, P.; LAURENT, P.; NAKAGAWA, H.; KADER, J-D. (1991) NADH-ferricyanide reductase of leaf plasma membranes partial purification and immunological relation to potato tuber microsomal NADH-ferricyanide reductase and spinach leaf NADH-nitrate reductase. **Plant Physiol.** **95**: 6-13.
- BENZING, D.H. (2000) Bromeliaceae: profile of an adaptative radiation. Cambridge University Press. Cambridge, 724p.
- BRADFORD, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochemistry** **72**: 248-254.
- CAMPBELL, W.H. Nitrate reductase structure, function and regulation: bridging the gap between biochemistry and Physiology. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **50**: 277-303.
- CANTREL, C.; VAZQUEZ, T.; PUYAUBERT, J. REZE, N.; LESCH, M.; KAISER, W.M.; DUTILLEUL, C.; GUILLAS, I.; ZACHOWSKI, A.; BAUDOUIN, E. (2011) Nitric oxide participates in cold-responsive phosphosphingolipid formation and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **New Phytologist** **189**: 415-427.
- CARVALHO, S.L.C.; NEVES, C.S.V.J.; BÜRKLE, R.; MARUR, C.J. (2005) Épocas de indução floral e soma térmica do período do florescimento à colheita de abacaxi 'Smooth Cayenne'. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** **27** (3): 430-433.
- CHENG, C-L.; ACEDO, G.N.A.; CRISTINSIN, M.; CONKLING, M.A. (1992) Sucrose mimics the light induction of *Arabidopsis* nitrate reductase gene transcription. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **89**: 1861-1864.
- CRAWFORD, N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The plant cell** **7**: 859-868.
- CRAWFORD, N.M.; CAMPBELL, W.H. (1990) Fertile fields. **The Plant Cell** **2**: 829-835.
- CRAWFORD, N.M.; KAHN, M.L.; LEUSTEK, T.; LONG, S.R. (2000) Nitrogen and Sulfur. In: Buchanan, B.; Gruissem, w.; Jones, R. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists.
- CUSHMAN, J.C.; BORLAND, A.M. (2002) Induction of Crassulacean acid metabolism by water limitation. **Plant, Cell and Environment** **25**: 295-310.

- DAILEY, F.A.; WARNER, R.L.; SOMERS, D.A.; KLEINHOF, A. (1982) Characteristics of a nitrate reductase in a barley mutant deficient in NADH nitrate reductase. **Plant Physiol.** **69**: 1200-1204.
- DE MARCO, A.; JIA, C.; FISCHER-SCHLIEBS, E.; VARANINI, Z.; LÜTTGE, U. (1994) Evidences for two different nitrate reducing activities at the plasma-membrane in roots of *Zea mays* L. **Planta** **194**: 557-564.
- FISCHER, K.; BARBIER, G.G.; HECHT, H.-J.; MENDEL, R.R.; CAMPBELL, H.B.; SCHWARZA, G. (2005) Structural basis of eukaryotic nitrate reduction: crystal structures of the nitrate reductase active site. **The Plant Cell** **17**: 1167-1179.
- FORDE, B.G. (2000) Nitrate transporters in plants: structure, function and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta** **1465**: 219-235.
- FRESCHI, L.; NIEVOLA, C.C.; RODRIGUES, M.A.; DOMINGUES, D.S.; SLUYS, M.-A. V.; MERCIER, H. (2009) Thermoperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiologia Plantarum** **137**(3): 201-212
- GARCÍA-MATA, C. LAMATTINA, L. (2001) Nitric oxide induces stomatal closure and enhances the adaptive plant responses against drought stress. **Plant Physiology** **126**: 1196-1204.
- GALANGAU, F.; DANIEL-VEDELE, F.; MOUREAUX, T.; DORBE, M.-F.; LEYDECKER, M.-T.; CABOCHE, M. (1988) Expression of leaf nitrate reductase genes from tomato and tobacco in relation to light-dark regimes and nitrate supply. **Plant Physiology** **88**: 383-388.
- GLAAB, J.; KAISER, W.M. (1993) Rapid modulation of nitrate reductase in pea roots. **Planta** **191**: 173-179.
- GRAHAM, D.; PATTERSON, B.D. (1982) Responses of plants to low, non-freezing temperatures: proteins, metabolism, and acclimation. **Annual Review Plant Physiology** **33**: 347-72.
- GUERRERO, M.G.; VEGA, J.M.; LOSADA, M. (1981) The assimilatory nitrate-reducing system and its regulation. **Ann. Rev. Plant Physiol.** **32**: 169-204.
- GUPTA, K.J.; HINCHA, D.K.; MUR, L.A. (2011) NO way to treat a cold. **New Phytologist** **189**: 360-363.
- GUY, C.L. (1990) Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review Plant Physiology Plant Molecular Biology** **41**: 187-223.
- GUY, C.; KAPLANA, F.; KOPKA, J.; SELBIG, J.; HINCHA, D.K. (2008) Metabolomics of temperature stress. **Physiologia Plantarum** **132**: 220-235.
- HAGEMANN, R.H.; REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. **Methods Enzymol.** **69**: 270-280.
- HUNER, N.P.A.; OQUIST, G.; HURRY, V.M.; KROL, M.; FALK, S.; GRIFFITH, M. (1993) Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation tolerant plants in cold tolerant plants. **Photosynthesis Research** **37**: 19-39.

- JAMES, A.B.; MONREAL, J.A.; NIMMO, G.A.; KELLY, C.L.; HERZYK, P.; JENKINS, G.I.; NIMMO, H.G. (2008) The circadian clock in *Arabidopsis* roots is a simplified slave version of the clock in shoots. **Science** **322**: 1802-1805.
- KROUK, G.; CRAWFORD, N.M.; CORUZZI, G.M.; TSAY, Y-F. (2010) Nitrate signaling: adaptation to fluctuating environments. **Current Opinion in Plant Biology** **13**: 266-273.
- JAWORSKI, E.G. (1971) Nitrate reductase assay in intact plant tissues. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **43**: 1274-1279.
- JOLLY, O.; CAMPBELL, W.; TOLBERT, N.E. (1976) NADPH- and NADH-nitrate reductases from soybean leaves. **Archives of biochemistry and biophysics** **174**: 431-439.
- JONASSEN, E.M.; LEA, U.S., LILLO, C. (2008) *HY5* and *HYH* are positive regulators of nitrate reductase in seedlings and rosette stage plants. **Planta** **227**: 559-564.
- JONES, T.L.; TUCKER, D.E.; ORT, D.R. (1998) Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. **Plant Physiology** **118**: 149-158.
- KAISER, W.M.; KANDLBINDER, A.; STOIMENOVA, M.; GLAAB, J. (2000) Discrepancy between nitrate reduction rates in intact leaves and nitrate reductase activity in leaf extracts: What limits nitrate reduction in situ? **Planta** **210**: 301-307.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (1997) Correlation between apparent activation state of nitrate reductase (NR), NR hysteresis and degradation of NR protein. **Journal of Experimental Botany** **48**: 1367-1374.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (2001) Post-translational, regulation of nitrate reductase: mechanism, physiological relevance and environmental triggers. **Journal of Experimental Botany** **52**: 1981-1989.
- KAISER, W. K.; SPILL, D. (1991) Rapid modulation in spinach leaf nitrate reductase by photosynthesis. **Plant Physiology** **96**: 368-375.
- LAM, H-M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MELO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAI, N.; HSIEH, M-H.; CORUNI, G. (1995) Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **The Plant Cell** (7) 887-898.
- LARSSON C. ; SOMMARIN M. ; WIDELL S. (1994) Isolation of highly purified plant plasma membranes and separation of inside-out and right-side-out vesicles. **Methods in enzymology** **228**: 451-469.
- LEA, U.S.; LEYDECKER, M-T.; QUILLERE, I.; MEYER, C.; LILLO, C. (2006). Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. **Plant Physiology** **140**: 1085-1094.
- Laurence LEJAY, L.; TILLARD, P.; LEPETIT, M.; OLIVE, F.D.; FILLEUR, S. DANIEL-VEDELE, F.; GOJON, A. (1999) Molecular and functional regulation of two NO₃ uptake systems by N- and C-status of *Arabidopsis* plants. **The Plant Journal** **18(5)**: 509-519.

- LILLO, C.; RUOFF, P. (1984) A minimal model of light-induced circadian rhythms of nitrate reductase activity in leaves of barley. **Physiologia Plantarum** **62**: 589–592.
- LILLO, C.; KAZAZAIC, S.; RUOFF, P.; MEYER, C. (1997) Characterization of nitrate reductase from light-and-dark-exposed leaves. **Plant Physiology** **114**: 1377-1383.
- LILLO, C.; MEYER, C.; RUOFF, P. (2001) The nitrate reductase circadian cycle system. The central clock dogma contra multiple oscillatory feedback loops. **Plant Physiology** **125**: 1554-1557.
- LILLO C.; LEA U.S.; LEYDECKER M-T.; MEYER C. (2003). Mutation of the regulatory phosphorylation site of tobacco nitrate reductase results in constitutive activation of the enzyme in vivo and nitrite accumulation. **Plant Journal** **35**: 566–573.
- LILLO, C.; MEYER, C.; LEA, U.S.; PROVAN, F.; OLTEDAL, S. (2004) Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase . **Journal of Experimental Botany** **55**: 1275-1282
- LILLO, C. (2008). Signalling cascades interacting light-enhanced nitrate metabolism. **Biochem. J.** 415: 11-19.
- LO PIERO, A.R.; CULTRONE, A.; MONACHELLO, D.; PETRONE G. (2003) Different kinetic and regulatory properties of soluble and membrane bound nitrate reductases in tomato leaves. **Plant Science** **165**: 139-/145.
- LONG, D.M.; OAKS, A. (1990) Stabilization of nitrate reductase in maize roots by chymostatin. **Plant Physiol.** **93**: 846-850.
- LÜTTGE, U. (2004) Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). **Annals of Botany** **93**: 629-652.
- MARTIN, B.; ORT, D.R.; BOYER, J.S. (1981) Impairment of photosynthesis by chilling-temperatures in tomato. **Plant Physiol.** **68**: 329-334.
- MATSUMURA, A.T. (2009) Correlação entre a indução do metabolismo ácido das crassuláceas e atividade da redutase do nitrato em abacaxizeiro. Iniciação científica. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 30p. (processo FAPESP nº 2009/51618-9).
- MEDINA, E.; POPP, M.; OLIVARES, E.; JANETT, H.P.; LÜTTGE, U. (1993) Daily fluctuations of titratable acidity, content of organic acids (malate and citrate) and soluble sugars of varieties and relatives of *Ananas comosus* L. growing under natural tropical conditions. **Plant, Cell and Environment** **16**: 55-63.
- MERCIER, H.; NIEVOLA, C.C. (2003) Obtenção de bromélias *in vitro* como estratégia de preservação. **Vidalia** **1**:57-62.
- MONROY, A.F.; SANGWAN, V.; DHINDSA, R.S. (1998) Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *The Plant Journal* **13** (5): 653-660.
- MORGADO, I.F.; AQUINO, C.N.P; TERRA, D.C.T. (2004) Aspectos econômicos da cultura do abacaxi: sazonalidade de preços do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal** **26** (1): 44-47.

- MURASHIGE & MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum** **15**: 473-497.
- MEYER, C.; LEA, U.S.; PROVAN, F.; KAISER, W.M.; LILLO, C. (2005) Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? **Photosynthesis Research** **83**: 181-189.
- MIOTO, P.T. (2011) Sinalização da indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) por ácido abscísico e óxido nítrico em *Guzmania monostachia* (Bromeliaceae). Tese de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 69p.
- MILLER, A.J.; FAN, X.; ORSEL, M.; SMITH, S.J.; WELLS, D.M. (2007) Nitrate transport and signaling. **Journal of Experimental Botany** **58** (9): 2297–2306.
- NIEVOLA, C.C. (2002) Variações hormonais e das atividades das enzimas redutase do nitrato e fosfoenolpiruvato carboxilase em plantas de abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr) C₃ e induzidas a CAM por termoperíodo. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 120p.
- 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**: 832-837.
- NIEVOLA, C.C.; MERCIER, H. (2001) Variações diurnas da atividade *in vivo* da redutase do nitrato em abacaxizeiro (*Ananas comosus* (L.) Merr. – Bromeliaceae). **Revista Brasileira de Botânica** **24** (3): 295-301.
- PANDEY, S.; GARG, S.K.; SRIVASTAVA, H.S. (1997) Responses of NADH and NADPH nitrate reductase and nitrate uptake to chlorate supply in maize seedlings. **Journal of Plant Physiology** **150**: 401-405.
- PARÍS, R.; LAMATTINA, L. CASALONGUÉ, C. A. (2007) Nitric oxide promotes the wound-healing response of potato leaflets. **Plant Physiology and Biochemistry** **45**: 80-86.
- POUTEAU, S.; CHE'REL, I.; VAUCHERT, H.; CABOCHE, M. (1989) Nitrate reductase mRNA regulation in *Nicotiana plumbaginifolia* nitrate reductase-deficient mutants. **Plant Cell** **1**: 1111–1120
- PROVAN, F.; AKSLAND, L-M.; MEYER, C.; LILLO, C. (2000) Deletion of the nitrate reductase N-terminal domain still allows binding of 14-3-3 proteins but affects their inhibitory properties. **Plant Physiology** **123**: 757-764.
- RAJASEKHAR, V.K.; GOWRI, G.; CAMPBELL, W.H. (1988) Phytochrome-mediated light regulation of nitrate reductase expression in squash cotyledons. **Plant Physiology** **88**: 242-244.
- RUELLAND, E.; VAUTIER, M.N.; ZACHOWSKI, A.; HURRY, V. (2009) Cold signaling and cold acclimation in plants. *Advances in Botanical Research* **49**: 35-150.
- RUOFF, P.; LILLO, C. (1990) Molecular oxygen as electron acceptor in the NADH nitrate reductase system. **Biochemical and Biophysical Research Communications** **15**: 1000-1005.

- SANTOS, L.A.; BUCHER, C.A.; SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. (2009) Effects of nitrogen stress on proton pumping and nitrogen metabolism in rice. **Journal of Plant Nutrition** **32**: 549-564.
- SANTOS, A.S. (2010) Indução termoperiódica da nitrato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (*Ananas comosus*). Tese de mestrado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 77p.
- SMITH, J.A.C.; GRIFFITHS, H.; LÜTTGE, U. (1986) Comparative ecophysiology of CAM and C3 bromeliads. I. The ecology of the Bromeliaceae in Trinidad. **Plant, Cell and Environment** **9**: 359-376.
- STÖHR, C.; GLOGAU, U.; MÄTSCHKE, M.; TISCHNER, R. (1995a) Evidence for the involvement of plasma-membrane-bound nitrate reductase in signal transduction during blue-light stimulation of nitrate uptake in *Chlorella saccharophila*. **Planta** **197**: 613-618.
- STÖHR, C.; SCHULER, F. & TISCHNER, R. (1995b) Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins exist in the plasma membrane of *Chlorella saccharophila* (Krüger) Nadson: Plasma-membrane-bound nitrate reductase as an example. **Planta** **196**: 284-287.
- STÖHR, C.; ULLRICH, W.R. (1997) A succinate-oxidising nitrate reductase is located at the plasma membrane of plants roots. **Planta** **203**: 129-132.
- STÖRN, C.; MÄCK, G. (2001) Diurnal changes in nitrogen assimilation of tobacco roots. **Journal of Experimental Botany** **52 (359)**: 1283-1289.
- SUEYOSHI, K.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. (1995) Expression of NADH-specific and NAD(P)H-bispecific nitrate reductase genes in response to nitrate in barley. **Plant Physiology** **107**: 1303-1311.
- TING, I.P. (1985) Crassulacean acid metabolism. **Annual Reviews in Plant Physiology** **36**: 595-622.
- TISCHNER, R.; WARD, M.R.; HUFFAKER, R.C. (1989) Evidence for a plasma-membrane-bound nitrate reductase involved in nitrate uptake of *Chlorella sorokiniana*. **Planta** **178**: 19-24.
- TISCHNER, R. (2000) Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment** **23**: 1005-1024.
- TUCKER, D.E.; ORT, D.R. (2002) Low temperatures induces expression of nitrate reductase in tomato that temporarily overrides circadian regulation of activity. **Photosynthesis research** **72**: 285-293.
- TUCKER, D.E.; ALLEN, D.J.; ORT, D.R. (2004) Control of nitrate reductase by circadian and diurnal rhythms in tomato. **Planta** **219**: 277-285.
- VINCENTZ M.; MOUREAUX T.; LEYDECKER M.T.; VAUCHERET H.; CABOCHE M. (1993). Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant J** **3**: 315-324.
- WALL, B. (1998) Bromeliads. Cassell. Britain. 64p.

- WARD, M.R.; GRIMES, H.D.; and HUFFAKER, R.C. (1989) Latent nitrate reductase activity is associated with plasma membrane of corn roots. **Planta** **177**: 470-475.
- WARD, M.R.; TISCHNER, R.; HUFFAKER, R.C. (1988) Inhibition of nitrate transport by anti-nitrate reductase IgG fragments and the identification of plasma membrane associated nitrate reductase in roots of barley seedlings. **Plant Physiol.** **88**: 1141-1145.
- WIENKOOP, S.; ULLRICH, W.R.; STÖHR, C. (1999) Kinetic characterization of succinate-dependent plasma membrane-bound nitrate reductase in tobacco roots. **Physiologia Plantarum** **105**: 609–614.
- WIENKOOP, S.; SCHLICHTING, R.; ULLRICH, W. R.; STÖHR, C. (2001) Different diurnal cycles of expression of two nitrate reductase transcripts in tobacco roots. **Protoplasma** **217**: 15-19.
- WILKINSON, J.Q.; CRAWFORD, N.M. (1991) Identification of the *Arabidopsis* *CHL3* Gene as the Nitrate Reductase Structural Gene *NIA2*. **The Plant Cell** **3**: 461-471.
- 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
- YANEVA, I.A.; MÄCK, G.; VUNKOVA-RADEVA, R.; TICHNER, R. (1996) Changes in nitrate reductase activity and the protective effect of molybdenum during cold stress in winter wheat grown on acid soil. **Journal of Plant Physiology** **149**: 211-216.
- YANEVA, I.A.; HOFFMANN, G.W.; TISCHNER, R. (2002) Nitrate reductase from winter wheat leaves is activated at low temperature via protein dephosphorylation. **Physiologia Plantarum** **114**: 65-72.
- YANG, Z.; MIDMORE, D.J. (2005) A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in higher plants. **Annals of Botany** **96**: 1019–1026.
- ZAR, J.H. (1996) Biostatistical analysis. Prentice-Hall, 662p.
- ZHAO, M-G.; CHEN, L.; ZHANG, L-L.; ZHANG, W-H. (2009) Nitric Reductase-Dependent Nitric Oxide Production Is Involved in Cold Acclimation and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology** **151**: 755–767.
- ZHOU, J.; KLEINHOF, A. (1996) Molecular Evolution of Nitrate Reductase Genes. **J Mol Evol** **42**: 432–442.