

Alessandra de Souza Santos

*Indução termoperiódica da nitrato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (Ananas comosus).*

*Thermoperiodic induction of nitrate reductase associated with the plasma membrane in pineapple (Ananas comosus).*

São Paulo

2010

Alessandra de Souza Santos

*Indução termoperiódica da nitrato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (Ananas comosus).*

*Thermoperiodic induction of nitrate reductase associated with the plasma membrane in pineapple (Ananas comosus).*

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Helenice Mercier

São Paulo

2010

## Ficha Catalográfica

Santos, Alessandra de Souza

Indução termoperiódica da nitrato redutase de membrana plasmática em abacaxizeiro (Ananas comosus)

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

1. Nitrato redutase 2. Termoperíodo  
3. Abacaxizeiro

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

Apoio de fomento: FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Comissão Julgadora:

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof(a). Dr(a).

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helenice Mercier

Orientadora

*Dedico:*

*Aos meus amados, queridos e abençoados pais,  
José Carlos e Marli, que com amor incondicional  
sempre me incentivaram e acreditaram em mim!*

*Ao meu melhor amigo e amado esposo, Frederico,  
por todo apoio, paciência e amor!*

*À minha segunda mãe, Antonieta, que embora não  
possa participar de mais essa conquista, sempre  
esteve presente em todos os momentos importantes  
da minha vida!*

*Podemos ignorar, mas não podemos fugir da presença de Deus. O mundo está repleto dele. Ele anda, incógnito, por toda parte. E o que é incógnito nem sempre é fácil de penetrar. O verdadeiro trabalho consiste em lembrar de prestar atenção.*

ARMAND NICHOLI

## Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

Ao meu Deus, pela salvação em Cristo, por me amar demais, apesar das minhas limitações, e por mais essa etapa que me permite cumprir.

À Profa. Dra. Helenice Mercier pela orientação, incentivo, apoio e, acima de tudo, pelos exemplos de pessoa e profissional, que marcaram a minha vida e me fizeram crescer.

Ao Prof. Dr. Gilberto Barbante Kerbauy pelas lições de vida passadas a cada momento de convívio e pelos exemplos de caráter pessoal e profissional.

À amiga Dra. Cláudia Simões, pelo carinho demonstrado até hoje, por ter me ensinado os primeiros passos na pesquisa, por sempre ter acreditado na minha capacidade e, acima de tudo, por não ter me deixado desistir do meu sonho.

Ao amigo Prof. Dr. Luciano Freschi, pela atenção e paciência dedicados desde o meu primeiro dia de trabalho no Laboratório de Fisiologia Vegetal e pelo ótimo convívio.

À Prof. Dra. Fanly Fungyi Chow Ho e à Dra. Katharina Nievola, por tantas orientações durante a padronização do ensaio da NR *in vitro*.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Façanha, pelas orientações sobre a técnica de fracionamento celular.

À Profa. Dra. Marie-Anne Van Sluys, por ter permitido o uso da ultracentrífuga e por estar sempre pronta à dar orientações valiosas sobre o trabalho como um todo.

À amiga e mestranda Aline Tiemi, pelo companheirismo e prontidão em me ajudar nos momentos mais complicados.

À Dra. Camila Aguetoni Cambuí e à Mestre Cássia Ayumi, pelas orientações valiosas no trabalho e pela amizade construída, que proporciona momentos muito prazerosos.

À amiga e Mestre Aline Bertinatto, pela amizade valiosa construída, pelo companheirismo no trabalho e sinceridade em tudo.

Aos amigos Auri, Lia, Thais, Ilton, Adriana Yepes, Cíntia e Alejandra, por fazerem de tantos momentos, momentos especiais, de alegria e crescimento.

Aos amigos de trabalho e de vida (Aline Cavalari, Patrícia, Paula Nathália, Paula, Paulo, Fernanda, Júlia, Bia Torrano, Mônica, Amanda e Priscilla) pelo companheirismo e apoio constantes.

Aos demais amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Fisiologia Vegetal (Adriana Grandis, Ivã, Maraba, Bruna, Mari, Augusto, Cris e Amanda), pelo convívio diário repleto de alegria.

À mestranda Talita, pelas orientações sobre as dosagens de proteínas e pela prontidão em ajudar, sempre demonstrada.

À Ana Maria, Egle, Leonor e Ingrid pela amizade e por viabilizar as condições técnicas necessárias para o desenvolvimento de parte desse trabalho.

Ao técnico Rosário, por sempre ter me ajudado de diversas maneiras, todas as vezes que necessitei.

À toda equipe de professores do departamento de Botânica que, direta ou indiretamente, auxiliaram em diferentes etapas da minha formação acadêmica.

Aos secretários do departamento de Botânica (Norberto, Carlos, Cesário e Cristiane) e da seção de Pós-graduação (Helder e Érika) por todo o auxílio nas questões institucionais.

À Suzy pela amizade, companhia e pela descontração no ambiente de trabalho e em nossas longas viagens de volta para casa.

Aos meus queridos sogros, Ana Ilza e Osmar, por serem sempre tão solícitos e carinhosos, por me apoiarem de diversas formas e pelas orações, que eu sei, nunca faltaram e foram fundamentais em toda a minha trajetória.

Aos meus cunhados Felipe, Jaqueline, Ana Cristina e Efraim, e ao meu sobrinho Guilherme, por proporcionarem momentos felizes em família, que fizeram todo esse processo ser mais leve e por me apoiarem em oração.

Ao Fred, meu amigo, meu companheiro e meu amor, por acompanhar o meu crescimento pela maior parte da minha vida, por ter dividido comigo tantas alegrias e conquistas e por sua paciência e dedicação impossíveis de serem expressas em palavras.

Ao meu querido irmão, Carlos José, pelo carinho e pela alegria que proporciona ao meu coração.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços pela felicidade dos seus filhos. Por respeitarem minhas escolhas e por estarem sempre ao meu lado.

À minha segunda mãe, Antonieta, por todo amor e carinho que me dedicou em todos os dias que estive comigo, os quais guardarei para sempre com amor e saudade imensuráveis.

Aos amigos da Primeira Igreja Batista em São Paulo, Ana Lúcia e Alexandre, Baby e Luiz e Elaine e Nilson pelo interesse e apoio, pelo carinho e pelas orações constantes.

À minha querida Amiga Talita Fachini e ao Leandro, ao Maurício, Ana Paula e Vítor, por serem tão especiais e importantes na minha vida e por entenderem a minha ausência.

A todos aqueles aqui não nomeados que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho e foram importantes para o meu desenvolvimento pessoal.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e institucional.

## Índice

Introdução .....	1
Justificativa .....	8
Objetivos .....	9
Material e Métodos .....	10
Resultados .....	23
Discussão .....	47
Resumo .....	62
Abstract .....	64
Referências Bibliográficas .....	66
Anexo 1 .....	75
Biografia .....	76

## Abreviaturas

FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

PVP - Polivinilpirrolidona

BSA - Albumina bovina

DTT - Ditioneitol

NADH -  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo

EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid (Ácido etileno-diamino-tetracético)

NADPH -  $\beta$ -Nicotinamida adenina dinucleotideo phosphate, reduzida

HEPES - 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

(4-(2-Hidroxietyl)piperazina-1-etanosulfônica

PEG - polietilenoglicol

KNO<sub>3</sub> – Nitrato de Potássio

GPI - Glycosyl-phosphatidylinositol (Glicosil – fosfatidil – inositol)

## INTRODUÇÃO

### O Abacaxizeiro

O abacaxizeiro (*Ananas comosus* L. Merr), pertencente à família Bromeliaceae (CUNHA *et al.* 1994), é uma planta nativa de nosso continente (MEDINA *et al.* 1993; BARTHOLOMEW e MALÉZIEUX, 1994); ocorre em áreas com temperaturas elevadas, onde a pluviosidade é pequena ou irregular (BACKER e COLLINS, 1939).

A cultura do abacaxizeiro ocupa o nono lugar no ranque mundial da fruticultura, sendo que o Brasil é o segundo maior produtor (BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO, 2001).

A variedade “Smooth Cayenne” tem alta qualidade comercial. Essa importância deve-se ao fato de ser uma fruta doce, de acidez leve, e textura tenra (RANGAN, 1984). Estima-se que cerca de 70% da produção mundial de abacaxi corresponda a essa variedade (CUNHA *et al.*, 1994).

O cultivo *in vitro* tem sido utilizado como importante ferramenta em estudos fisiológicos acerca de diversas espécies de bromélias (MERCIER e KERBAUY, 1997). No Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP várias pesquisas têm sido realizadas com relação à composição hormonal endógena (MERCIER e ENDRES, 1999) ao metabolismo do nitrogênio (ENDRES e MERCIER, 2001a; ENDRES *et al.*, 2002; INSELSBACHER *et al.*, 2007), ao crescimento (ENDRES e MERCIER, 2001b), à organogênese (MERCIER *et al.*, 2003; SOUZA *et al.*, 2003; HAMASAKI *et al.* 2005), ao metabolismo fotossintético (NIEVOLA, 2002; FRESCHI *et al.*, 2010) ou à atividade de várias enzimas relacionadas com a assimilação do nitrogênio (NIEVOLA e MERCIER, 2001; NIEVOLA, 2002; FRESCHI *et al.* 2009).

### O Nitrogênio na Nutrição Vegetal

O N é o quarto elemento mais abundante nos seres vivos sendo seguido pelo oxigênio, o carbono e o hidrogênio (BUCHANANN, 2000). O N está presente em diversas formas na biosfera, aproximadamente 79% da atmosfera terrestre é composta por N molecular (N<sub>2</sub>). Na biosfera terrestre, 0,04% do nitrogênio está na forma combinada, desse percentual 57% encontram-se na forma orgânica e 43% na forma inorgânica.

Considerando o nitrogênio existente na forma orgânica, somente 4% fazem parte dos seres vivos, sendo 94% localizados nos vegetais, 4% na biomassa microbiana e 2% nos animais (SIQUEIRA & FRANCO, 1988). O nitrogênio é um dos principais fatores limitantes do crescimento vegetal, sendo encontrado em moléculas importantes, como por exemplo, nas proteínas, em alguns fitormônios e nos ácidos nucleicos (RNA e DNA) (CORDEIRO, 2004; TISCHNER, 2000).

Apesar de muito abundante na atmosfera, o nitrogênio molecular não pode ser absorvido pelos vegetais. As plantas terrestres, geralmente, absorvem o nitrogênio do solo na forma de compostos altamente oxidados, dos quais o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) é o principal. Entretanto, o amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) também pode ser absorvido e incorporado em compostos orgânicos (BUCHANANN, 2000; SODEK, 2004).

A assimilação do N, proveniente do nitrato, começa com a absorção desse íon seguida por sua redução, resultando em amônio. Esse último é incorporado em aminoácidos, como a glutamina e o glutamato (TISCHNER, 2000; CORDEIRO, 2004).

### **Absorção e Redução do Nitrato**

As plantas disponibilizam uma porção significativa de seus esqueletos carbônicos e reservas energéticas para a absorção e assimilação do  $\text{NO}_3^-$  (BUCHANANN, 2000). Todo o processo de assimilação pode consumir mais de 25% da energia gerada na fotossíntese (SOLOMONSON e BARBER, 1990).

A indução do sistema enzimático de assimilação inicia-se com a exposição da planta ao íon  $\text{NO}_3^-$ , resultando em um aumento contínuo na taxa de absorção do mesmo. Isso inclui também um incremento no número de proteínas transportadoras de nitrato presentes na membrana plasmática. (TISCHNER, 2000). O papel indutor do nitrato sobre o nível de atividade e o teor de RNAm da NR tem sido documentado para várias espécies, dentre elas podemos citar *Nicotiana tabacum* (GALANGAU *et al.*, 1988; MATT *et al.*, 2001), *Oryza sativa* (HAMAT *et al.*, 1989), *Lycopersicon esculentum* (GALANGAU *et al.*, 1988), *Hordeum vulgare* (MELZER *et al.*, 1989) e *Zea mays* (GOWRI e CAMPBELL, 1989). Não existem evidências de que a disponibilidade de nitrato acarrete alterações na regulação pós-traducional da NR (FERRARIO *et al.*, 1996; KAISER *et al.*, 2002).

O nitrato é conhecido como um estimulador de transportadores específicos para esse íon (CRAWFORD e GLASS, 1998; STITT, 1999; STITT *et al.*, 2002; TISCHNER, 2000; MATT *et al.*, 2001). Plantas que nunca foram expostas ao  $\text{NO}_3^-$  possuem células radiculares com uma capacidade limitada de absorção desse íon, sugerindo que uma pequena quantidade de proteínas transportadoras estariam presentes na membrana, isto é, seriam proteínas constitutivas. Após contato com o íon, a taxa de absorção aumenta, mas a adição de inibidores de síntese de proteínas causa um rápido decréscimo para os níveis constitutivos. Isso sugere que a maioria das proteínas transportadoras é sintetizada de acordo com a disponibilidade de  $\text{NO}_3^-$  no meio externo (HOPKINS, 1999).

O transporte de  $\text{NO}_3^-$  através da membrana pode ocorrer por meio de dois mecanismos: o de alta afinidade (HATS, do inglês: high-affinity transport system) e o de baixa afinidade (LATS, do inglês: low-affinity transport system). Duas famílias gênicas atuam na síntese das proteínas transportadoras de  $\text{NO}_3^-$ : NRT1 e NRT2. A família NRT2 codifica transportadores para o sistema HATS. A família NRT1 é mais complexa, codificando transportadores que funcionarão em ambos os mecanismos (HATS e LATS) ou transportadores específicos para o LATS (BUCHANAN, 2000; TISCHNER, 2000).

Após ser absorvido pelas raízes, o  $\text{NO}_3^-$  pode ser reduzido ou estocado nos vacúolos, ou ainda, ser translocado para a parte aérea, onde poderá ser reduzido ou estocado.

O  $\text{NO}_3^-$  precisa ser reduzido a amônio, antes da assimilação em aminoácidos (CHENG *et al.*, 1992). O primeiro passo da redução, geralmente, ocorre no citossol por meio da enzima nitrato redutase (NR), resultando na produção de nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ). A NR é uma das poucas enzimas vegetais induzidas pelo seu próprio substrato (CRAWFORD, 1995; TACHIBANA *et al.*, 1991; FORDE 2002). O nitrito, nos plastídeos (no caso das raízes) ou nos cloroplastos (no caso das folhas), é reduzido a amônio pela nitrito redutase (NiR) (KLEINHOFs e WARNER, 1990). O  $\text{NH}_4^+$ , por sua vez, é assimilado pelo ciclo enzimático conhecido por glutamina sintetase/glutamato sintase (GS/GOGAT). A glutamina sintetase (GS) combina o amônio com o glutamato para formar a glutamina.

Os níveis elevados de glutamina nos plastídeos estimulam a atividade da glutamato sintase (conhecida como glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase, ou GOGAT). Essa enzima transfere o grupo amina da glutamina para o 2-oxoglutarato, produzindo duas moléculas de glutamato (TISCHNER, 2000; LAM *et al.*, 1995). O amônio pode também ser assimilado por uma rota alternativa, por meio da enzima glutamato desidrogenase (GDH), a qual catalisa uma reação reversível que sintetiza o glutamato, utilizando NADH ou NADPH como agente redutor (CAMMAERTS & JACOBS, 1985).

O ciclo diurno da atividade da NR tem sido descrito em: *Arabidopsis* (SU *et al.*, 1996), *Cucurbita pepo* (LILLO *et al.*, 1997), *Hordeum vulgare* (LILLO, 1984), *Nicotiana tabacum* (DENG *et al.*, 1998), *Lycopersicon esculentum* (GALANGAU *et al.*, 1988; JONES *et al.*, 1998), *Zea mays* (MERLO *et al.*, 1995), *Ananas comosus* (NIEVOLA e MERCIER, 2001), entre outras espécies. A maior parte das plantas reduz o  $\text{NO}_3^-$  durante o dia (SOLOMONSON e BARBER, 1990), sendo raros os estudos que relatam a atividade da NR no período noturno (STÖRN e MÄCK, 2001; NIEVOLA e MERCIER, 2001; NIEVOLA, 2002; FRESCHI *et al.*, 2009; FRESCHI *et al.*, 2010).

### **Estrutura e Regulação da NR citossólica (NRc)**

A NR é um dímero com três domínios de ligação. O complexo molibdênio (MoCo) está ligado ao grupo heme (região *hinge* 1) que por sua vez está unido ao FAD (região *hinge* 2). O NAD(P)H liga-se ao domínio de ligação do FAD de cada subunidade, iniciando a transferência de dois elétrons a partir do grupo carboxila terminal (C), por meio de cada elemento de transferência de elétrons, até o grupo amino terminal (N). O  $\text{NO}_3^-$  é reduzido no complexo MoCo próximo à região amino terminal (CAMPBELL, 1999; TISCHNER, 2000).

A expressão da NR é regulada em nível traducional por vários sinalizadores, incluindo nitrato, luz, ritmo circadiano, citocininas, concentração de  $\text{CO}_2$ , sacarose, glutamina, estresse hídrico e anaerobiose. No entanto, essa enzima também é controlada em nível pós-traducional por uma fosforilação rápida e reversível da proteína em resposta à baixa luminosidade, redução dos níveis de  $\text{CO}_2$ , estresse

osmótico e mudanças no pH celular (CRAWFORD, 1995; BOTREL and KAISER, 1997; CHUNG *et al.*, 1999).

Em plantas superiores, a NR é regulada pela síntese e degradação da enzima, pela inativação reversível e pela concentração de nitrato no substrato (SOLOMONSOS e BARBER, 1990; HOFF *et al.*, 1994; KAISER *et al.*, 2002). A atividade da enzima pode aumentar em até 80% nas folhas em resposta à fotossíntese ou nas raízes esse aumento pode ocorrer em condições de hipoxia ou anoxia. Por outro lado, a inativação acontece nas folhas em ausência de luz ou com o fechamento dos estômatos. Em altas concentrações de oxigênio, a atividade nas raízes também pode ser inibida (KAISER *et al.* 1999).

A NR possui meia-vida de poucas horas (LI e OAKS, 1993), por isso o controle da expressão gênica é um modo eficiente de regulação da atividade (CAMPBELL, 1990). Quando as plantas estão expostas ao NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, ocorre um aumento na transcrição do RNAm da NR. Em poucas horas a concentração da NR alcança seu teor máximo (TAIZ, 2002; CRAWFORD, 1999; KAISER, 1997).

A inibição da atividade da NR pode ocorrer em minutos, em resposta à fosforilação de um resíduo de serina na região *hinge* 1 por proteínas cinases dependentes de cálcio ( CHUNG *et al.*, 1999; KAISER *et al.*, 2002; COMPAROT *et al.*, 2003; PROVAN *et al.*, 2006). No entanto, a fosforilação da enzima, por si só, não causa sua completa inativação. O processo só se finaliza após a conjugação reversível da NR ao complexo protéico conhecido por 14-3-3, marcando a enzima para a degradação (KAISER e HUBER, 1994; BACHMANN *et al.*, 1995; CHUNG *et al.*, 1999; WEINER e KAISER, 1999; 2000; 2001; COMPAROT *et al.*, 2003; PROVAN *et al.*, 2006). As proteínas 14-3-3 funcionam como um dímero e suas subunidades precisam estar ligadas a um metal divalente (BUCHANAN, 2000; CRAWFORD, 1999; DARLING *et al.*, 2005).

O estado de fosforilação da NR varia durante o ciclo diurno (LILLO, 1994; KAISER, 1997). No escuro, a NR é fosforilada no resíduo de serina localizado na região "*hinge* 1". Depois que as proteínas 14-3-3 ligam-se, a NR é inativada. A luz induz a desfosforilação e, conseqüentemente, a NR é ativada. A NR, no entanto, é degradada a

uma taxa constante na luz ou no escuro, independentemente da fosforilação pós-traducional. A luz também induz o acúmulo do RNAm da NR (KAISER, 1997). Os altos teores da proteína NR, em presença de luz, parecem ser consequência dos efeitos positivos da luminosidade na síntese dessa enzima (transcrição e tradução). A glicose e a sacarose podem substituir a luz na indução do acúmulo do RNAm da NR, sugerindo que os esqueletos carbônicos seriam os fatores determinantes na regulação da NR em nível transcricional (ASLAN and HUFFAKER, 1984; CHENG *et al.*, 1992; CRAWFORD *et al.*, 1992; VAUCHERET *et al.*, 1992; VICENTZ *et al.*, 1993; LILLO, 1994; LEA *et al.* 2006).

As citocininas, dentre os fitormônios, são as que mais interferem na indução da atividade da NR (YU *et al.*, 1998). Em 1969, LIPS & ROTH-BEJERANO realizaram os primeiros estudos, relatando o papel indutor de uma citocinina sintética. Esses autores trabalharam com plantas de *Nicotiana rústica* que, após serem pulverizadas com cinetina, apresentaram um aumento na atividade da NR foliar. Folhas de cevada tratadas com benzilaminopurina (BA), na presença de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e luz, além de apresentarem aumento na atividade dessa enzima, também tiveram os teores de RNAm da NR aumentados, sugerindo o controle hormonal da transcrição da NR (LU *et al.*, 1990; 1992). O nível das citocininas endógenas zeatina, zeatina ribosídica e isopentenil adenina ribosídica também influenciaram a formação de transcritos da NR em abacaxizeiro. O acúmulo desses transcritos ocorreu seguidamente ao aumento desses hormônios e é seguido pelas maiores atividades da NR registradas (FRESCHI *et al.*, 2009).

A baixa temperatura pode ser considerada um importante fator ambiental, causando uma rápida ativação da NR nas folhas de *Triticum aestivum* L., resultado da desfosforilação da proteína. Plantas de trigo, após serem aclimatadas por 7 dias a 2°C, apresentaram um aumento na atividade da NR dependente de NADH. A atividade dobrou nesse período. A quantidade de proteína NR também aumentou, mostrando que a regulação da atividade dessa enzima pode ser dependente da ativação da NR já presente, assim como da síntese *de novo* da enzima (YANEVA *et al.*, 1996). O conteúdo de nitrato nas folhas de trigo foi reduzido a 1/3 após o período de aclimação (YANEVA *et al.*, 2002).

### **Nitrato Redutase Associada à Membrana Plasmática (NRMP)**

Em procariontes foi observada a presença da NR tanto no citoplasma quanto na membrana plasmática. As duas isoformas apresentaram diferenças com respeito ao seu tamanho, às suas subunidades e aos seus genes codificantes (BERKS *et al.*, 1995; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, OLIVARES & BEDMAR, 1996; DELGADO, FERNANDO-LOPEZ & BEDMAR-EULOGIO, 1998; MEGALON *et al.*, 1998; BLASCO *et al.*, 1998; TISCHNER, 2000). Nos eucariontes, a NR é conhecida como uma enzima citossólica presente em todos os organismos autótrofos (RITENOUR *et al.*, 1966; DALLING *et al.*, 1972; SUZUKI *et al.*, 1981; OAKS & HIREL, 1985). No entanto, outros estudos têm demonstrado a existência de uma enzima redutora de nitrato associada à membrana plasmática (NRMP). A NRMP foi detectada em algas (JONES and MOREL, 1988; TISHNER *et al.*, 1989; STÖRN *et al.*, 1993) e em várias espécies de plantas terrestre (WARD *et al.*, 1988;1989; DE MARCO *et al.*, 1994; KLOBUS *et al.*, 1994; MEYERHOFF *et al.*, 1994; KUNZE *et al.*, 1997; STÖRN & ULRICH, 1997), tanto nas raízes como na parte aérea.

A NRMP ligada por uma âncora GPI foi detectada em folhas de tabaco por STÖRN em 1998 e tratava-se de um monômero com massa molecular de 96 kDa enquanto que em raízes tinha 63 kDa. Além disso, uma das formas solúveis da NR, com massa molecular de 93 kDa, apesar de estar voltada para a face citossólica, também está ligada à membrana e, nesse caso há relatos de pequenas variações em sua massa (CAMPBELL & KINGHORN, 1990; KUNZE *et al.*, 1997; STÖRN, 1998).

## JUSTIFICATIVA

Trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP buscaram entender a influência do termoperíodo sobre o metabolismo fotossintético do abacaxizeiro (*Ananas Comosus L. Merr.*) cultivado *in vitro*. Observou-se que o metabolismo CAM era induzido por condições termoperiódicas (28°C durante o dia e 15°C a noite). Em temperatura constante, as plantas se comportaram como C<sub>3</sub> (NIEVOLA *et al.*, 2002). Portanto, as plantas de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* podem ser consideradas C<sub>3</sub> - CAM facultativas. Sabe-se que vários fatores ambientais podem influenciar o processo CAM e a temperatura é um deles (HAAG-KERWER *et al.*, 1992). NIEVOLA *et al.* (2002) também analisaram a atividade da enzima nitrato redutase (NR) ao longo do ciclo diurno em plantas C<sub>3</sub> ou CAM de abacaxizeiro. Para a parte aérea, o ritmo de atividade da NR foi semelhante entre as plantas com fotossíntese C<sub>3</sub> ou CAM, sendo que as maiores atividades ocorreram durante o período iluminado. As plantas C<sub>3</sub> apresentaram níveis superiores de atividade que puderam ser correlacionados aos mais altos conteúdos de nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) endógeno nessas plantas. Já para as raízes, observou-se o oposto. As plantas CAM, surpreendentemente, foram as que mostraram maior atividade nesse órgão em relação às C<sub>3</sub>, apesar de os teores de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> endógeno nesse órgão (que deveria configurar como principal indutor da NRc) serem inferiores aos observados para C<sub>3</sub>. Isso sugere que um tipo de indução da NR adicional àquela realizada pelo substrato tenha ocorrido nas plantas CAM. Acredita-se que, provavelmente, a diminuição da temperatura noturna foi o fator estimulador do aumento da atividade da NR radicular em abacaxizeiro. Mas, ainda restaram alguns pontos a esclarecer. Era preciso saber se houve um incremento da atividade da NRc naquele período ou se os resultados estariam vinculados à indução da NRMP quando as plantas passaram pelo tratamento com temperaturas noturnas mais baixas.

## OBJETIVO

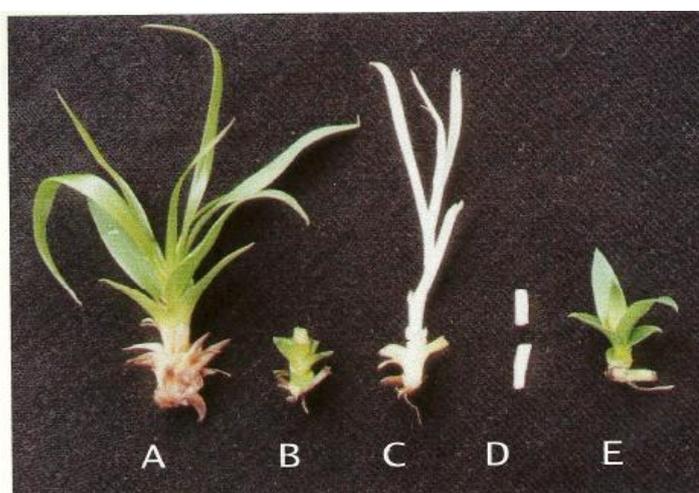
O presente trabalho teve como objetivo principal pesquisar sobre a possibilidade da existência de uma NR associada à membrana plasmática, que seria responsável pelo incremento da atividade dessa enzima registrada nas raízes de *Ananas comosus*, quando plantas cultivadas *in vitro* foram submetidas ao termoperíodo. Para tanto foram necessárias adotar as seguintes estratégias:

- ✓ Determinar o tempo mínimo de exposição das plantas ao termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite), necessário à indução da nitrato redutase (NR) radicular.
- ✓ Verificar a influência da idade das plantas na resposta ao tratamento com baixa temperatura noturna.
- ✓ Padronizar o método de ensaio *in vitro* da NR para plantas de abacaxizeiro.
- ✓ Definir o método de fracionamento celular mais adequado para a extração de frações enriquecidas de membranas plasmáticas.
- ✓ Verificar a existência de uma NR associada à membrana plasmática, que seria responsável pelo incremento da atividade dessa enzima registrada nas raízes de abacaxizeiro, após serem submetidas ao termoperíodo por 30 dias.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1) Obtenção do material vegetal

Para todas as etapas do projeto, plantas de *Ananas comosus* (L.) Merr. Var. Smooth Cayenne foram obtidas por micropropagação. Neste processo, utilizaram-se segmentos nodais como explantes (MERCIER & NIEVOLA, 2002). Plantas entre 3 e 5 meses de idade tiveram as folhas e as raízes excisadas (Fig. 1 A e B). Em seguida, foram submetidas ao estiolamento caular no escuro (Fig. 1 C). Durante o estiolamento, as plantas permaneceram em meio de cultura de Murashigue & Skoog (MS) (1962), com pH 5.8, acrescido de 2 g/L de Phytigel®, por 60 dias. A partir do caule estiolado foram isolados segmentos nodais contendo uma gema lateral em cada um deles (Fig. 1 D). Estes seguimentos caulinares foram inoculados em novo meio de mesma composição. Das gemas laterais desenvolveram-se novas plantas, iniciando com o surgimento da parte aérea e, em seguida, das raízes (Fig. 1 E). Os frascos contendo os seguimentos caulinares foram mantidos em sala de cultura com fotoperíodo de 16 horas e temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ . A intensidade luminosa foi de  $55 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 2).



Mercier & Nievola (2002)

Fig.1: Micropropagação de abacaxizeiro. As plantas tiveram suas raízes e folhas excisadas e, após 60 dias no escuro, foram retirados segmentos nodais do caule estiolado. Desses segmentos desenvolveram-se novas plantas.



Fig. 2: Prateleiras iluminadas contendo os frascos de cultivo de abacaxizeiro.

O período de permanência das plantas na sala de cultivo variou de acordo com o experimento realizado.

Na primeira etapa, quando as plantas deveriam ter idades variadas ao final dos tratamentos, o tempo de permanências na sala de cultivo foi de 90 dias.

Após esse período foram transferidas para novo meio de cultura de composição idêntica à anterior e submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia/ 15°C noite) e à temperatura constante (28°C dia e noite) (controle). Durante os tratamentos as plantas permaneceram em câmaras incubadoras do tipo BOD. O tempo de permanência nos tratamentos foi de 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 e 60 dias (Tabela 1). Após cada tratamento a atividade *in vivo* da NR foi analisada durante o período de ausência de luz.

Idade das plantas no início do tratamento	Tempo no tratamento termoperiódico ou em temperatura constante
90 dias	1 dia
90 dias	3 dias
90 dias	5 dias
90 dias	7 dias
90 dias	15 dias
90 dias	30 dias
90 dias	40 dias
90 dias	50 dias
90 dias	60 dias

Tabela 1: tempo de permanência das plantas com 90 dias de idade no tratamento termoperiódico ou em temperatura constante antes da análise da atividade noturna *in vivo* da nitrato redutase.

Em uma etapa seguinte, o experimental foi montado de forma que todas as plantas atingissem, no final do tratamento, a idade de 90 dias (incluindo o tempo de permanência na sala de cultivo e nos tratamentos). Da mesma forma, após esses períodos as plantas foram transferidas para novo meio de cultura de composição idêntica à anterior e submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia/ 15°C noite) ou à temperatura constante de 28°C dia (controle). As mesmas câmaras incubadoras do tipo BOD foram utilizadas. O tempo de permanência no tratamento foi de 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 e 60 dias (Tabela 2). Após cada tratamento a atividade *in vivo* da NR foi analisada durante o período de ausência de luz.

Idade das plantas no início do tratamento	Tempo no tratamento termoperiódico ou em temperatura constante	Idade final das plantas
89 dias	1 dia	90 dias
87 dias	3 dias	
85 dias	5 dias	
83 dias	7 dias	
75 dias	15 dias	
60 dias	30 dias	
50 dias	40 dias	
40 dias	50 dias	
30 dias	60 dias	

Tabela 2: idade em que as plantas foram submetidas ao tratamento termoperiódico ou à temperatura constante e o tempo de permanência nestas condições antes da análise da atividade noturna *in vivo* da nitrato redutase.

## 2) Atividade *in vivo* da NR

A quantificação da atividade da NR citossólica *in vivo* foi baseada no método descrito por NIEVOLA & MERCIER (2001), adaptado para as folhas e raízes de *Ananas comosus*. Para tanto, amostras foliculares e radiculares foram fragmentadas (1g de massa fresca de folhas e 0,3g de massa fresca de raízes, correspondendo a 50 plantas). Cada tubo recebeu 6 mL da solução de incubação contendo tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 M, pH 7,5; NaOH, 0,1M), KNO<sub>3</sub> (50 mM) e n-propanol (3%), previamente aquecida a 30°C e desaerada. As amostras foram infiltradas a vácuo 3 vezes por 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 60 minutos. Ao final da incubação, alíquotas de 1 mL foram coletadas para a determinação do nitrito

no tempo de 60 minutos (Fig. 3). A quantificação total do nitrito foi feita descontando-se o nitrito encontrado nas amostras antes da reação (tempo 0) do obtido após a reação (tempo 60 min.).

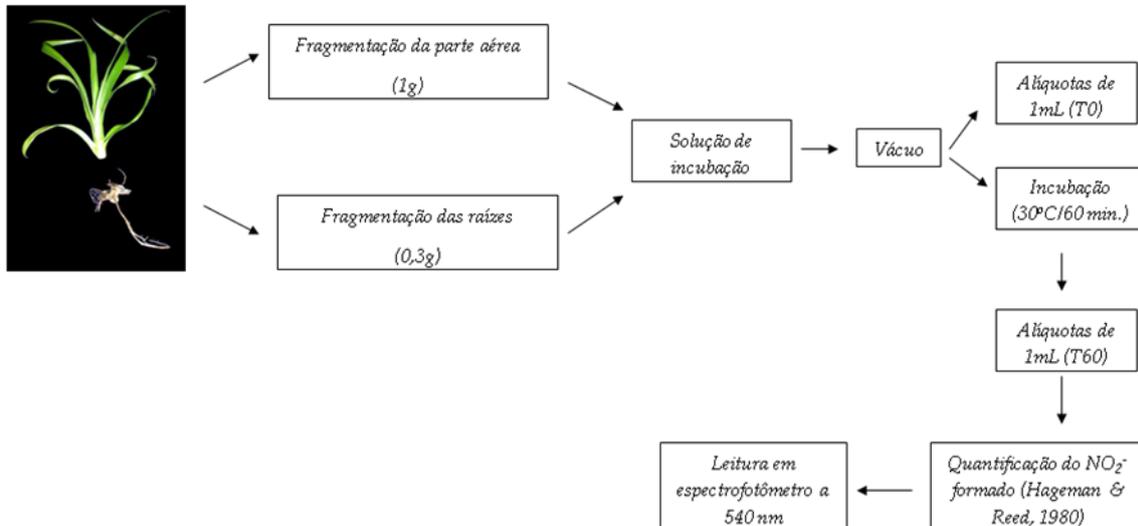


Fig. 3: Esquema ilustrativo dos passos realizados durante a determinação da atividade *in vivo* da NR.

### 2.1) Condições do ensaio *in vivo*

No laboratório de Fisiologia Vegetal foi montada uma câmara de crescimento que possui prateleiras com ajustes individuais de luz e temperatura. Além disso, dentre as adaptações para controle de umidade, existe uma porta especial que, inclusive, impede qualquer passagem de luz. Apesar das plantas não terem sido cultivadas, nem terem passado pelos tratamentos nessa câmara, os ensaios *in vivo* da NR foram realizados no interior da mesma sob luz verde, sem qualquer interferência de outra iluminação (Fig.4).



Fig.4: Sala de cultivo onde foram realizados os ensaios enzimáticos.

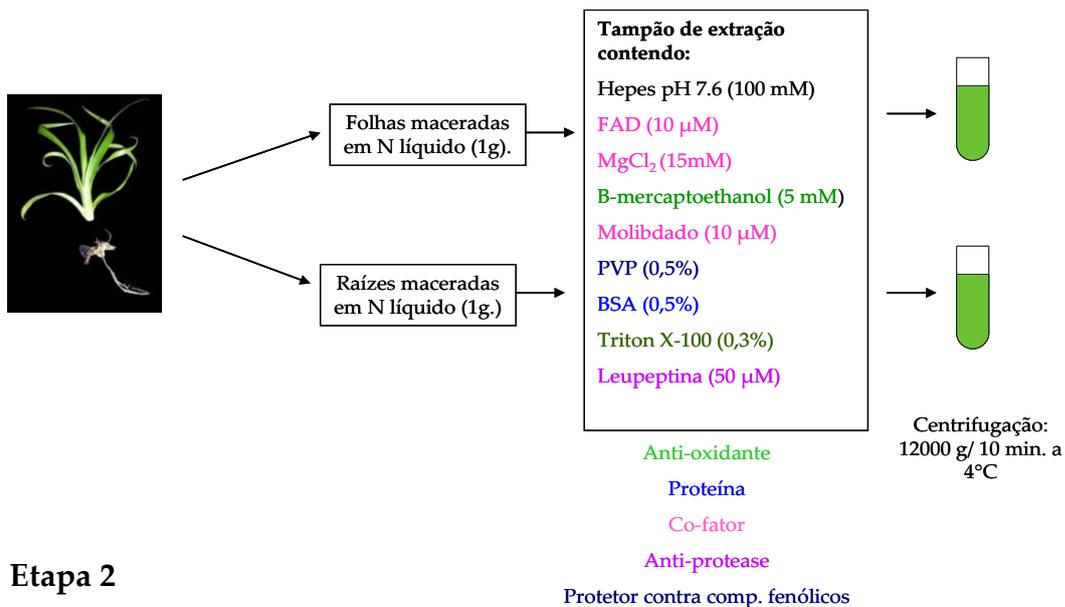
### **3) Atividade *in vitro* da NR.**

O método de quantificação da atividade *in vitro* da nitrato redutase foi padronizado neste projeto de pesquisa para a espécie *Ananas comosus*. Três protocolos originais foram testados.

#### **3.1) Protocolo desenvolvido por Kaiser *et al.* (1997) para tabaco.**

Um grama de folhas e raízes foram macerados, separadamente, em nitrogênio líquido e acrescidos de tampão de extração na proporção de 2 mL/g de massa fresca. O tampão era constituído por 100 mM de tampão Hepes-KOH (pH 7.6), 10  $\mu$ M FAD, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol, 10  $\mu$ M de molibdato, 0,5% de PVP, 0,5% de BSA, 0,3% de triton X-100 e 50  $\mu$ M de leupeptina. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C e do sobrenadante, retiraram-se alíquotas de 100  $\mu$ L que foram colocadas em tubos que continham 900  $\mu$ L de um tampão de reação composto por 100 mM de Hepes-KOH (pH 7.6), 10  $\mu$ M FAD, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM de DTT, 5 mM de KNO<sub>3</sub> e 50 mM de NADH. Após 5 minutos de incubação a 24°C, a reação foi interrompida acrescentando-se 125  $\mu$ L de acetato de zinco (0,5 M). Outra centrifugação a 13000g por 5 minutos foi realizada e o sobrenadante foi usado para determinação colorimétrica do nitrito formado (Fig. 5).

## Etapa 1



## Etapa 2

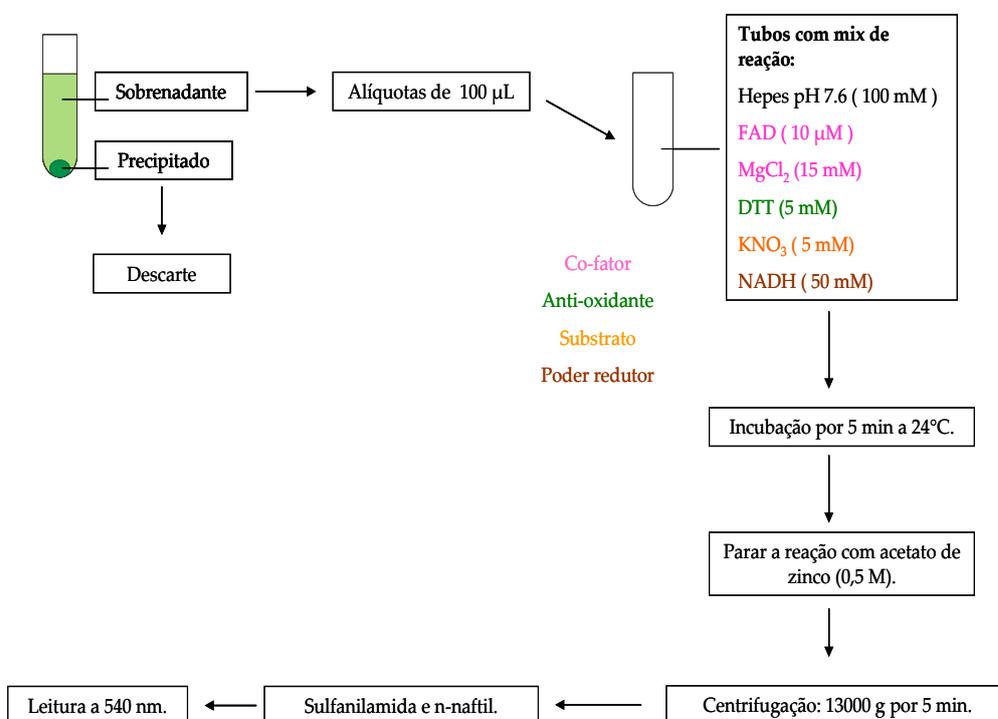


Fig. 5: Esquema os principais passos do método de quantificação *in vitro* da nitrato redutase segundo KAISER *et al.*, 1997.

### 3.2) Método desenvolvido para macroalgas marinhas ( modificado por

CHOW *et al.* (2004)).

Um grama de folhas e raízes foram macerados, separadamente, em nitrogênio líquido e o material foi acrescido de 2 mL de tampão de extração contendo tampão fosfato pH 8.0 (0,2 M), EDTA (0,5 M), DTT (0,5 M) e BSA (0,3%). Após centrifugação, a 12000 g, por 15 minutos a 4°C, alíquotas de 50 µL do sobrenadante foram colocadas em tubos contendo 300 µL do tampão de reação constituído por tampão fosfato pH 8.0 (0,2 M), KNO<sub>3</sub> (0,2 M), MgSO<sub>4</sub> (25 mM) e NADH (2,2 mM). Após o período de incubação por 5 minutos a 20°C a reação foi parada com 125 µL de sulfato de zinco (ZnSO<sub>4</sub>) (0,1 M) e 125 µL de etanol (95%). Uma nova centrifugação foi feita a 14000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi usado para determinação colorimétrica do nitrito formado (Fig. 6).

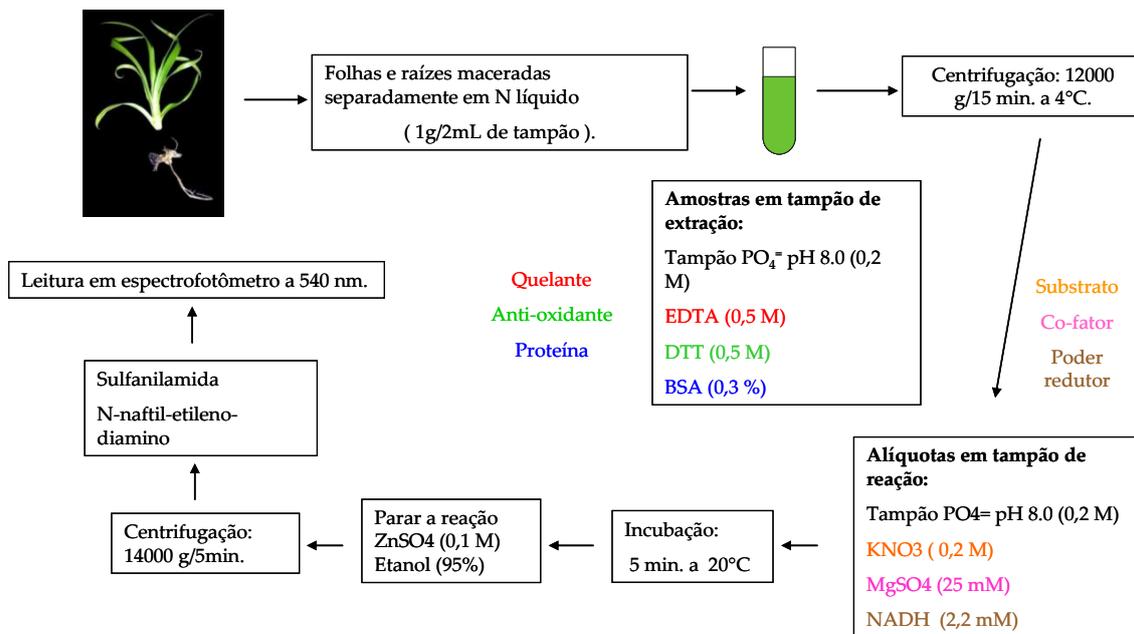


Fig. 6: Esquema mostrando os principais passos do método para quantificação *in vitro* da NR desenvolvido para macroalgas marinhas ( modificado por CHOW *et al.* (2004)).

### 3.3) Método desenvolvido para milho (LONG & OAKS, 1990)

Um grama de folhas e de raízes foram maceradas separadamente em nitrogênio líquido. As amostras foram colocadas em tubos contendo 4 mL do tampão de extração composto por tampão Tris-HCl (pH 8.5) (25mM), EDTA (1M), DTT (1mM), BSA (1 %), FAD (20 $\mu$ M), cisteína (10mM) e leupeptina (10  $\mu$ M). A primeira centrifugação foi feita a 10000 g por 20 min. a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gaze e alíquotas de 200  $\mu$ L do extrato foram colocadas em tubos que continham o tampão de reação. Esse tampão foi constituído por 200  $\mu$ L de Hepes pH 7.0 (0,65M), 200  $\mu$ L de KNO<sub>3</sub> (0,1M) e H<sub>2</sub>O ultrafiltrada (para acertar o volume para 1,4 mL). Para verificar a atividade nas raízes, os testes foram feitos com NADH e NADPH. No caso da atividade com NADPH, o meio de reação recebeu, ainda, 100  $\mu$ L de ácido oxalacético (2,64 mg/mL H<sub>2</sub>O). A reação foi iniciada adicionando-se 100  $\mu$ L de NADH (3,6 mg/mL) e/ou 100  $\mu$ L de NADPH (4,2 mg/mL), ambos diluídos em tampão fosfato (KPO<sub>4</sub>) pH 7,0 (0,1M). A incubação ocorreu por 20 min. a 28°C. A reação foi parada com a adição de 100  $\mu$ L de álcool desidrogenase (0,5 mg/mL de tampão fosfato 0,1M em pH 7.0) e 100  $\mu$ L de acetaldeído 2%. A determinação colorimétrica do nitrito formado foi feita acrescentando-se 1 mL de sulfanilamida 1% (em HCl 1M) e 1 mL de n-naftil etileno diamino 0,01% (em H<sub>2</sub>O ultrafiltrada). A leitura foi feita em espectrofotômetro 540 nm (Fig. 7).

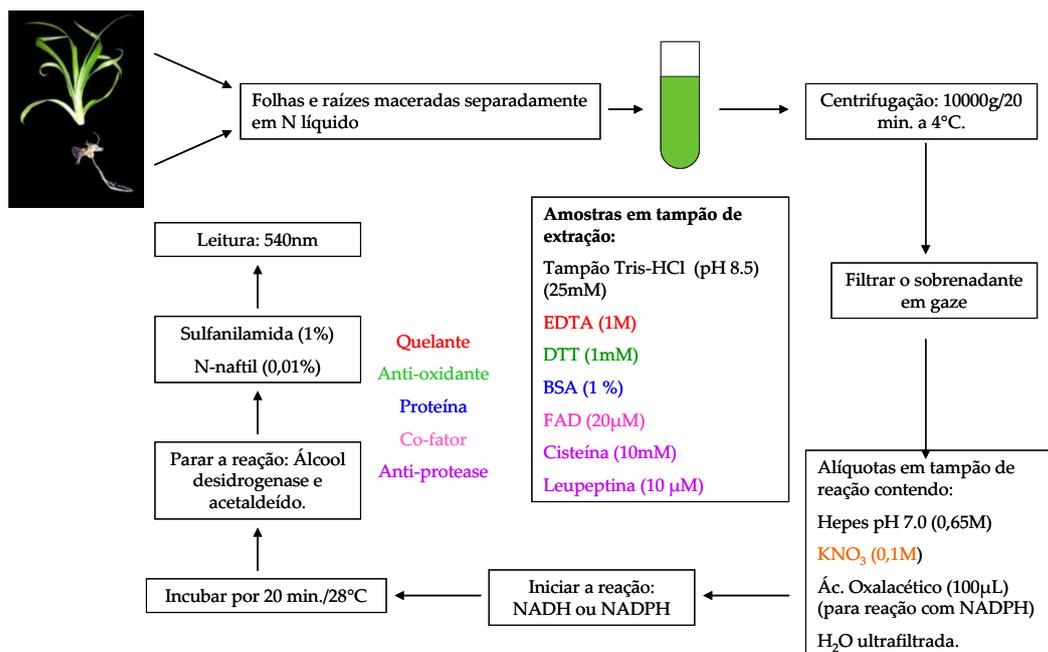


Fig 7: Esquema mostrando os principais passos do método desenvolvido para quantificação *in vitro* da NR em plantas de milho (LONG & OAKS, 1990)

#### **4) Determinação do nitrito formado.**

A quantificação do nitrito formado foi determinada segundo o método descrito por HAGEMAN and REED (1980).

No caso da quantificação da atividade enzimática *in vivo*, alíquotas de 1 mL da solução problema foram adicionadas de, primeiramente, 0,3 mL da solução de sulfanilamida (1% em HCl 3M) e, em seguida, por 0,3 mL da solução de n-naftil-etileno-diamino (0,02%). As frações ficaram em repouso por mais 30 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Ao final desse período, foi adicionado 0,9 mL de água ultrafiltrada e a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

No caso da quantificação *in vitro*, as alíquotas de 0,9 mL foram acrescidas de 0,3 mL da solução de sulfanilamida (1% em HCl 3M) e, em seguida, de 0,3 mL da solução de n-naftil-etileno-diamino (0,02%). As frações ficaram em repouso por mais 20 minutos, no escuro e em temperatura ambiente. Ao final desse período, a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

#### **5) Fracionamento celular**

Para o isolamento das frações enriquecidas de membranas plasmáticas foram testados métodos de fracionamento por gradiente de sacarose e de fracionamento por partição de fases.

No processo de padronização dessa técnica faz-se necessário verificar o grau de pureza das frações de membranas plasmáticas. Utilizou-se o ensaio *in vitro* da malato desidrogenase (MDH), uma enzima localizada exclusivamente no citoplasma, que está bem estabelecido em nosso laboratório para *Ananas comosus*.

A descrição das adequações e os resultados obtidos durante o processo de padronização encontram-se no item RESULTADOS.

Os métodos originais estão descritos nos itens seguintes:

##### **5.1) Fracionamento por gradiente de sacarose (GALLANGER and LEONARD, 1982).**

Folhas e raízes foram maceradas separadamente com tampão de homogeneização na proporção de 1 g/4 mL. O tampão de homogeneização foi composto por sacarose (250 mM), Tris-Mes (25 mM) (pH 7.7), EDTA (3 mM), DTT (2,5 mM). Após maceração, o material foi filtrado em 4 camadas de gaze e centrifugado a

13.000 g por 15 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi submetido a nova centrifugação em ultracentrífuga a 80.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante (fração solúvel ou citossólica) foi reservado e o precipitado foi ressuscitado com 2 mL de tampão de ressuspensão. Este tampão foi composto por sacarose (250 mM), DTT (1 mM) e Tris-Mes (1 mM) (pH 7.2). Para obter as frações ricas em membranas plasmáticas o material foi aplicado no topo de gradientes de sacarose com concentrações 35/45% em Tris-Mes (1 mM) (pH 7.2). Após centrifugação a 82.500 g por 2 horas a 4°C as frações de membranas plasmáticas foram coletadas da interface entre as concentrações de sacarose (Fig. 8).

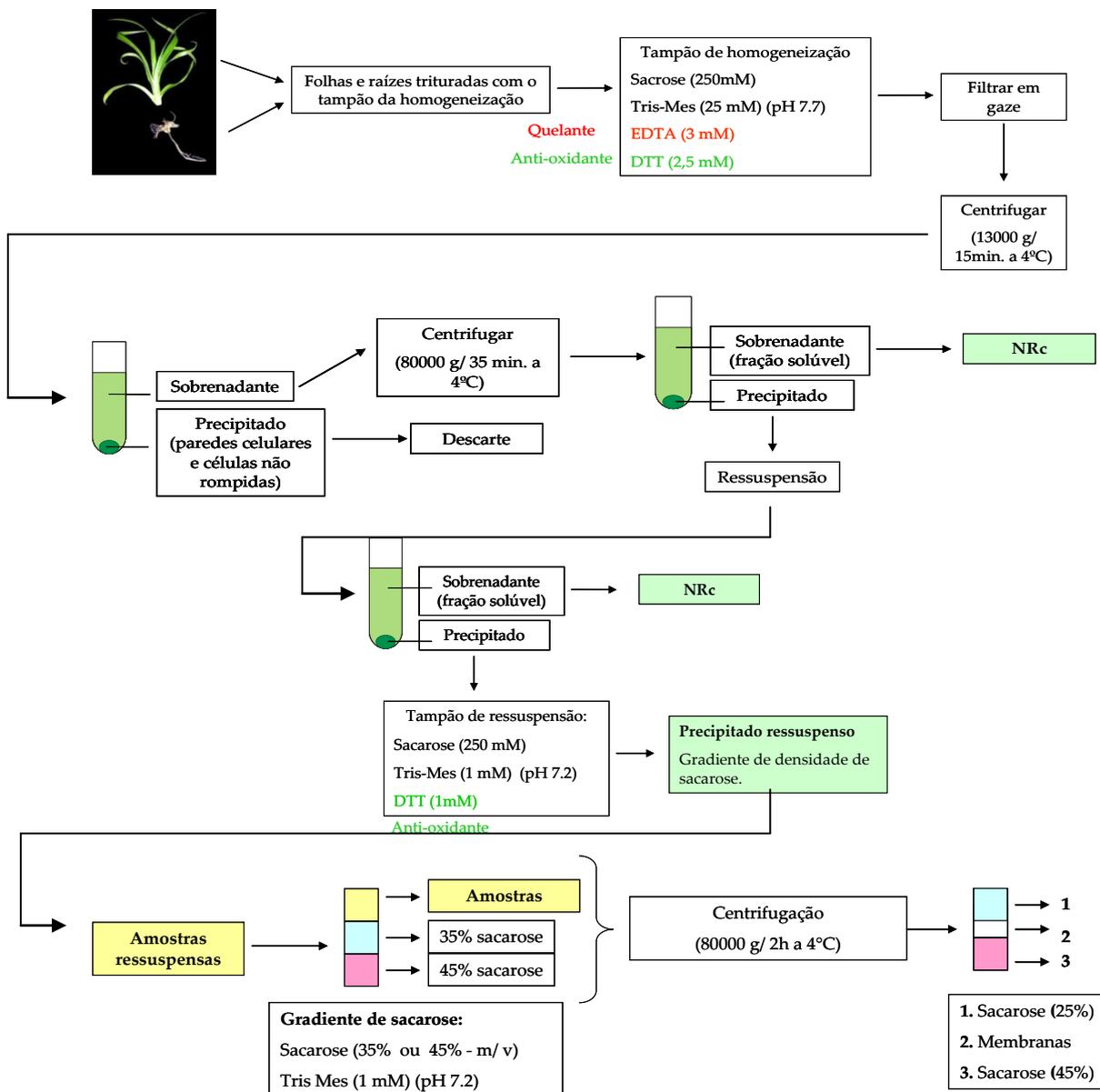


Fig. 8: Esquema ilustrativo do método de fracionamento celular por gradiente de sacarose (GALLANGER and LEONARD, 1982).

## **5.2) Fracionamento por partição de fases com múltiplas lavagens (BRUSCA and RADOLF *et al*, 1994).**

As amostras foram maceradas em tampão de extração contendo Triton X-114 (2 %) e tampão fosfato salino (PBS – 10 mM NaPO<sub>4</sub>; 145 mM NaCl) a 4°C. A parte solúvel foi retirada após centrifugação a 13000g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi descartado e a parte solúvel transferida para novo tubo. Após incubação por 10 minutos a 37°C, seguido da centrifugação a 13.000g por 10 minutos a 25°C foi possível observar a separação de fases (fase aquosa e fase de detergente). A fase aquosa e a de detergente foram suplementadas com Triton X-114 ou PBS, respectivamente. A separação de fases foi repedida de 3 a 5 vezes, correspondendo a incubação e centrifugação (lavagens).

## **5.3) Fracionamento por partição com sistema de duas fases – Dextran T-500 e PEG 3350 (LARSSON *et al*, 1994).**

Folhas e raízes foram separadas e homogeneizadas com tampão contendo sacarose (250 mM), glicerol (10%), Tris-Mes (25 mM) (pH 7.7), EDTA (3 mM), DTT (2,5 mM) e BSA (0,3%). A proporção foi de 1g/3mL. O homogeneizado foi filtrado em 4 camadas de gaze e plastídeos, mitocôndrias, paredes celulares e células não rompidas foram precipitados após centrifugação a 10.000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e centrifugado a 85.000g por 50 minutos a 4°C. O precipitado foi ressuscitado com 4 mL de tampão de ressuspensão contendo sacarose (0,33 M), tampão fosfato-potássio (KPO<sub>4</sub>) pH 7,8 (5 mM), KCl (0-5 mM), DTT(1 mM) e EDTA (0,1 mM), formando a fração microsomal, constituída por vesículas de retículo endoplasmático (liso ou rugoso) formadas no momento da homogeneização, quando as células são rompidas.

Para a partição de fases os microsomos (1,5 ml) foram acrescentados em um sistema pré-preparado de duas fases. O sistema era composto por 6.2% (m/m) de dextran T-500, 6.2% (m/m) de polietilenoglicol (PEG) 3350, sacarose (330 mM), tampão fosfato-potássio (KPO<sub>4</sub>) pH 7,8 (5 mM). O material foi misturado, submetendo-se os tubos a 30 inversões. Uma nova centrifugação foi feita a 1.500g por 5 minutos. Após esta, observaram-se duas fases distintas: uma superior, composta por membranas plasmáticas e uma fase inferior, composta por membranas intracelulares (Fig. 9).

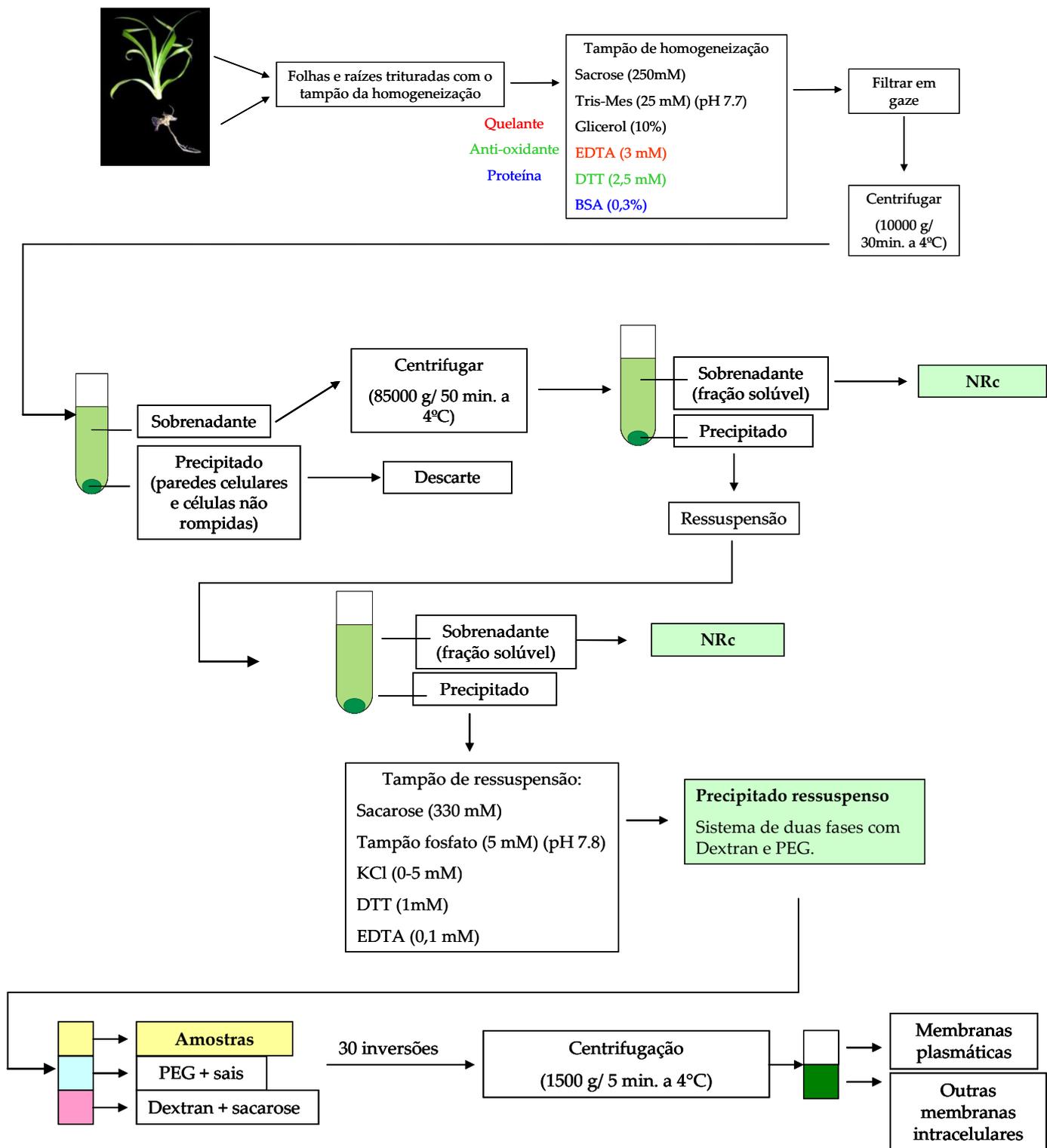


Fig. 9: Esquema mostrando os principais passos do método de fracionamento celular por sistema de duas fases (LARSSON *et al*, 1994).

#### **5.4) Quantificação de proteínas totais nas frações de membranas plasmáticas e de citoplasma.**

A quantificação das proteínas totais foi feita segundo o método desenvolvido por BRADFORD (1976) com concentrações de BSA como padrões.

#### **5.5) Atividade *in vitro* da malato desidrogenase (MDH) (LEPORT *et. al.*, 1996) com adaptações (NIEVOLA, 2002).**

As amostras provenientes das frações citossólicas e de membranas plasmáticas de folhas e raízes foram diluídas 40 vezes (folhas) ou 20 vezes (raízes) em tampão de dessalinização (50 mM de Tris-HCl, 1 mM de DTT, 1 mM de EDTA, 0.1% (m/v) BSA).

A atividade *in vitro* da MDH foi quantificada baseando-se no consumo de NADH na reação catalisada por essa enzima (LEEGOOD, 1993; LEPORT *et al.*, 1996) enquanto acontece a redução do oxaloacetato. Para tanto, tubos de reação contendo Tris-HCl (50 mM) (pH 8.0), MgCl<sub>2</sub> (5 mM) e 0.1% (m/v) de albumina bovina (BSA) foram acrescidos de 400 µL do filtrado diluído. Após 5 minutos de pré-incubação, 200 µL de NADH (2 mM) e 200 µL de OAA (20mM) foram adicionados aos tubos de reação e a leitura automática da absorbância foi iniciada. A referida leitura ocorreu em 340 nm com intervalos de 10 s até a estabilização dos valores mínimos de leitura.

#### **6) Análise estatística dos dados**

Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente por meio da análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelos Teste t-student e Teste de Tukey em nível de 5%.

## RESULTADOS

### Atividade *in vivo* da NR

Na primeira etapa, plantas com 90 dias de idade foram transferidas para câmara de cultivo do tipo BOD onde permaneceram por 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 e 60 dias sob temperatura constante (28°C dia/noite - controle) ou sob termoperíodo (28°C dia/15°C noite) (Tabela 1 – Material e Métodos).

No caso das folhas, verificou-se que até o 5º dia de tratamento a atividade da NR foi influenciada positivamente pela baixa temperatura no período noturno. Porém essa tendência não foi mantida após 7 dias em termoperíodo. As atividades medidas, nas plantas submetidas ao termoperíodo com 50 e 60 dias apresentaram modificações mínimas quando comparadas àquelas verificadas nos experimentos até 40 dias. Quanto às atividades nas plantas controle a partir de 7 dias, notam-se diferenças significativas apenas após 40 e 60 dias (fig. 10).

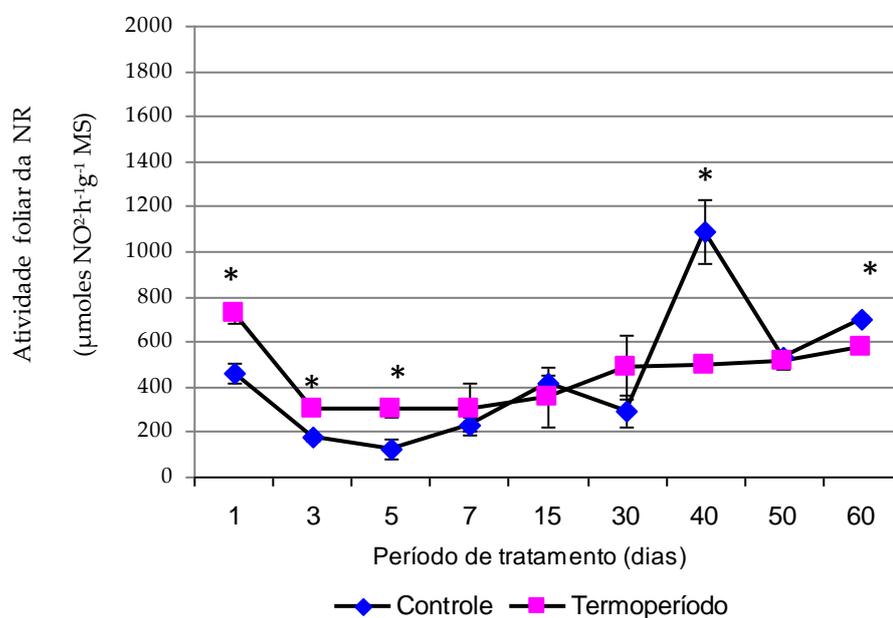


Fig.10: Atividade *in vivo* da NR medida em folhas de abacaxizeiro cultivados por 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 e 60 dias. Teste T P < 0,05 representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo.

Para as raízes, observa-se um aumento significativo na atividade da NR nas plantas que estiveram sob o tratamento entre 30 e 40 dias. Entretanto, após esse período houve um forte declínio (fig. 11).

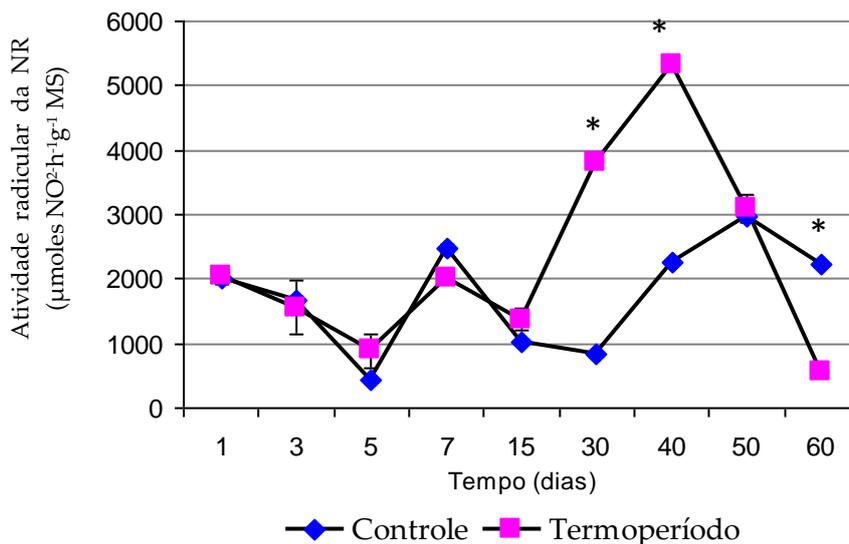


Fig.11: Atividade *in vivo* da NR medida em raízes de abacaxizeiro com 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 e 60 dias. Teste T P < 0,05 representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo.

Na segunda etapa experimental, as plantas permaneceram sob o tratamento pelos mesmos períodos (1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 dias e 60 dias), seguindo-se o ensaio *in vivo* da NR durante o período noturno. No entanto, a transferência das plantas para as câmaras de cultivo ocorreu em estágios de desenvolvimento diferentes, de forma que ao final dos tratamentos todas as plantas tinham 90 dias de idade (Material e Métodos - Tabela 2).

Para as folhas das plantas submetidas ao tratamento termoperiódico, as atividades da NR medidas não variaram de forma substancial durante os tempos de tratamento, o que permite compará-las àquelas verificadas no primeiro experimental. Observou-se que não houve grande variação de respostas nas plantas controle. Porém fica claro que a baixa temperatura do período noturno não influenciou positivamente a atividade da NR nas folhas de abacaxizeiro. As oscilações nas atividades medidas

seguiram semelhantes entre as plantas que estiveram sob o tratamento termoperiódico e as plantas controle (fig. 12).

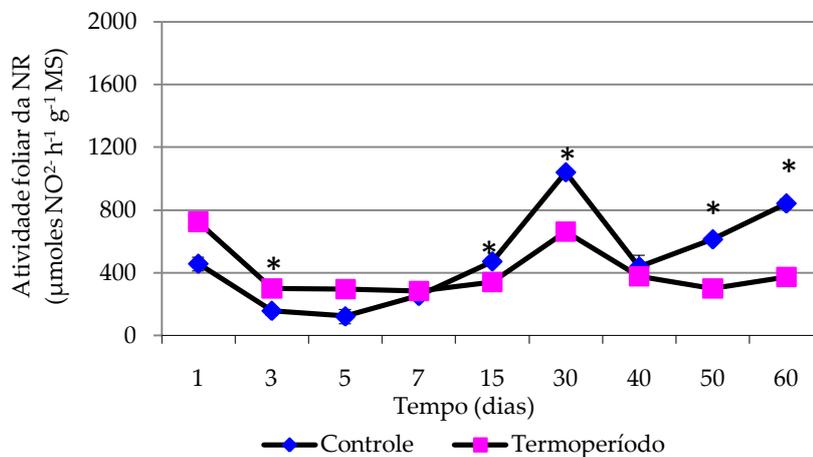


Fig.12: Atividade *in vivo* da NR medida em folhas de abacaxizeiro. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo.

Quando as atividades nas raízes foram avaliadas, observou-se que após 15 dias de tratamento houve um aumento contínuo, até o 50º dia, na atividade da NR nas plantas que estiveram sob baixa temperatura noturna. Após 50 dias notou-se uma tendência à estabilização da atividade enzimática. (fig. 13).

Nas plantas controle observou-se, após 30 dias, a mesma tendência verificada nas plantas submetidas ao tratamento, porém a atividade da NR a partir desse período foi cerca de duas vezes menor nas plantas controle em comparação com as plantas que estiveram sob baixa temperatura (fig. 13).

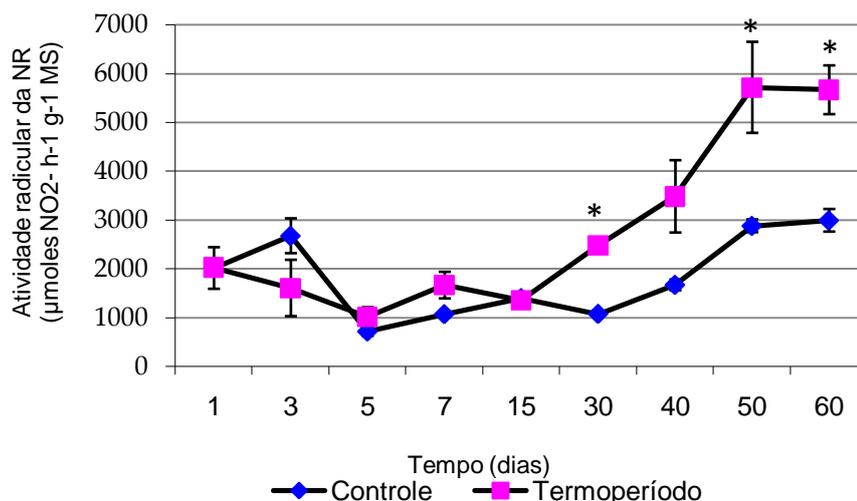


Fig.13: Atividade *in vivo* da NR medida em raízes de abacaxizeiro. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo.

### Adequação do método de ensaio *in vitro* da NR

Nas análises realizadas seguindo os protocolos desenvolvidos para tabaco ou macroalgas marinhas (“Material e Métodos” - itens 3.1 e 3.2, respectivamente) não foi possível detectar atividade da NR, mesmo após várias tentativas. As primeiras atividades foram obtidas quando empregou-se o método proposto por LONG & OAKS (1990) para plantas de milho (item 3.3). Tomando-se como base esse último, as adequações foram feitas para as plantas de abacaxizeiro.

As primeiras tentativas de otimização do método foram feitas levando-se em consideração o volume de extrato de folhas ou raízes utilizado na reação. No protocolo original, 200 µL de extrato eram adicionados em um volume final de reação de 1,7 mL. Inicialmente comparou-se a utilização de 200 µL de extrato com 400 µL. Dessa forma, não foi possível verificar nenhuma diferença significativa na atividade quantificada nas folhas (que utilizam NADH como doador de elétrons) (fig. 14). Porém, para as raízes que também utilizaram NADH, o aumento no volume de extrato pareceu ter atuado negativamente (fig. 15).

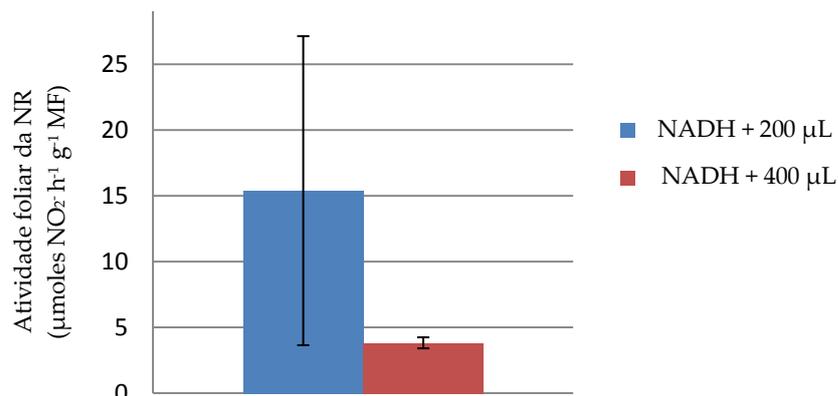


Fig. 14: Atividade *in vitro* da NR medida em folhas com a utilização de diferentes volumes de extrato no tampão de extração.  $P < 0,05$ . Teste T: não foi detectada diferença significativa entre a utilização de 200 µL ou 400 µL de extrato na reação.

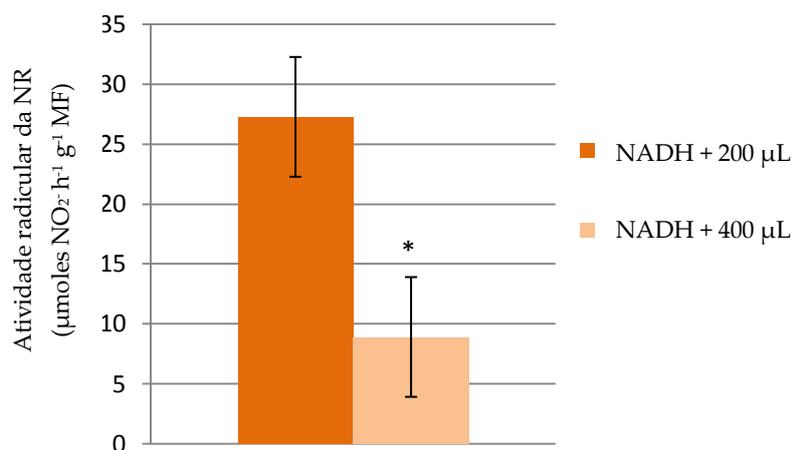


Fig. 15: Atividade *in vitro* da NR medida em raízes com a utilização de NADH como doador de elétrons e adicionando-se diferentes volumes de extrato no tampão de extração.  $P < 0,05$ . Teste T, representando diferença significativa entre a utilização de 200 µL ou 400 µL de extrato na reação.

Quando NADPH foi utilizado como doador de elétrons (fig. 16), observou-se que a atividade nas raízes foi sensivelmente menos pronunciada que aquela verificada quando utilizou-se NADH (fig. 15). As maiores atividades verificadas com NADPH não excederam as menores quantificadas com o uso do NADH. Porém, comparando-se

os volumes de extrato utilizados, foi possível observar que o aumento de 200  $\mu\text{L}$  para 400  $\mu\text{L}$  não apresentou diferença significativa com a adição de NADPH (fig. 16).

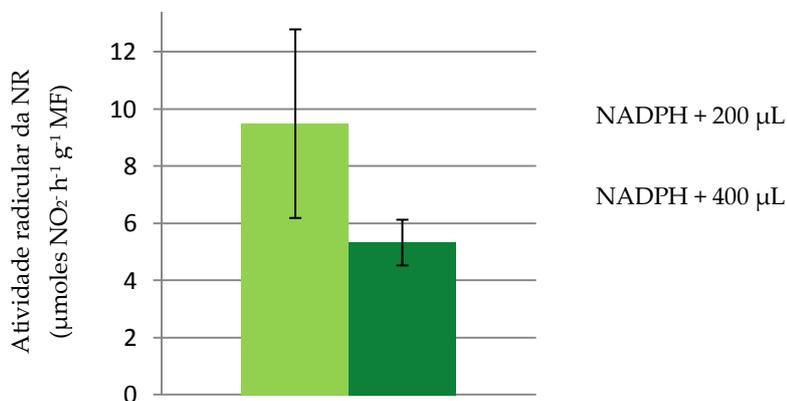


Fig. 16: Atividade *in vitro* da NR medida em raízes com a utilização de NADPH como doador de elétrons e adicionando-se diferentes volumes de extrato no tampão de extração.  $P < 0,05$ . Teste T: não foi detectada diferença significativa entre a utilização de 200  $\mu\text{L}$  ou 400  $\mu\text{L}$  de extrato na reação.

Em um segundo momento, análises foram feitas comparando-se a utilização de 400  $\mu\text{L}$  com 600  $\mu\text{L}$  do extrato. Folhas e raízes foram empregadas e ambas as reações ocorreram com a adição de NADH (fig. 17 e fig. 18).

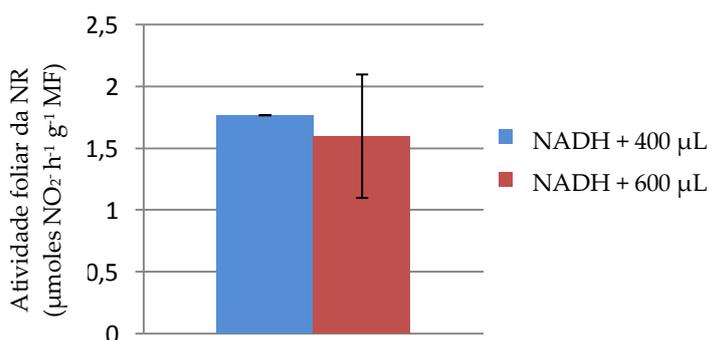


Fig. 17: Atividade *in vitro* da NR medida em folhas com a adição de diferentes volumes de extrato na reação.  $P < 0,05$ . Teste T: não foi detectada diferença significativa entre as atividades medidas com 400  $\mu\text{L}$  e 600  $\mu\text{L}$  de extrato .

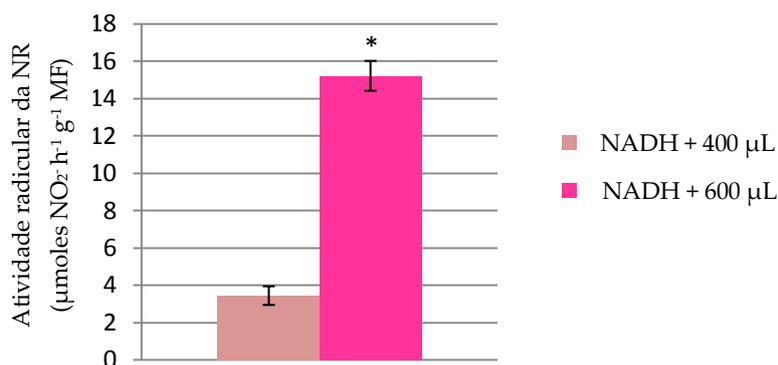


Fig. 18: Atividade *in vitro* da NR medida nas raízes (NADH) com a adição de diferentes volumes de extrato na reação.  $P < 0,05$ . Teste T representando diferença significativa entre as atividades medidas com 400 µL e 600 µL de extrato .

A figura 17 permite visualizar que nas folhas não houve diferença na atividade da NR quando se utilizaram 600 µL de extrato. Observou-se, inclusive, que as atividades verificadas decaíram fortemente, se comparadas com aquelas medidas com 200 µL e 400 µL de extrato. No entanto, por meio da Fig. 18, constatou-se que houve um aumento significativo na atividade da NR nas raízes quando 600 µL de extrato foram adicionados ao tampão de reação. No entanto, esse incremento na atividade não foi satisfatório quando comparado com o resultado mostrado na figura 15, onde foi possível registrar atividades sensivelmente maiores. Os demais testes foram realizados com folhas, alterando-se a composição do tampão de extração. As modificações testadas estão listadas abaixo (Tabela 3):

Tabela 3: Modificações aplicadas ao tampão de extração comparando-se ao tampão originalmente descrito (padrão).

Alterações	Composto	Concentração no tampão original de extração	Concentração testada
1	DTT	1 mM	2 mM
2	PVP	-	0,5%
3	DTT + PVP	DTT (1 mM) + PVP (-)	DTT (2 mM) + PVP(0,5%)
4	Leupeptina	10 µM	50 µM
5	BSA	1%	2,5%
6	Cisteína	10 mM	-

Os resultados mostram que, em comparação com o protocolo originalmente proposto para milho (protocolo original), os aumentos nas quantidades de leupeptina (de 10  $\mu$ M para 50  $\mu$ M), DTT (de 1 mM para 2 mM) e BSA (de 1% para 2,5%) não tiveram efeitos positivos, assim como a adição de PVP (Fig. 19).

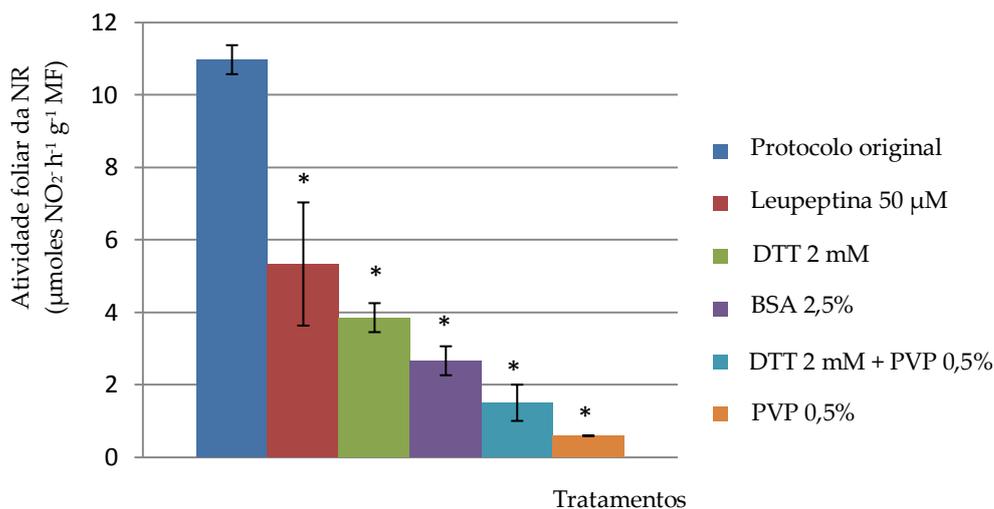


Fig. 19: Atividade *in vitro* da NR medida em folhas quando o tampão de extração foi modificado.  $P < 0,05$ . Teste T, representando diferenças significativas entre a aplicação do protocolo padrão e do protocolo com alterações no tampão.

Com relação ao emprego da cisteína, foram realizados testes comparativos, na presença (tampão original) e na ausência desse composto tanto para raízes quanto para as folhas utilizando-se 400  $\mu$ L de extrato. Os resultados obtidos com o material foliar não apresentaram diferenças na atividade enzimática entre a utilização do tampão original e do tampão sem o aminoácido (Fig. 20). Ao contrário, as raízes exibiram uma atividade 40% maior quando a cisteína foi retirada do meio de extração (Fig. 21).

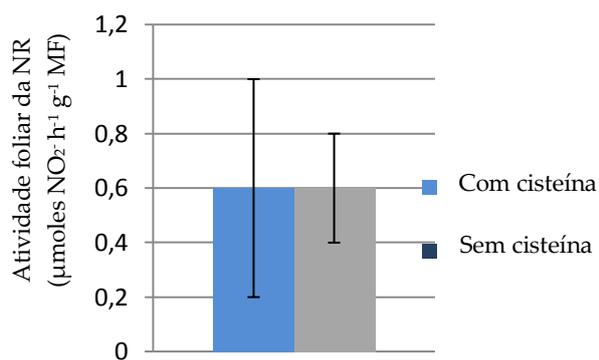


Fig. 20: Atividade *in vitro* da NR medida nas folhas com a utilização do tampão original e do tampão sem cisteína.  $P < 0,05$ . Teste T: não foi possível verificar diferença significativa entre as

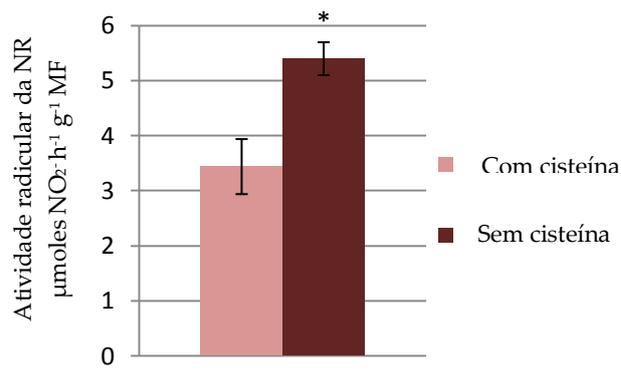


Fig. 21: Atividade *in vitro* da NR medida nas raízes com a utilização do tampão padrão e do tampão sem cisteína.  $P < 0,05$ . Teste T: foi possível verificar diferença significativa entre as atividades medidas.

Após definir as alterações no tampão de extração, algumas modificações no tampão de reação foram feitas e estão apresentadas abaixo (Tabela 4). Além disso, estabeleceu-se um tempo de pré-incubação de 5 minutos antes da adição do NADH, que inicia a reação.

Tabela 4: Alterações testadas na composição do tampão de reação.

Composição do tampão de reação original	Alterações testadas para o tampão de reação
Hepes-KOH (0,65 M) (pH 7.0)	Hepes-KOH (0,65 M) (pH 7.0)
KNO <sub>3</sub> (10 mM)	FAD (10 µM)
NADH (0,25 mM)	DTT (1 mM)
	EDTA (15 mM)
	KNO <sub>3</sub> (10 mM)
	NADH (0,25 mM)

Tendo em vista que houve um incremento considerável na atividade da NR após as modificações no tampão de reação, um último teste foi realizado com uma alteração na concentração de leupeptina no tampão de extração. No protocolo original a concentração de leupeptina no tampão de extração foi de 10 µM. Além desta

concentração, 50  $\mu\text{M}$  e 150  $\mu\text{M}$  do protetor foram utilizados novamente, simultaneamente à alteração no meio de reação. Os resultados obtidos para folhas e raízes estão abaixo (Figuras 22 e 23):

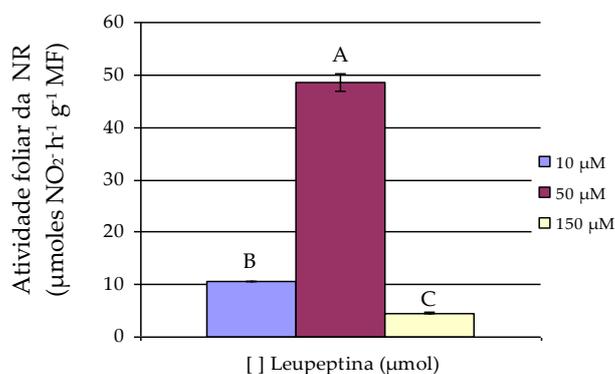


Fig 22: Atividade *in vitro* da NR nas folhas de abacaxizeiro com variações na concentração de leupeptina em conjunto com a adição de DTT, EDTA e FAD ao meio de reação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey,  $P < 0,05$ ).

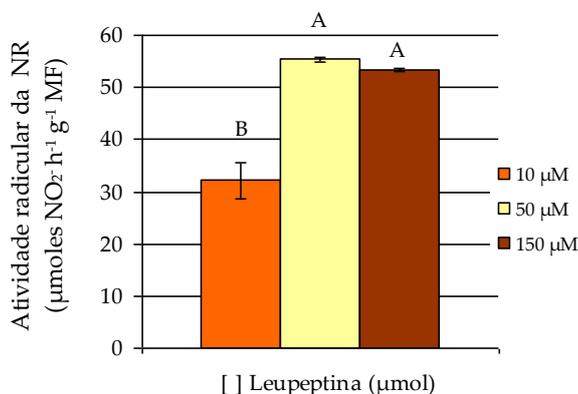


Fig 23: Atividade *in vitro* da NR nas raízes de abacaxizeiro com variações na concentração de leupeptina em conjunto com a adição de DTT, EDTA e FAD ao meio de reação. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey,  $P < 0,05$ ).

Observou-se que as alterações no tampão de reação atuaram positivamente tanto em folhas como em raízes. As atividades medidas foram superiores a todas anteriormente detectadas nos primeiros testes, inclusive nos primeiros ensaios com 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de leupeptina (Fig. 19).

Tanto para as folhas quanto para as raízes, confirmou-se que a melhor concentração de leupeptina na extração é de 50  $\mu\text{M}$ . A atividade medida com 150  $\mu\text{M}$

do protetor na extração foi prejudicial às folhas e não apresentou diferenças comparando-se com as raízes, nas quais utilizou-se 50  $\mu\text{M}$  de leupeptina .

Com o objetivo de oferecer mais estabilidade à enzima durante o processo, foram realizados novamente testes com o tampão de extração na presença de leupeptina (50  $\mu\text{M}$ ) e acrescentando-se glicerol (10%). As atividades foram medidas após 30 e 60 minutos de reação. O tampão de reação continha as alterações determinadas na tabela 4.

Nas folhas o tempo de reação de 30 minutos mostrou-se insuficiente, sem registro de atividade da enzima. Após 60 minutos de reação, verificou-se atividade, porém, esta foi cerca de 5 vezes inferior àquelas obtidas na condição apresentada na fig. 22, sem a utilização do glicerol e após 30 minutos de reação (Fig 24).

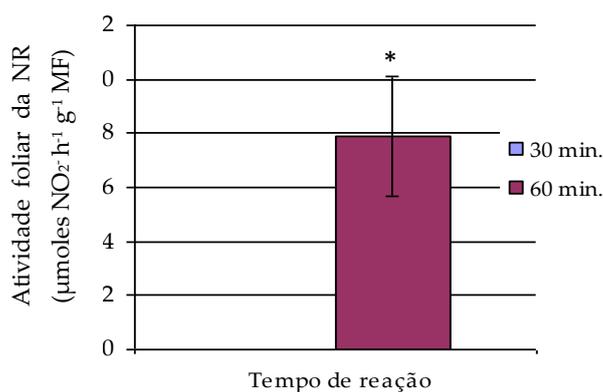


Fig. 24: Atividade *in vitro* da NR medida nas folhas com a adição de glicerol ao meio de extração e após 30 ou 60 minutos de reação. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre as amostras.

Nas raízes observou-se que após 30 minutos de reação com o extrato em tampão com glicerol a atividade medida foi semelhante à verificada na reação em que o extrato não continha o composto. Quando a reação ocorreu por 60 minutos, verificou-se o dobro da atividade (Fig. 25).

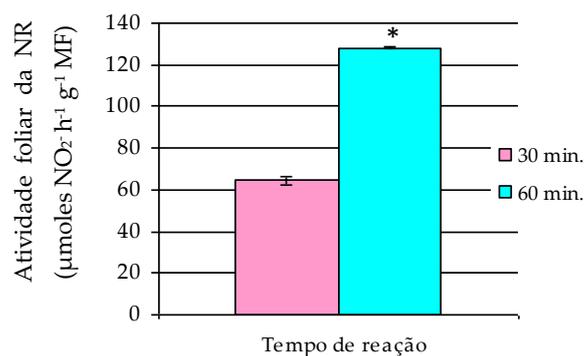


Fig. 25: Atividade *in vitro* da NR medida nas raízes com a adição de glicerol ao meio de extração e após 30 ou 60 minutos de reação. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre as amostras.

Após determinar a melhor composição dos tampões de extração e de reação, fez-se necessário realizar alguns testes quanto à forma de parar a reação ao final do ensaio enzimático. Três testes foram realizados: 1º) acrescentando-se à reação 200 µL de acetato de zinco (0,5 M); 2º) utilizando-se 125 µL de etanol (95%) seguido de 125 µL de acetato de zinco (0,1 M) e submetendo as amostras ao congelamento e, 3º) acrescentando-se 125 µL de acetato de zinco (0,5 M). Os melhores resultados foram verificados quando se utilizaram-se 125 µL de acetato de zinco, seguindo-se da centrifugação a 13.000 g por 10 minutos.

Quanto à determinação do nitrito formado na reação, foram testadas as seguintes modificações: 0,7 mL de sulfanilamida (1% em HCl 3M) e 0,7 mL de n-naftil-etileno-diamino (0,02%) em 1 mL de reação ou 0,3 mL de sulfanilamida (1% em HCl 3M) e 0,3 mL de n-naftil-etileno-diamino (0,02%) em 900 µL de reação. A segunda alteração mostrou-se satisfatória para proceder à leitura do nitrito formado.

Uma vez que os resultados obtidos com os ensaios *in vitro* foram superiores aos outros relatos da literatura como, por exemplo, para espinafre (ROCKEL *et al.*, 2002) e milho (LONG & OAKS, 1990), considerou-se definido o protocolo para *Ananas comosus*. A descrição final encontra-se registrada a seguir:

***Método padronizado para medir a atividade in vitro da nitrato redutase (NR) em abacaxizeiro.***

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 e 1 g/ 4 mL, respectivamente. Este tampão foi preparado minutos antes de iniciar a coleta e mantido em gelo. Sua composição era: Tampão Tris-HCl (pH 8.5) (25mM), EDTA (1 M), DTT (1 mM), BSA (1 %), FAD (20 µM) e Leupeptina (50 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 400 µL do extrato foram colocadas em microtubos que continham o tampão de reação para um volume final de 1 mL. Esse tampão foi constituído por Hepes-KOH (pH 7.0) (0,65 M), FAD (10 µM), DTT (1 mM), EDTA (15 mM) e KNO<sub>3</sub> (10 mM). Após uma pré-incubação de 5 minutos a reação foi iniciada com a adição de NADH (0,25 mM) para as folhas e NADH/NADPH (0,25 mM) para as raízes. Tanto o NADH quanto o NADPH foram preparados na hora e diluídos em tampão fosfato-potássio (KPO<sub>4</sub>) pH 7,0 (0,1 M). A incubação ocorreu por 30 minutos a 28°C. Para parar a reação acrescentou-se 125 µL de acetato de zinco (0,1M) e os tubos de reação foram transferidos imediatamente para o gelo. Em seguida foram centrifugados a 13.000g por 10 min à temperatura ambiente. Para a determinação colorimétrica do nitrito formado, 900 µL da reação concluída foram retirados cuidadosamente com micropipeta, sem permitir contato com o precipitado formado, seguindo-se do acréscimo de 0,3 mL de sulfanilamida (1% em HCl 3M) e 0,3 mL de n-naftil-etileno-diamino (0,02%). Após incubação no escuro por 20 minutos a leitura foi feita no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os principais passos para a dosagem *in vitro* da NR estão esquematizados na Fig. 26.

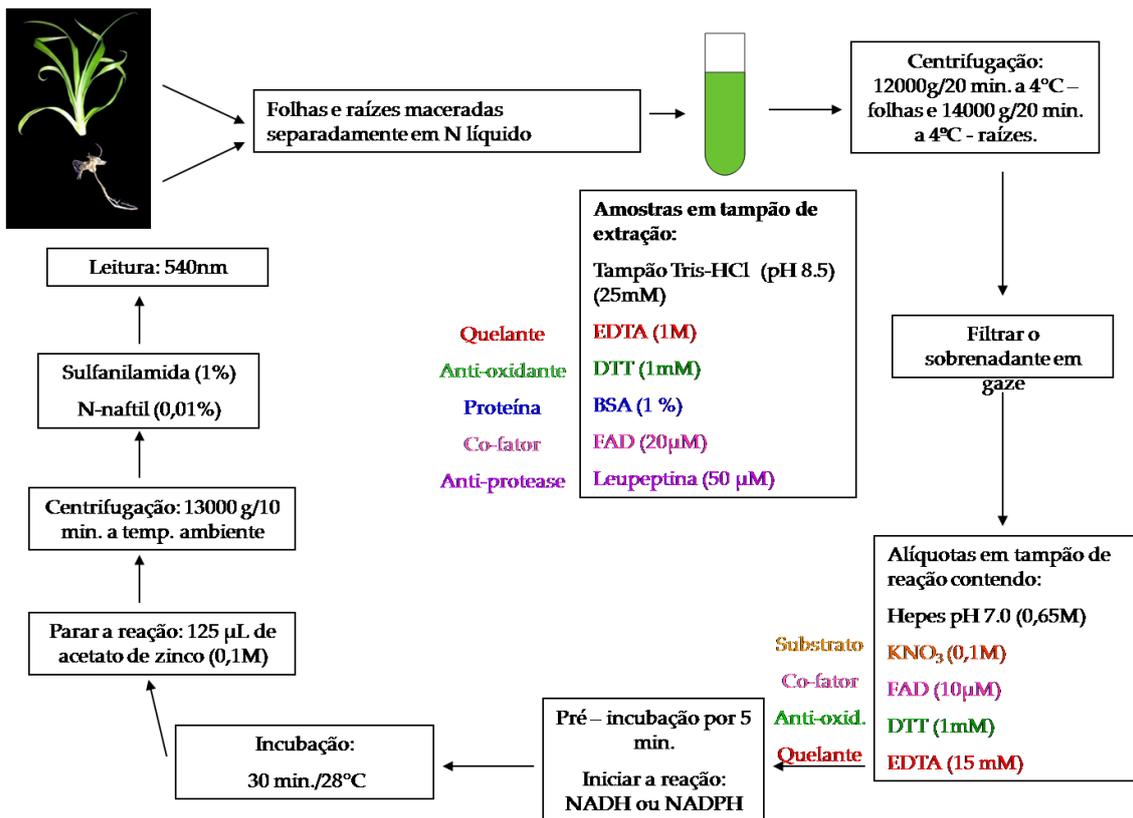


Fig. 26: Esquema mostrando os principais passos do método de dosagem *in vitro* da atividade da NR adaptado para abacaxizeiro.

### Análise da atividade *in vitro* da NR com a utilização de NADH, NADPH ou succinato como doadores de elétrons.

Com o objetivo de verificar a existência de uma possível NR que utilizaria succinato como doador de elétrons (a de membrana plasmática), experimentos foram realizados após as plantas serem expostas por 30 dias ao tratamento termoperiódico, necessário para o incremento da NR radicular. Os ensaios foram realizados no período noturno, com as plantas expostas à temperatura de 15°C (termoperíodo) ou 28°C (controle). Os resultados estão mostrados na fig. 27.

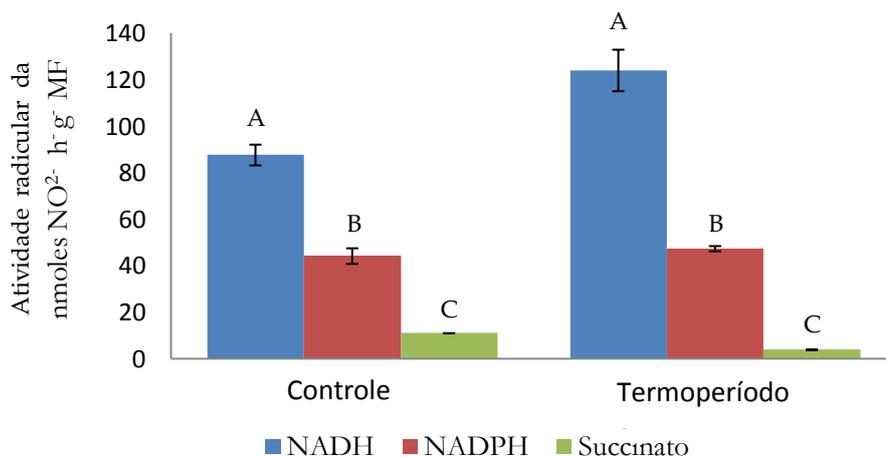


Fig. 27: Atividade *in vitro* da NR medida nas raízes com a utilização de NADH, NADPH ou succinato como doadores de elétrons. Letras diferentes representam resultados estatisticamente diferentes (teste Tukey,  $P < 0,05$ ).

Os resultados obtidos com esse experimento reforçaram a hipótese de que poderia existir uma isoforma da NR que utilizaria o succinato como doador de elétrons, pois foram encontradas atividades da NR, apesar de baixas, comparativamente aos outros doadores. No entanto, observa-se maior atividade com NADH, tanto para as raízes tratadas com termoperíodo quanto para as do controle.

### **Seleção do método de fracionamento celular para abacaxizeiro**

Conforme citado em “Material e Métodos” (item 5.1), três métodos foram testados. Os resultados positivos foram obtidos com os métodos de fracionamento por gradiente de sacarose e por partição com sistema de duas fases – Dextran T-500 e PEG 3350.

#### ***Fracionamento celular por gradiente de sacarose***

Os primeiros resultados de obtenção das frações enriquecidas de membranas plasmáticas de folhas ou raízes foram obtidos com o método original descrito por GALLANGER and LEONARD (1982) (figuras 28A e 28B).

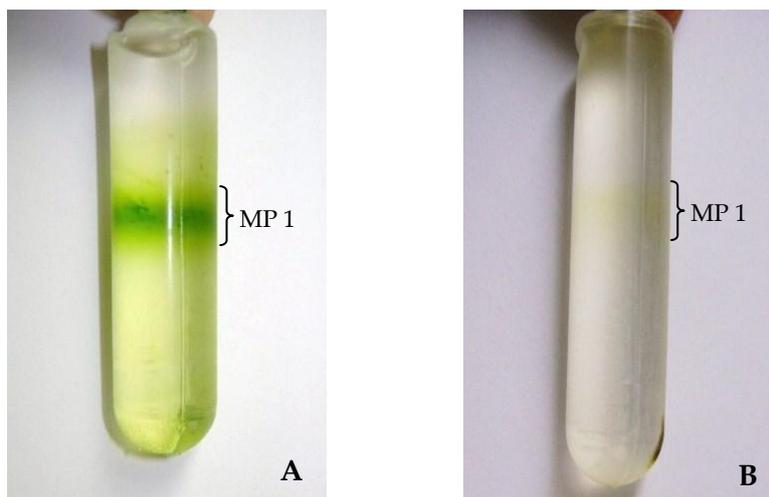


Fig. 28: Fração de membranas plasmáticas obtidas a partir de folhas (A) ou raízes (B) de abacaxizeiro em gradiente de sacarose.

Na figura 28 A foi possível observar uma dispersão de material foliar no gradiente (acima e abaixo da fração). Na tentativa de otimizar a separação, utilizou-se uma variação na combinação de gradientes de sacarose. Os experimentos foram feitos com folhas e estas foram submetidas a gradientes de 45% / 35% (como proposto originalmente) ou 45% / 25%.

Quando o gradiente foi montado com 45% / 35% de sacarose os resultados foram semelhantes aos apresentados na fig. 28 A. Porém, quando utilizou-se uma variação ao método original, formando o gradiente com 45% / 25% observou-se o aparecimento de duas frações, provavelmente de membranas plasmáticas. Uma principal (MP 1), semelhante àquela da figura 28 A e uma outra secundária que localizou-se acima da fração principal (MP 2), não sendo possível visualizar na foto.

Para verificar a pureza dessas frações, utilizou-se o ensaio *in vitro* da MDH. Os resultados apresentam uma alta atividade dessa enzima nas frações de citoplasma, como deveria ocorrer, tendo em vista que é uma enzima de ocorrência exclusiva no citoplasma. Para as frações de membranas plasmáticas a atividade da MDH foi quase ausente, comprovando, assim, a exclusão de citoplasma na fração de membranas (fig. 29). No entanto, com esse método, não foi possível avaliar a atividade da NR nas frações de membranas plasmáticas.

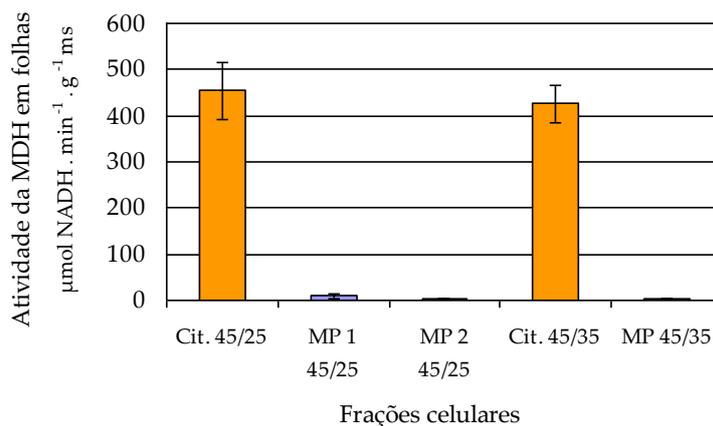


Fig. 29: Análise do grau da pureza das frações de citoplasma e membranas plasmáticas através da atividade *in vitro* da MDH. Cit. 45/25 e Cit. 45/35 = Frações de citoplasma provenientes de experimentos com gradientes de sacarose com 45% / 25% (m/v) ou 45% / 35% (m/v); MP 1 e MP = Frações de membranas formadas na interface dos gradientes de sacarose, como na figura 21; MP 2 = Fração de membrana formada acima de MP 1 (dentro da fração de 25% de sacarose).

#### ***Fracionamento por partição de fases com múltiplas lavagens.***

No início dos trabalhos de padronização, testou-se o método de partição de fases com múltiplas lavagens de BRUSCA and RADOLF (1994), mas nenhum resultado positivo foi verificado.

#### ***Fracionamento por partição com sistema de duas fases – Dextran T-500 e PEG 3350.***

Esse método, o qual foi baseado em LARSON *et al.* (1994), mostrou-se mais apropriado. Os primeiros registros da atividade *in vitro* da NR em frações de membranas de abacaxizeiro foram detectados com esse protocolo.

#### ***Atividade in vitro da NR foliar ou radicular de abacaxizeiro nas diferentes frações.***

Para os experimentos, plantas com 60 dias de idade foram transferidas para câmaras do tipo BOD, onde permaneceram por 30 dias sob temperatura constante (controle) ou sob termoperíodo. Após o tratamento termoperiódico, os experimentos foram realizados durante o período noturno, quando a atividade da NR nas raízes de

abacaxizeiro havia demonstrado um incremento em sua atividade (resultados prévios). A avaliação do grau de pureza das frações extraídas das folhas e das raízes está mostrada nas figuras 30 e 31, e foi feita momentos antes dos ensaios da NR propriamente ditos.

Nas folhas foi possível observar que a atividade da MDH nas frações de membranas plasmáticas foi baixa, comparativamente às encontradas para as de citoplasma (fig. 30). O grau de pureza nessas frações celulares foi de 87% para as plantas controle e 94% para as plantas provenientes do tratamento termoperiódico. Isso significa que o método foi eficiente.

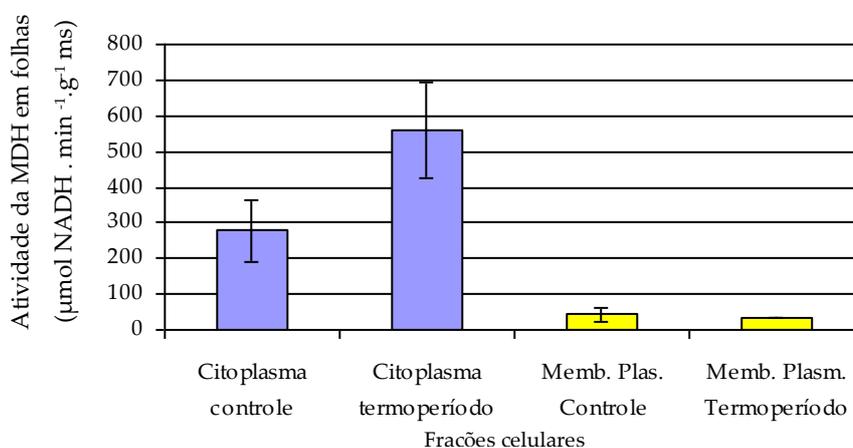


Fig. 30: Análise do grau da pureza das frações de citoplasma e membranas plasmáticas de folhas de abacaxizeiro medida por meio da atividade *in vitro* da MDH. As plantas permaneceram por 30 dias sob termoperíodo (28°C dia / 15°C noite) ou sob temperatura constante de 28°C (controle). Os ensaios enzimáticos foram realizados no período noturno.

A fig. 31 mostra que nas frações celulares extraídas das raízes a aplicação do método de fracionamento também foi capaz de isolar frações celulares altamente purificadas. O grau de pureza nas frações extraídas das plantas controle foram superiores a 90% e nas plantas provenientes do tratamento termoperiódico ficou em torno de 85%.

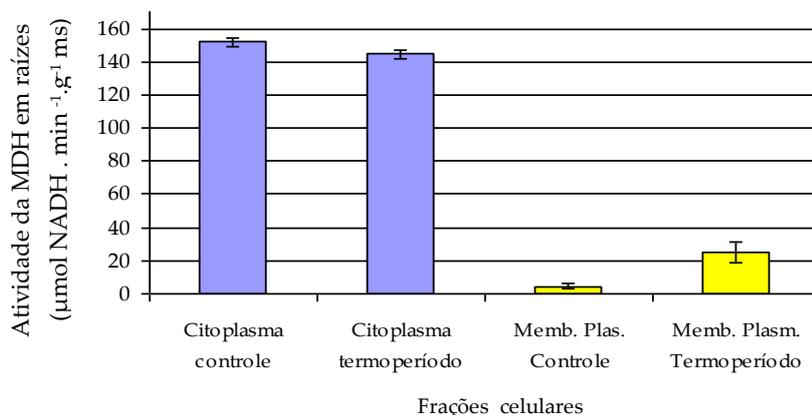


Fig. 31: Análise do grau da pureza das frações de citoplasma e membranas plasmáticas de raízes de abacaxizeiro obtidas por meio da atividade *in vitro* da MDH. As plantas permaneceram por 30 dias sob termoperíodo (28°C dia / 15°C noite) ou sob temperatura constante.

Observou-se que a atividade específica da NR na fração de membranas plasmáticas das raízes tratadas com o termoperíodo foi cerca de 22% maior que a obtida com as plantas controle (fig. 32). Ao analisar os resultados obtidos para a atividade da NR nas frações de citoplasma, constatou-se que não houve diferença entre as atividades obtidas nas plantas controle e nas plantas que estiveram em termoperíodo (fig. 33). Sendo assim, o incremento na atividade noturna da NR nas raízes quando as plantas são submetidas por 30 dias ao termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite) foi causado, possivelmente, por uma forma da enzima ligada às membranas plasmáticas.

Não houve registros de atividade da NR nas frações de membrana plasmática extraídas das folhas.

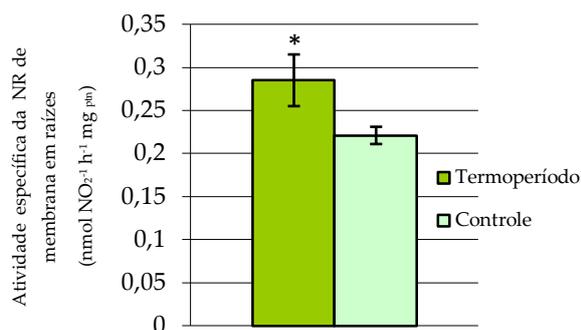


Fig. 32: Análise *in vitro* da atividade específica da NR em frações de membranas plasmáticas de raízes de abacaxizeiro submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de membrana.

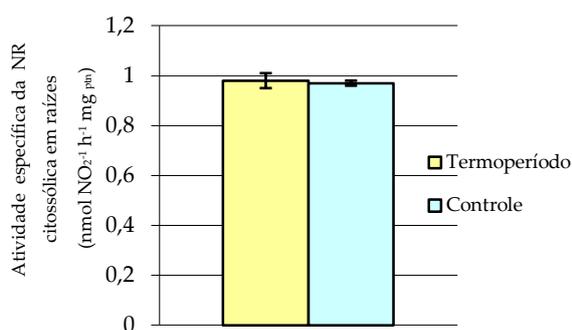


Fig. 33: Análise *in vitro* da atividade da NR em frações citossólicas de raízes de abacaxizeiro submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de citoplasma.

Para os experimentos seguintes foram utilizadas apenas raízes. As plantas foram cultivadas da mesma forma que no experimento descrito anteriormente. Após o tratamento os ensaios foram realizados no período noturno e o grau de pureza das frações foi avaliado através do ensaio da MDH.

A pureza avaliada para as frações de membranas extraídas das plantas que estiveram sob o tratamento termoperiódico foi de 98% e para as frações extraídas das plantas controle constatou-se uma pureza de 94% (fig. 34).

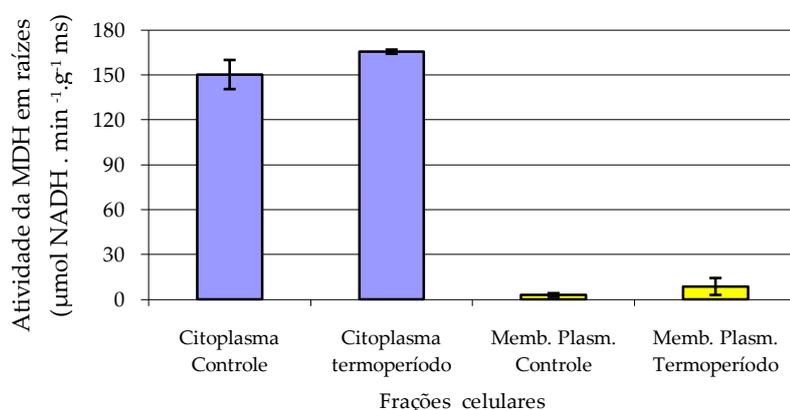


Fig. 34: Análise do grau da pureza das frações de citoplasma e membranas plasmáticas de raízes de abacaxizeiro obtidas por meio da atividade *in vitro* da MDH. As plantas permaneceram por 30 dias sob termoperíodo (28°C dia / 15°C noite) ou sob temperatura constante.

Os experimentos posteriores buscaram verificar a presença das diferentes formas da NR nas frações de membranas e de citoplasma nas raízes de abacaxizeiro. Nas frações citoplasmáticas, o NADH foi utilizado para ativar a isoforma da NR que apresenta especificidade por este doador de elétrons, além da NR biespecífica (que pode utilizar tanto o NADH quanto o NADPH como redutores. Nas frações de membranas plasmáticas a atividade da NR foi verificada utilizando o NADH, o NADPH e o succinato como doadores de elétrons. O succinato foi utilizado para ativar a NR que encontra-se ligada à membrana plasmática por uma âncora GPI. Além disso, foi oferecido  $\text{NO}_3^-$  às plantas *in vitro* dois dias antes dos experimentos.

Nas frações de membranas plasmáticas, quando os ensaios foram realizados na presença de NADH e de NADPH como doadores de elétrons, verificou-se que as atividades medidas nas plantas que passaram pelo tratamento termoperiódico foram significativamente maiores do que as registradas nas plantas controle (figs. 35 e 36). Os resultados mostraram que, nas células radiculares do abacaxizeiro, a NR pode reduzir o nitrato utilizando os dois redutores.

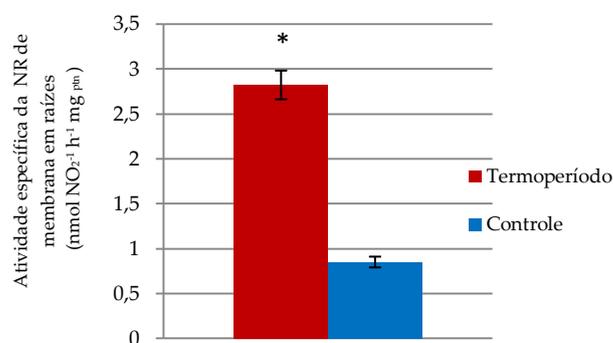


Fig. 35: Atividade específica da NR *in vitro* medida em frações de membranas plasmáticas de raízes de abacaxizeiro utilizando-se NADH com doador de elétrons. As plantas foram submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T  $P < 0,05$ ; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de membrana.

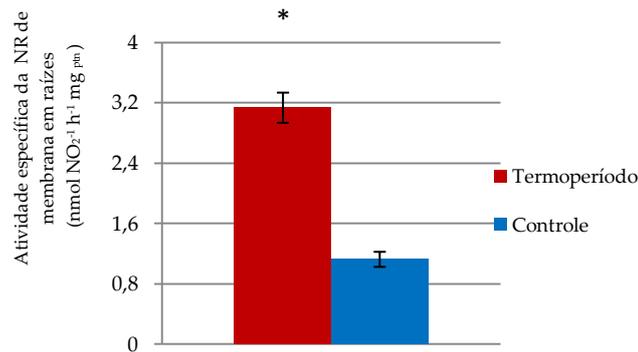


Fig. 36: Atividade específica da NR *in vitro* em analisada frações de membranas plasmáticas de raízes de abacaxizeiro utilizando-se NADPH com doador de elétrons. As plantas foram submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de membrana.

Quando o succinato foi empregado para ativar a NR, observou-se que a atividade foi dobrada na fração de membranas extraídas das plantas que estiveram em termoperíodo (fig. 37). Assim sendo, considera-se que a isoforma da NR ligada à membrana pela âncora glicosídica está presente nas raízes do abacaxizeiro e esta foi ativada pela baixa temperatura noturna.

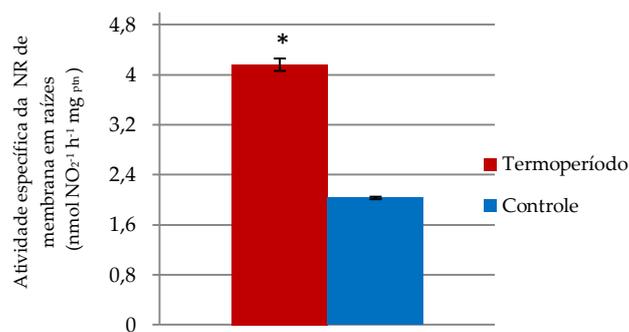


Fig. 37: Análise da atividade específica da NR *in vitro* em frações de membranas plasmáticas de raízes de abacaxizeiro utilizando-se succinato com doador de elétrons. As plantas foram submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de membrana.

Provavelmente, mais de uma forma da NRMP está presente nas células das raízes de abacaxizeiro. Há relatos na literatura de uma isoforma, que estaria integralmente embebida na membrana plasmática e reduziria o nitrato utilizando NADH ou NADPH como doadores de elétrons. Porém, não foi descrita ainda, para abacaxizeiro, uma NRMP ligada pela âncora glicosídica (GPI) que utilizaria NADPH como poder redutor.

Quanto às atividades verificadas nas frações de citoplasma, quando o NADH foi utilizado como redutor, não foi possível observar diferenças entre as atividades medidas nas plantas que passaram pelo tratamento termoperiódico, comparando-se com os registros de atividades obtidos para as plantas que permaneceram em temperatura constante (fig. 38). Esse resultado expressou, em conjunto, as atividades da NRc específica, que utiliza apenas NADH como doador de elétrons, somadas às da NRc biespecífica, que pode reduzir nitrato tanto na presença de NADH quanto na de NADPH. Para ambas, a baixa temperatura não influenciou positivamente suas atividades.

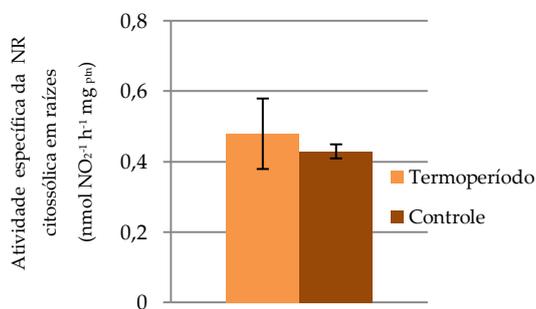


Fig. 38: Análise *in vitro* da atividade da NR com NADH em frações citossólicas de raízes de abacaxizeiro submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de citoplasma.

Analisando-se os resultados obtidos quando o NADPH foi oferecido como doador de elétrons, com o objetivo de ativar apenas a NRc biespecífica, foi possível observar que a atividade da NR foi maior nas plantas controle, em comparação com as plantas que foram submetidas ao tratamento termoperiódico (fig. 39). Porém, comparando-se com os resultados mostrados na fig. 39, quando o NADH foi usado, é

possível verificar atividade 12 vezes menor nas plantas tratadas com o termoperíodo e 8 vezes menor nas plantas controle.

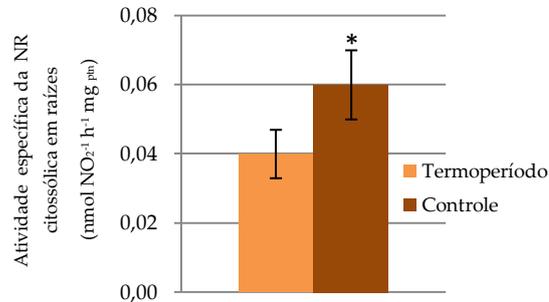


Fig. 39: Análise *in vitro* da atividade da NR com NADPH em frações citossólicas de raízes de abacaxizeiro submetidas ao tratamento termoperiódico (28°C dia / 15°C noite) ou temperatura constante de 28°C (controle) por 30 dias. Teste T P < 0,05; representa diferença significativa entre a condição controle e o tratamento com termoperíodo. A atividade da NR foi expressa em proteínas totais de citoplasma.

Em resumo, comparando-se os resultados obtidos para as frações citossólicas (figs. 38 e 39) com as frações de membranas plasmáticas (figs. 35, 36 e 37) observou-se que o incremento na atividade da NR *in vivo*, que ocorreu nas raízes das plantas submetidas ao termoperíodo, foi causado pela ativação das formas da NRMP e não pela atividade das isoformas da NRc.

## DISCUSSÃO

As enzimas que assimilam o nitrogênio são reguladas em nível transcricional e pós-traducional por vários fatores endógenos e exógenos como nitrato, CO<sub>2</sub>, luz, hormônios, temperatura, carbono e metabólitos de nitrogênio (SIVASANKAR and OAKS, 2006). A concentração de nitrato e a luz desempenham os principais papéis na regulação da assimilação do nitrato. A absorção desse íon varia continuamente, atingindo picos durante o dia e valores muito baixos durante a noite. Tanto a absorção quanto a assimilação do nitrato estão diretamente relacionadas com a luz, mas os mecanismos ainda não estão bem esclarecidos (ALI *et al.*, 2007). Em eucariontes autótrofos, a NR é conhecida, principalmente, como uma enzima citossólica (TISCHNER, 2000). Ela atua juntamente com a nitrito redutase catalisando a primeira etapa da redução do nitrato, que ocorre em dois passos sucessivos. Uma vez dentro da célula o nitrato precisa ser reduzido a amônio. A NR, no citossol, reduz o nitrato a nitrito e, em seguida, este é reduzido, principalmente no cloroplasto (folhas), mas também nos plastídeos (raízes) em amônio (ALI *et al.*, 2007; BUCHANAN, 2000). Acredita-se que essa isoforma citossólica esteja presente nas folhas de abacaxizeiro. Isoformas associadas à membrana plasmática, no entanto, apresentam modos diferentes de ativação já constatados em outras plantas. Dentre eles pode-se citar a temperatura (YANEVA *et al.*, 1999; YANEVA *et al.*, 2001; DE MARCO *et al.* 1994).

Os ensaios *in vivo* realizados com abacaxizeiro ocorreram no período de ausência de luz, portanto era esperado que as atividades medidas nas folhas fossem realmente baixas. Esses resultados foram obtidos tanto nas plantas que foram submetidas ao tratamento termoperiódico quanto nas plantas do controle, independentemente de suas idades no momento do ensaio (figs. 10 e 12). Nos dois experimentais verificou-se claramente que a baixa temperatura no período noturno não influenciou a atividade da NR nas folhas de abacaxizeiro.

Nos primeiros experimentos, as plantas com 90 dias de idade foram transferidas para o tratamento termoperiódico ou para a temperatura constante, ocorrendo uma queda pronunciada na atividade da NR nas raízes das plantas que estiveram em ambos os tratamentos pelos períodos de 50 e 60 dias (fig. 11). Em um

primeiro momento, levantou-se a hipótese de que essa queda na atividade poderia ser devida ao esgotamento do nitrato do meio. No entanto, uma solução de nitrato era preparada com a mesma concentração do íon do meio de cultura, porém sem a adição de amônio. As plantas recebiam 3 mL da solução 7 dias antes do ensaio. O amônio também pode ser absorvido pelas raízes, como o nitrato. Porém, uma vez dentro das células, será diretamente assimilado em aminoácidos pela ação da glutamina sintetase (GS) e da glutamato desidrogenase (GOGAT) (BUCHANAN, 2000). A glutamina produzida é um forte inibidor da atividade da NR, por essa razão não foi utilizado o amônio como fonte de nitrogênio, pois o intuito era ativar a NR.

Sabe-se que as bromeliáceas possuem um metabolismo muito rápido, embora a maioria apresente um crescimento extremamente lento. Propôs-se, então, que a fonte de N deveria ser acrescentada às plantas com 2 dias de antecedência aos ensaios. Para a nossa surpresa, os resultados não se alteraram, isto é, obteve-se a mesma redução na atividade da NR das raízes após 50 e 60 dias de tratamento. Levantou-se uma segunda hipótese: outros nutrientes poderiam estar indisponíveis após 50 ou 60 dias de cultivo no mesmo meio de cultura e isso estaria afetando a resposta das raízes. Após esse período de cultivo constatou-se que o meio de cultura apresentava-se liquefeito e com pH ao redor de 3. Nessas condições, vários nutrientes não podem ser absorvidos pelas raízes (LUCAS and DAVIS, 1961). Dentre eles destacam-se o ferro, o molibdênio e o cobre. O ferro (na forma do grupo heme-Fe) e o molibdênio (na forma do complexo MoCo) são cofatores da NR, formando um centro redox juntamente com o FAD, que facilita a transferência de elétrons para a redução do nitrato (BUCHANAN, 2000; KAISER *et al.*, 2001). O cobre está associado com enzimas envolvidas em reações redox (TAIZ e ZEIGER, 2007). Sendo assim, sua indisponibilidade pode, ainda que indiretamente, influenciar de forma prejudicial a assimilação do nitrato. É provável que esse fator tenha causado a queda na atividade da NR nas plantas com 50 e 60 dias de tratamento termoperiódico ou temperatura constante.

Outra hipótese levou em conta estar trabalhando com plantas de idades variadas, podendo ser essa a causa da queda na atividade da NR. Novos experimentos foram, então, realizados. As plantas permaneceram sob o tratamento pelos mesmos períodos (1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 dias e 60 dias), seguindo-se o ensaio *in vivo* da NR

durante o período noturno. No entanto, a transferência para as câmaras de cultivo ocorreu em estágios de desenvolvimento diferentes, de forma que ao final dos tratamentos todas as plantas estivessem com 90 dias de idade. Com esse novo procedimento experimental observou-se que houve um incremento significativo nas atividades da NR radicular quando o tratamento termoperiódico foi de 30, 50 e 60 dias (fig. 13). Provavelmente a idade das plantas no momento da análise da NR estava influenciando a resposta das raízes à temperatura noturna mais baixa. Como no primeiro experimental as plantas apresentaram-se em estágios de desenvolvimento variados (tabela 1) no momento dos ensaios enzimáticos, características do próprio metabolismo naquela ocasião podem ter influenciado para que a resposta ao estímulo da baixa temperatura noturna não ocorresse. Portanto, para os ensaios subsequentes da NR *in vitro* foram sempre utilizadas plantas com a mesma idade.

Quanto à padronização do método de ensaio *in vitro* da NR, ela foi o primeiro passo necessário para que o objetivo de verificar a existência da NRMP nas raízes de abacaxizeiro fosse alcançado. A hipótese que aventou a existência dessa forma da NR surgiu em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal quando foi detectado inicialmente o incremento na atividade da NR nas raízes das plantas que foram submetidas à baixa temperatura noturna (NIEVOLA *et al.*, 2002). Em um primeiro momento, acreditava-se que os resultados eram devidos ao fato daquelas plantas terem mudado seu metabolismo fotossintético de C<sub>3</sub> para CAM e a temperatura era um deles (HAAG-KERWER *et al.*, 1992). Porém, em trabalhos posteriores realizados no laboratório por FRESCHI *et al.* (2009), observaram a indução do metabolismo CAM em abacaxizeiro através do estresse hídrico causado pela adição de PEG ao meio de cultura. Após realizar as dosagens da atividade da NR durante o ciclo diurno, concluiu-se que os resultados eram distintos. Não houve o incremento na atividade noturna da NR nas plantas que desenvolveram o metabolismo CAM. Recentemente, uma pesquisa de iniciação científica realizada por TIEMI (2009), mostrou ser possível a indução do metabolismo CAM de outra forma: as plantas de abacaxizeiro foram submetidas ao estresse luminoso (250  $\mu$ moles de luz) e após ensaios *in vivo* da NR, que buscaram estudar o ciclo diurno da enzima, confirmou-se que o metabolismo CAM em nada influencia o aumento da atividade da NR nas raízes de abacaxizeiro.

Durante os testes para a padronização do método de ensaio *in vitro*, três protocolos foram avaliados. Após serem detectadas atividades utilizando o protocolo proposto por LONG & OAKS (1990) para plantas de milho, algumas modificações foram introduzidas. Ao se comparar a atividade da NR medida nos ensaios *in vitro* com aquela verificada nos ensaios *in vivo* (que eram bem mais expressivas), levantou-se a hipótese de que esta poderia ser otimizada com o aumento da concentração do extrato na reação. A alteração no volume de extrato de 200  $\mu\text{L}$  para 400  $\mu\text{L}$  ou 600  $\mu\text{L}$ , acrescido na reação cujo volume final era de 1,7 mL foram as primeiras a serem testadas. Sabe-se que o protocolo inicial foi desenvolvido para um material vegetal distinto do abacaxizeiro (no caso, plantas de milho). Portanto, não havia conhecimento sobre a quantidade de enzimas existentes no extrato para comparar com o abacaxizeiro. Logo, era possível que com uma quantidade maior de extrato no meio de reação resultasse uma maior atividade.

Como essa hipótese não foi confirmada (figs. 14, 15, 16, 17 e 18), propôs-se que o meio de extração poderia não ser o mais apropriado para manter a atividade da NR, protegendo-a contra degradação por diversos fatores, como por exemplo, a ação de proteases. Por tratar-se de um ensaio *in vitro*, no qual os tecidos são rompidos e as enzimas são retiradas do seu compartimento celular, ficando as enzimas totalmente expostas a ação de agentes físicos e químicos, fez-se necessário disponibilizar no tampão de reação, protetores, substrato para a enzima e o poder redutor. Esses reagentes são utilizados numa faixa de concentração com pequena variação de espécie para espécie. Dessa forma, testou-se a adição de novos protetores ou novas concentrações dos já utilizados com o intuito de oferecer um meio de extração que oferecesse maior estabilidade para a NR. No entanto, os protetores não contribuíram positivamente para o aumento na atividade da NR (fig. 19), embora todas as alterações tenham sido feitas cuidadosamente e após o levantamento dos dados na literatura acerca da importância do emprego de agentes protetores (anexo 1).

Naquele momento, entretanto, muitas outras adequações precisavam ser feitas. Após vários testes observou-se que os principais problemas foram causados pelo próprio manuseio do material e de alguns reagentes. Os cuidados necessários para a

conservação da NR durante o ensaio *in vitro* devem ser muitos. O manuseio do material vegetal no momento da coleta, que compreende desde a separação de folhas e raízes até o início da primeira centrifugação não deve exceder 40 minutos. Após a maceração em nitrogênio líquido percebeu-se que a melhor forma de acrescentar o tampão de extração consistia em verter o pó ainda congelado com nitrogênio líquido nos próprios tubos de centrífuga que seriam utilizados, sendo indispensável que os mesmos estivessem gelados. O material deveria ser cuidadosamente conservado nessas condições (congelado e no gelo) até o acréscimo do tampão de extração nos tubos com as amostras. Aos poucos, com um bastão de vidro, o tampão deveria ser misturado com o macerado, sempre no gelo. O material deveria ser levado para a centrifugação semi-congelado, formando uma massa, o mais homogênea possível, do tampão com a amostra.

Outro ponto importante a destacar é que a NR é uma enzima altamente fotossensível. A maceração deve ser feita em ambiente com iluminação reduzida e todos os recipientes devem ser cobertos com papel alumínio, como por exemplo, os tubos de centrífuga onde são colocadas as amostras após a maceração. Esses cuidados tornaram-se indispensáveis para a manutenção da atividade da NR até o momento da reação.

Quanto ao preparo dos reagentes, verificou-se várias particularidades: o DTT, o FAD e o  $\text{KNO}_3$  podem ser alíquotados e guardados no freezer com antecedência e, inclusive, não foram registradas diferenças quando utilizaram-se alíquotas novas ou alíquotas que já haviam sido descongeladas. O EDTA pode ser preparado e guardado na geladeira por tempo indeterminado, assim como os tampões Tris-HCl e HEPES. O NADH e o NADPH devem ser preparados na hora e em tampão fosfato. Observaram-se diferenças nítidas quando esses reagentes foram preparados em água, alíquotados e congelados.

Durante essas adequações, nos testes que foram feitos aumentando o volume de extrato de 400  $\mu\text{L}$  para 600  $\mu\text{L}$  (figs. 17 e 18), já citados anteriormente, foi possível detectar atividades da NR cerca de 40% menores nas raízes (que utilizaram NADH como doador de elétrons) do que aquelas mostradas na figura 15, também com NADH e com 200  $\mu\text{L}$  de extrato. Porém, a despeito das maiores atividades registradas nos

primeiros experimentos, observou-se um grande valor para os desvios-padrão dos primeiros experimentos e aqueles registrados nos experimentos seguintes. Assim, todos os cuidados listados acima devem ser adotados, para que os resultados obtidos sejam coerentes e confiáveis.

Tendo em vista que o protocolo de extração foi finalizado para abacaxizeiro, optou-se por fazer alterações no tampão de reação. Outros protocolos para a NR utilizam protetores e cofatores também no tampão de reação (KAISER, 1997). Os melhores resultados foram obtidos quando o tampão de reação foi acrescido desses reagentes específicos. A disponibilidade do FAD (co-fator da NR) parece ter contribuído para a manutenção das enzimas no meio de reação, as quais poderiam ser degradadas nesse último passo do ensaio enzimático. O EDTA, como é um quelante, captura metais como  $Mg^{2+}$ , que ativa proteínas cinases dependentes deste metal e que fosforilam a NR inativando-a ou ainda permitindo a ligação do complexo de proteínas 14-3-3, que marcam a NR para degradação (BUCHANAN, 2000).

Os experimentos seguintes, variando novamente a concentração de leupeptina e utilizando o glicerol foram realizados após comunicação pessoal com pesquisadores experientes nos ensaios da NR (Nievola, C. e Chow, F. F.). Como a leupeptina é um reagente altamente específico para o ensaio de enzimas como a NR, decidiu-se realizar novos testes, porém, seguindo orientações sobre os cuidados necessários com o preparo desse reagente. A leupeptina pode ser preparada em água, alíquotada e guardada no freezer. A estocagem deve, no entanto, ser feita na semana em que o reagente será utilizado e este não deve ser descongelado e congelado para uso posterior. Como foi observado nos resultados apresentados nas figuras 22 e 23, concluiu-se que esses procedimentos foram essenciais para a conservação das propriedades do reagente.

Quanto ao uso do glicerol, quando esse foi utilizado em concentrações entre 5% e 10%, aumentou a densidade da amostra, tornando mais lentas todas as reações no meio (informações retiradas do catálogo da Sigma-Aldrich). O glicerol é muito utilizado como um protetor, pois dificulta a ação das proteases sobre a enzima de interesse e, normalmente demanda um tempo de reação maior, pois como já foi citado, as reações em um meio com glicerol ocorrem em um espaço de tempo maior. Concluiu-

se, no entanto, que as propriedades desse regente não foram essenciais para a atividade da NR de abacaxizeiro.

Quanto à seleção do método de fracionamento celular mais adequado para o abacaxizeiro, durante as pesquisas bibliográficas constatou-se que no protocolo descrito por BRUSCA *et al.* (1994) os autores realizaram o fracionamento por partição de fases com múltiplas lavagens devido às propriedades dos detergentes, capazes de isolar proteínas de membrana. Os detergentes da série Triton X são não-iônicos e consistem de um grupo fenol hidrofóbico ligado a um grupo polioxietileno hidrofílico, que os classifica como não passíveis de desnaturação (HELENIUS AND SIMONS, 1975).

O Triton X-114 possui um baixo ponto de fusão (22° C) se comparado ao Triton X-100 (64° C). Bordier (1981) foi o primeiro a reconhecer que essa propriedade do Triton X-114 poderia ser explorada para o isolamento de proteínas de membrana hidrofílicas e integrais. Desde então, muitos artigos tem utilizado o método descrito por Bordier como base para isolar proteínas de membrana (PRYDE, 1986). Inclusive, existem registros de que as propriedades desse detergente possibilitam o isolamento de proteínas de membrana ligadas por uma âncora GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (BORDIER *et al.*, 1986; HERNANDEZ-MUNAIM *et al.*, 1991). Existem registros de uma isoforma da NR ancorada à membrana plasmática dessa maneira (STÖHR *et al.* 1995; KUNZE *et al.*, 1997; BÉRCZI & MOLLER, 2000).

Durante a execução desse método, as amostras de abacaxizeiro foram submetidas a incubações a 37 °C por 3 a 5 vezes. Após todas as observações feitas sobre a dificuldade de se manter a atividade da NR *in vitro*, fica claro que sob tais condições seria impossível conservar a atividade da enzima após esse procedimento.

STÖHR and ULRICH (1997) utilizaram o protocolo realizando a incubação em 15° C com o Triton X-114 pré-condensado segundo BORDIER (1981). Tomando como base esse relato, buscou-se realizar a extração nessa temperatura. No entanto, não foi possível verificar a formação da fração de detergente, o qual se forma por precipitação e onde deveriam estar as membranas. STÖHR e ULRICH realizaram a separação já nas frações de membranas isoladas com Dextran e PEG, seguindo o método de fracionamento descrito por LARSSON *et al.* (1994). O objetivo, nesse caso, era isolar apenas a NRMP fixada por uma âncora GPI (glicosil-fosfatidilinositol). Além da NR

transmembrânica, existe essa isoforma da enzima, localizada no exterior da membrana plasmática. Pelo menos por enquanto, com esse segundo isolamento não foi possível detectar atividade da NRMP nas frações celulares de abacaxizeiro. Como os testes foram feitos antes das atividades serem detectadas com o método utilizado atualmente, naquele momento concluiu-se que para os ensaios da NR, a aplicação dos ensaios utilizados por Stöhr e Ulrich estariam submetendo as amostras de abacaxizeiro a muitas variações de temperatura e isso causaria possivelmente a perda da atividade da NR.

O gradiente de sacarose é uma técnica utilizada para a separação de organelas e partículas por centrifugação. Soluções de sacarose, de diferentes densidades são dispostas no tubo, começando sempre pela mais concentrada, tomando-se muito cuidado para não misturar as soluções. Aplica-se a amostra no topo do gradiente e este é ultracentrifugado. As organelas celulares ou partículas migram em direção ao fundo do tubo, ficando retidas onde a densidade é igual à sua.

O uso de uma ultracentrífuga se faz necessário para diminuir o tempo de permanência do material sob centrifugação, pois é possível produzir um maior volume de material sob medidas de força de gravidade extremamente altas. Dependendo da ultracentrífuga, pode alcançar 500.000g.

Para abacaxizeiro, utilizou-se um gradiente contínuo, que é aplicado quando espera-se isolar apenas organelas de uma determinada densidade, nesse caso as membranas plasmáticas. Essas foram coletadas da interface entre as duas concentrações de sacarose. Esse método é largamente utilizado para isolar frações de membranas plasmáticas, porém é muito longo, chegando a consumir 14 horas de trabalho. Resultados preliminares promissores foram constatados, pois foi possível visualizar a separação das frações de membranas plasmáticas nas folhas e nas raízes (fig. 28 A e 28 B) e verificar, com o ensaio da MDH (enzima localizada no citoplasma) em um isolamento feito com folhas, que praticamente não havia contaminação por citossol nos extratos de abacaxizeiro (fig. 29). Porém, não foi possível medir a atividade da NR. Tomando-se como base todos os aprendizados adquiridos durante o processo de padronização do ensaio *in vitro* da NR, concluiu-se que, provavelmente a enzima foi degradada durante o longo processo.

Um outro fator que inviabilizou o uso da técnica para material proveniente de folhas deveu-se ao fato de que, com esse procedimento não foi possível separar das membranas plasmáticas, as membranas de cloroplastos. Segundo BRISKIN *et al.* (1987), essa técnica foi desenvolvida para tecidos jovens, sem clorofila, como as raízes primárias e segmentos estiolados. As altas concentrações de clorofila nas frações interferem negativamente na coloração para a leitura do nitrito formado durante o ensaio da NR.

No entanto, foi possível tirar algumas conclusões sobre os cuidados que são essenciais para a boa realização do fracionamento e que poderão dar contribuições valiosas aos novos trabalhos, principalmente ao grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Vegetal, que poderá aplicá-las futuramente. A solução de homogeneização pode ser parcialmente preparada com antecedência. A sacarose pode ser diluída no tampão base (Tris-Mes) e essa solução pode ser estocada em geladeira por 1 mês. No dia do experimento acrescenta-se à solução o DTT, EDTA e outros protetores específicos para a enzima que será analisada. Tudo deve ser mantido em gelo. As mesmas orientações servem para o preparo do tampão de ressuspensão. As soluções de sacarose em tampão Tris-Mes, utilizadas na montagem do gradiente podem ser preparadas e estocadas no freezer por tempo indeterminado, descongeladas para a retirada da quantidade necessária e congeladas novamente para uso futuro. Na última centrifugação, que permite a separação das organelas por densidade, é indispensável programar a centrífuga para desaceleração lenta após o processo. No início dos trabalhos, devido a falta de experiência com o método, não atentou-se para esse detalhe e acreditava-se que o gradiente não estava se formando. Na verdade, se a centrifugação for rapidamente interrompida, todas as camadas formadas se misturam, eliminando irreversivelmente os resultados. A adequação desse método deve ser feita com a seleção das concentrações de sacarose nos gradientes, sendo mais apropriada aquela que reter na interface dos mesmos a maior quantidade de membranas. Além disso, o tempo de centrifugação e a gravidade também são determinantes. Os bons resultados obtidos com o gradiente de sacarose foram limitados ao uso de tecidos sem clorofila, como as raízes.

Propôs-se, então, a utilização do método de fracionamento por partição com sistema de duas fases – Dextran T-500 e PEG 3350 – descrito por LARSSON *et al.* (1994). Esse procedimento separa as membranas de acordo com a carga superficial e todas as membranas permanecem na mesma conformação, ou seja, confere unilateralidade entre as vesículas (HODGES and MILLS, 1986). Enquanto a densidade das membranas plasmáticas (1,14 – 1,17 g cm<sup>-3</sup>) em um gradiente de sacarose é muito parecida com a de membranas de mitocôndria (1,18 – 1,20), membranas de Golgi (1,12-1,15), retículo endoplasmático rugoso (1,15 – 1,17) e tilacóides (1,16-1,18), suas propriedades superficiais ou pelo menos as propriedades de sua superfície externa parecem ser muito diferentes das membranas intracelulares (LARSSON *et al.*, 1987).

Os componentes mais comuns de um sistema de duas fases são dextran (poly( $\alpha$ -1,6-glicose), PEG (polietileno-glicol) e sais como fosfato de sódio, citrato de sódio e sulfato de sódio ou magnésio que são incompatíveis com o PEG e formam um sistema de duas fases com este polímero (BROOKS and NORRIS-JONES, 1994). O sistema de fases deve ser montado adicionando-se as soluções estoque em ordem decrescente de densidade: dextran, PEG, sais e água. Esses componentes podem ser estocados no freezer por tempo indefinido. Também podem ser descongelados permanecendo 12 horas a 4° C (BROOKS and NORRIS-JONES, 1994).

A otimização deste procedimento deu-se, inicialmente, com o aumento na concentração de polímeros (6,2 – 6,5%). Verificando-se a melhor concentração para que a maior parte das membranas plasmáticas estivesse localizada na fase superior, as condições de separação são finalmente estabelecidas montando-se uma série de sistemas com aumento na concentração de KCl (1M), variando de 0 a 5 mL (LARSSON *et al.*, 1994).

A utilização desse método, além de mostrar-se eficiente, possibilitando que um grau de pureza nas frações (avaliado com o ensaio da MDH), entre 85% e 98% (figs. 30, 31 e 34) fosse verificado, permitiu que o procedimento ocorresse em cerca de 6h. Acredita-se que esse fator foi determinante para que os primeiros registros pudessem ser feitos da atividade da NR nas frações de membranas plasmáticas nas raízes de abacaxizeiro.

Como pode ser visto nas figuras 32, 33, 35, 36, 37, 38 e 39 todas as atividades estão expressas em proteínas totais. Para fazer essas quantificações nas frações de citoplasma, as plantas provenientes dos mesmos tratamentos foram divididas em amostras separadas e receberam tampões de homogeneização com BSA (no caso das plantas destinadas ao fracionamento) ou sem BSA (no caso das plantas destinadas à quantificação de proteínas totais). Essa separação fez-se necessária porque as frações citoplasmáticas são extraídas do sobrenadante após a segunda centrifugação e não é possível saber quanto de proteína exógena foi consumida pelas proteases até o momento das medições. Sabe-se que o BSA ainda está presente e afetaria muito a quantificação das proteínas. Já no caso das frações de membranas plasmáticas, essas são utilizadas após várias lavagens em altas velocidades, utilizando-se sempre o precipitado, o que garante que o BSA não esteja presente no final do processo.

No primeiro experimento, as atividades registradas nas frações de membrana (fig. 32) foram mais expressivas nas plantas submetidas ao tratamento termoperiódico do que nas plantas que estiveram em temperatura constante. Já nas frações de citoplasma, nenhuma diferença foi verificada entre as atividades registradas nas plantas tratadas com termoperíodo e nas plantas controle (fig. 33). Os resultados foram promissores naquele momento, pois foi a primeira vez que a atividade da NR pôde ser verificada nas frações celulares e esse resultado mostrou que a baixa temperatura influenciou positivamente a atividade da NR nas membranas do abacaxizeiro e que as isoformas da NR presentes no citoplasma não são ativadas pelo tratamento com termoperíodo.

Quanto à ausência de atividade nas frações extraídas das folhas, duas hipóteses foram aventadas: 1) a perda protéica que ocorre durante o processo pode ter afetado negativamente o registro da atividade da NR; 2) as particularidades do próprio material vegetal podem exigir um maior refinamento da técnica para que esta seja aplicada nesse órgão. Pode ser necessário testar velocidades e tempos de centrifugação diferentes ou mais variações na concentração de polímeros no sistema de fases, por exemplo.

Sabe-se que existem mais de uma isoforma da NR, tanto no citoplasma quanto na membrana plasmática. No citoplasma encontram-se, pelo menos, duas variações:

uma enzima específica, que utiliza apenas NADH como doador de elétrons, e outra enzima biespecífica que pode reduzir o nitrato utilizando NADH ou NADPH como redutores (TISCHNER, 2000). Nas membranas plasmáticas, também já foram identificadas isoformas diferentes da NR. Nesses estudos, a enzima foi quantificada em raízes de milho e cevada, sendo concluído que se tratava de uma proteína integral de membrana (WARD *et al.*, 1988; 1989). Em 1994, DE MARCO e colaboradores voltaram a pesquisar as plantas de milho utilizando-se de vários métodos adicionais ao fracionamento, que poderiam retirar completamente qualquer enzima citossólica que estivesse presa à membrana. Esses experimentos foram feitos porque muitos autores acreditavam que a atividade enzimática verificada por Ward e colaboradores tratava-se de mera contaminação das frações de membranas plasmáticas pela isoforma citossólica da enzima. No entanto, mesmo após tantos cuidados técnicos, as membranas isoladas reduziram o nitrato, utilizando tanto o NADH quanto o NADPH como doadores de elétrons, provando que havia uma forma da NRMP presente nas plantas de milho. Em células de cenoura, o preparado de membranas também mostrou a ocorrência de redução do  $\text{NO}_3^-$  (17% do total da atividade da NR). Nesse caso, a NRMP foi descrita como uma proteína transmembrânica que demonstrou atividade de redução do nitrato quando NADH foi adicionado ao meio (BARR *et al.* 1995). STÖRN (1999) localizou a NRMP também em raízes e folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum*). Além do fracionamento por partição de fases, um processo de lavagens adicional, com Triton X-114, foi utilizado com o objetivo de isolar das membranas a NR que estaria ligada às mesmas por uma âncora glicosídica (GPI). Nas raízes, essa forma da NR reduziu o nitrato tanto na presença de NADH quanto na de succinato como doadores de elétrons. Nas folhas de *Nicotiana tabacum*, tanto a NR citossólica quanto a NRMP tiveram suas atividades relacionadas com o conteúdo de nitrato no meio, ou seja, a atividade aumentava quando o conteúdo de nitrato era elevado. Nas raízes de tabaco, a atividade da NRMP, principalmente a que utilizou succinato como doador de elétrons, começou a diminuir quando o nitrato externo ultrapassou 25 mM. Nessa concentração, o conteúdo de nitrato nos tecidos aumentou, indicando uma relação inversa entre a quantidade interna de nitrato e a atividade da enzima no eixo radicular. Estudos realizados em folhas de tomateiro por PIERO e colaboradores (2003), com intuito de

caracterizar as diferenças cinéticas entre duas redutases do nitrato (NRc e NRMP), apresentaram, dentre outros, os seguintes resultados: a NRMP permaneceu mais ativa no escuro comparativamente à NRc e a atividade da NRc foi fortemente induzida e estritamente dependente da presença de nitrato no meio durante o crescimento da planta. Inversamente, a NRMP foi pouco estimulada pelo nitrato. Esses resultados são semelhantes àqueles preliminares verificados com as plantas de abacaxizeiro que foram tratadas com termoperíodo e apresentaram um incremento na atividade da NR, apesar dos níveis endógenos de  $\text{NO}_3^-$  serem baixos. Essa isoforma da NRMP, diferentemente da citoplasmática, não seria induzida tão fortemente pelo seu substrato.

Com o objetivo de verificar se isoformas diferentes da NRMP estariam sendo influenciadas positivamente pela baixa temperatura e em qual compartimento celular poderiam ser encontradas, os ensaios foram feitos com NADH, NADPH ou com succinato, como doadores de elétrons. Esse último foi utilizado para identificar a possível existência da NR ancorada à membrana plasmática, uma vez que o NADH pode ativar outras isoformas da enzima, além da própria NRMP ligada a este compartimento celular pela âncora glicosídica (GPI).

Nas figuras 35 e 36 (atividades da NRMP com NADH e NADPH, respectivamente) foi possível verificar que a baixa temperatura influenciou positivamente na atividade da enzima. O mesmo pôde ser visto quando o succinato foi oferecido como doador de elétrons, sugerindo que a NRMP ligada pela âncora GPI está presente no abacaxizeiro (fig. 37). Existem relatos na literatura que mostram que a baixa temperatura pode ser considerada um importante fator ambiental, causando uma rápida ativação da NR nas folhas de *Triticum aestivum* L., resultado da desfosforilação da proteína. Plantas de trigo, após serem aclimatadas por 7 dias a 2°C, apresentaram um aumento na atividade da NR dependente de NADH, dobrando a atividade nesse período. O conteúdo de nitrato nas folhas de trigo foi reduzido a 1/3 após o período de aclimação (YANEVA *et al.*, 1996). Provavelmente, essa diferença na atividade da NR durante a exposição às baixas temperaturas foi causada pela ativação da NRMP, pois sabe-se que ela pode ser ativada de formas diferentes, inclusive por baixa temperatura.

Ao observar-se o incremento nas atividades da NRMP nas plantas submetidas ao tratamento termoperiódico e comparando-se com os resultados medidos para as

plantas controle (figuras 32, 35, 36 e 37), pôde-se considerar que ocorreu uma síntese *de novo* da NRMP, influenciada pela baixa temperatura. Em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Fisiologia Vegetal com plantas de abacaxizeiro, demonstrou-se que a baixa temperatura noturna influencia o aumento no nível de transcritos da NR cerca de 4h antes de serem registradas as altas atividades da enzima nas raízes das plantas expostas à temperatura noturna de 15°C (FRESCHI *et al.*, 2009). Outros relatos da literatura, como os trabalhos realizados por YANEVA *et al.*(1996) com plantas de trigo, também demonstraram que a regulação da atividade da NR, quando as plantas foram submetidas à baixa temperatura por 7 dias, pode ter sido dependente da ativação da NR já presente, assim como da síntese *de novo* da enzima.

Estudos mais detalhados, aplicando-se um segundo método de separação de fases com Triton X-114 nas frações extraídas pelo sistema de duas fases utilizado neste trabalho, poderão esclarecer quais doadores de elétrons a NRMP ligada pela âncora glicosídica utilizaria, além do succinato, e sob quais condições (temperatura constante ou termoperíodo) a atividade dessa enzima seria ativada nas raízes de abacaxizeiro.

Quanto às atividades registradas nas frações citoplasmáticas extraídas das plantas que passaram pelo tratamento e das plantas que permaneceram em temperatura constante (fig. 38), observou-se que não houve influência positiva da baixa temperatura na atividade da NR quando NADH foi adicionado na reação. Embora seja possível verificar diferença entre as atividades medidas com NADPH (fig. 39), essas foram, em média, 10 vezes inferiores às registradas com NADH. Considerando-se que o NADPH foi utilizado para avaliar a atividade da NR biespecífica e que, portanto, a atividade dessa isoforma já foi medida quando NADH foi oferecido, conclui-se que essa diferença não influenciaria para que ocorresse uma modificação na resposta verificada para as frações de citoplasma, as quais não demonstraram uma atividade diferencial que determinaria o incremento na atividade da NR radicular em plantas de abacaxizeiro expostas às baixas temperaturas.

Em conclusão, a realização desta pesquisa contribuiu sobremaneira para os esclarecimentos sobre a existência de uma NRMP em abacaxizeiro, enriquecendo os conhecimentos sobre o metabolismo nitrogenado nessas plantas. Sabe-se que existem poucos trabalhos fisiológico-bioquímicos a esse respeito e essa isoforma nunca havia

sido descrita anteriormente em uma planta da família Bromeliaceae. Além disso, essa descoberta ampliará a linha de pesquisa do grupo do Laboratório de Fisiologia Vegetal, uma vez que, segundo relatos da literatura, essa enzima tem participação efetiva no metabolismo do óxido nítrico, o qual vem sendo também estudado por esse grupo.

## RESUMO

A nitrato redutase (NR) atua juntamente com a nitrito redutase (NiR) catalisando a primeira etapa da redução do nitrato. A NR, no citossol, é ativada, principalmente, pela luz e reduz o nitrato a nitrito. Em seguida, este é reduzido a amônio. Trabalhos anteriores demonstraram que a isoforma citossólica da NR está presente nas folhas e raízes do abacaxizeiro; já as associadas à membrana plasmática (NRMP) ainda não se tem registro. Sabe-se, no entanto, que a NRMP apresenta modos diferentes de ativação, como já constatados para outras espécies. Dentre os fatores que afetam sua atividade pode-se citar a temperatura. Pesquisas realizadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP, acerca da influência do termoperíodo sobre os metabolismos nitrogenado e fotossintético de plantas de abacaxizeiro, aventaram a hipótese de que haveria uma nitrato redutase específica de membrana plasmática presente nas células radiculares, a qual seria regulada por termoperíodo, diferindo, portanto, da isoforma citossólica presente nas folhas. Assim, o presente trabalho teve como objetivo principal demonstrar a existência de uma isoforma da NR associada à membrana plasmática, a qual seria responsável pelo incremento da atividade dessa enzima registrada nas raízes de *Ananas comosus*, quando plantas cultivadas *in vitro* são submetidas ao termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite). Para tanto, determinou-se o tempo mínimo de exposição das plantas de abacaxizeiro ao termoperíodo, necessário à indução da nitrato redutase radicular. Além disso, estudou-se a influência da idade das plantas na resposta ao tratamento com baixa temperatura noturna. Plantas cultivadas *in vitro* com 90 dias de idade ou com idades variadas foram transferidas para câmaras de crescimento com temperatura constante (28°C dia/noite – controle experimental) ou com termoperíodo (28°C dia/ 15°C noite), fotoperíodo de 16 horas e intensidade luminosa de 55  $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Elas permaneceram nessas condições por 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 ou 60 dias. Após cada período, a atividade *in vivo* da NR foi analisada durante a fase de ausência de luz. Para que fosse possível identificar uma possível NRMP nas células radiculares de abacaxizeiro, um método de ensaio *in vitro* foi padronizado e a melhor técnica de isolamento de frações de membrana plasmática foi selecionada. Após as plantas com 60 dias de idade serem submetidas por 30 dias ao

tratamento termoperiódico ou à temperatura constante, as frações de membrana plasmática das células radiculares foram isoladas e o ensaio *in vitro* da NR foi realizado, utilizando-se NADH, NADPH ou succinato como doadores de elétrons. Os resultados indicaram que o tempo mínimo de exposição das plantas de abacaxizeiro ao termoperíodo foi de 30 dias. O método de ensaio enzimático *in vitro* foi padronizado para as plantas de abacaxizeiro e a técnica de isolamento de frações de membrana plasmática que se mostrou mais adequada para essa bromélia foi a de fracionamento por sistema de duas fases com Dextran T-500 e PEG 3350. O grau de pureza das frações, avaliado pela detecção da atividade da enzima citoplasmática malato desidrogenase (MDH), foi em média de 95%, evidenciando a eficácia da padronização do método. Os resultados obtidos para as frações de membranas plasmáticas, extraídas das raízes das plantas que estiveram sob o tratamento termoperiódico, mostraram que a baixa temperatura noturna influenciou positivamente a atividade da nitrato redutase. O aumento da atividade foi observado quando NADH, NADPH ou succinato foram utilizados como doadores de elétrons. Isso significa que, provavelmente, mais de uma isoforma da NRMP está presente nas raízes de abacaxizeiro. Além disso, há indícios de que a isoforma que está ligada externamente à membrana por uma âncora glicosídica (que utiliza succinato como doador de elétrons) está presente nas células radiculares do abacaxizeiro e respondeu positivamente ao estímulo da baixa temperatura noturna. Em contrapartida, nenhuma diferença pôde ser observada quando as atividades da NR foram medidas nas frações de citoplasma das plantas controle e daquelas que foram tratadas com termoperíodo. Não foi detectada atividade nas frações citossólicas quando succinato foi oferecido como poder redutor da NR. Concluiu-se, portanto, que o incremento na atividade da NR, verificado nas plantas que foram tratadas com termoperíodo, deveu-se à indução pela baixa temperatura noturna da NRMP. Esta pesquisa trouxe contribuições importantes acerca da existência de uma nitrato redutase associada à membrana plasmática em abacaxizeiro, nunca antes detectada em uma bromélia e muito pouco estudada nos demais vegetais. As padronizações realizadas serão essenciais para aplicação em outras pesquisas do Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP, abrindo oportunidades para se aprofundar ainda mais o tema sobre o controle da ativação da NR.

## ABSTRACT

The nitrate reductase (NR) acts together with the nitrite reductase (NiR) to catalyze the first step of the nitrate reduction. The NR localized in the cytosol is activated mainly by light and reduces nitrate to nitrite, followed by its reduction to ammonium. Previous work demonstrated that the cytosolic isoform of NR is present in leaves and roots of *Ananas comosus*, although the isoform associated with the plasma membrane (PM-NR) has not yet been registered in this species. The PM-NR has different modes of activation in comparison to the cytosolic NR, as already demonstrated in other species. Among the factors that affect its activity can be mentioned the temperature. Experiments developed in the Laboratory of Plant Physiology of IBUSP hypothesized that exists a specific plasma membrane NR in plant roots regulated by thermoperiod, differing from the cytosolic isoform present in leaves. The present work aimed to demonstrate the existence of this isoform of NR present in the plasma membrane, which would be responsible for the increase of its activity in *Ananas comosus* roots when plants were cultivated *in vitro* under thermoperiod of 28°C day/ 15°C night. Initially, it was important to determine the minimum time of exposure to thermoperiod necessary for the induction of nitrate reductase in roots of pineapple plants. Furthermore, it was analyzed the influence of age in the response of plants to low night temperature treatment. For this purpose, plants with different ages cultivated *in vitro* were transferred to growth chambers either with constant temperature (28°C day/night – experimental control) or with thermoperiod (28°C day/ 15°C night). The plants were cultivated in these conditions during 1, 3, 5, 7, 15, 30, 40, 50 or 60 days and then the *in vivo* NR activity was analyzed in the shoot and root tissues during the dark period. In order to identify a probable PM-NR in the pineapple root cells, it was also necessary to develop a NR *in vitro* assay protocol specific for *Ananas comosus* and the appropriate technique for plasma membrane isolation (Dextran T-500 and PEG 3350). The purity of the fractions, determined by the activity of cytoplasmic enzyme malate dehydrogenase (MDH), was on average 95%, indicating the effectiveness of the method. The next step was to evaluate the NR activity in cytoplasmic and plasma membrane fractions of root tissues of *Ananas comosus*. Using 60

days'old plants exposed either to 30 days under the thermoperiodic treatment or to constant temperature, the plasma membrane fractions of roots were isolated and the *in vitro* NR assay was performed using NADH, NADPH or succinate as electron donors. The results indicated that the minimum thermoperiod exposure time necessary to induce NR activity was 30 days. Furthermore, it was demonstrated that low temperatures during the dark period positively influenced the activity of nitrate reductase in plasma membrane fractions and that the increase in its activity was observed when NADH, NADPH or succinate were used as electron donors. On the other hand, no difference in NR activity was observed in the cytoplasmic fraction of control plants and those which were treated with thermoperiod. Moreover, no NR activity was detected in cytosolic fractions when succinate was provided as electron donor. All together, this results showed that probably diferents isoforms are presents in pineapple roots. The extracellular isoform that is attached to the plasma membrane by a lipophilic anchor (using succinate as electron donor) can be present in root cells of pineapple and responded positively to the low night temperature stimulus. This study has made important contributions to the knowledge of the metabolism and physiology of *Ananas comosus*. This is the first time that the existence of a nitrate reductase associated with the plasma membrane, a very little studied enzyme, is documented in Bromeliaceae.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD ALI A, SUBRAMANIAN SIVAKAMI A, NANDULA RAGHURAM (2007) Regulation of activity and transcript levels of NR in rice (*Oryza sativa*): Roles of protein kinase and G-proteins. **Plant Science** **172**: 406–413
- ASLAM, M.; HUFFAKER, R.C. (1984) Dependency of nitrate reductase on soluble carbohydrates in primary leaves of barley under aerobic conditions. **Plant Physiology** **75**: 623-628.
- BACHMANN, M.; MCMICHAEL, R.W.; HUBER, J.L.; KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (1995) Partial purification and characterization of a calcium-dependent protein kinase and an inhibitor protein required for inactivation of spinach leaf nitrate reductase. **Plant Physiology** **108**:1083-1092.
- BARTHOLOMEW, D.P.; MALÉZIEUX, E.P. (1994) Pineapple. In: Schaffer, B.; Andersen, P.C. **Handbook of Environmental Physiology of Fruits Crops**. V. I e II. CRC Press, USA. p. 243-291.
- BÉRCZI, A. & MØLLER, I. M. (2000) Redox enzymes in the plant plasma membrane and their possible roles. **Plant, Cell and Environment** **23**: 1287–1302.
- BERKS, B.C.; FERGUSON, S.J., MOIR, J.W., RICHARDSON, D.J. (1995) Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. **Biochim. Biophys. Acta** **1232**: 97-173.
- BERR, R.; BOETTGER, M.; CRANE, F.L. & MORRE, D.J. (1995) Nitrate reductase activity of plasma membranes from cultured carrot cells. **Protoplasma** **184**: 151-157.
- BIOTECNOLOGIA, CIÊNCIA E DESENVOLVIMENTO (2001) **Biotecnologia aplicada à produção de mudas**. **19**: 42-47.
- BLASCO F., DOS-SANTOS J.-P., MAGALON A., FRIXON C., GUIGLIARELLI B., SANTINI C.-L., GIORDANO G. (1998) NarJ is a specific chaperone required for molybdenum cofactor assembly in nitrate reductase A of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology** **28**: 435- 447.
- BORDIER, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. **J. Biol. Chem.** **256**: 1604-1607.
- BOTREL A.; KAISER, W.M. (1997) Nitrate reductase activation state in barley roots in relation to the energy and carbohydrate status. **Planta** **201**: 496-501.
- 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.
- BROOKS, D. E.; NORRIS-JONES, R. (1994) Preparation and analysis of two-phase systems. **Methods in Enzymology** **228**: 14-27.

- BRUSCA, J. S.; RADOLF, J. D. (1994) Isolation of integral membrane proteins by phase partitioning with Triton X-114. **Methods Enzymol** **228**: 182-193.
- BUCHANAN, B.B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (2000) Biochemistry & Molecular Biology of Plants **American Society of Plant Physiologists** 1367p
- BUTZ, R.G.; JACKSON, W.A. (1977) A mechanism for nitrate transport and reduction. **Phytochemistry** **16**: 409-417.
- CAMMAERTS, D. & JACOBS, M. (1985) A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. **Planta** **163**: 517-526.
- CAMPBELL, W.H. (1999) Nitrate reductase structure, function and regulation. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **50**: 277-303.
- CHENG, C.L.; ACEDO, G.N.; CRISTINSIN, M.; CONKLING, M.A. (1992) Sucrose mimics the light induction of Arabidopsis nitrate reductase gene transcription. **PNAS** **92**: 1861-1864.
- CHUNG, H-J.; SEHNKE, P.C. and FERI, R.J. (1999) The 14-3-3 proteins: cellular regulators of plant metabolism. **Trends in Plant Science Reviews vol.4 (9)**: 367-371.
- CORDEIRO, L. (2004) Fixação do Nitrogênio. Em: Kerbauy, G.B. – Fisiologia Vegetal, p. 76-93.
- CRAWFORD, N.M. (1995) Nitrate: nutrient and signal for plant growth. **The Plant Cell** **7**: 859-868.
- CRAWFORD, N.M.; GLASS, A.D.M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. **Trends in Plant Science**. **3(10)**: 389-395.
- 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**.
- CRAWFORD, N.M.; WILKINSON, J.Q.; LABRIE, S.T. (1992) Metabolic control of nitrate reduction in *Arabidopsis thaliana*. **Australian Journal of Plant Physiology** **19**: 377-385.
- CUNHA, G.A.P.; MATOS, A.P.; CABRAL, J.R.S.; SOUZA, L.F.S.; SANCHES, N.F.; REINHARDT, D.H.R.C. (1994) **Abacaxizeiro para exportação: aspectos técnicos da produção**. Frupex, EMBRAPA-SPI, Brasília, DF. 41p.
- DALLING, M.J.; TOLBERT, N.E.; HAGEMAN, R.H. (1972) Intracellular location of nitrate reductase and nitrite reductase. I. Spinach and tobacco leaves. **Biochimic Biophysic Acta** **283**: 505-512.
- DARLING, D.L.; YINGLING, J.; WYNSHAW-BORIS, A. (2005) Role of 14-3-3 proteins eukaryotic signaling and development. **Current Topics in developmental Biology, vol. 68**: 281.
- 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.

DELGADO M.J., FERNANDEZ-LOPEZ M., BEDMAR-EULOGIO J. (1998) Soluble and membrane-bound nitrate reductase from *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids. **Plant Physiology and Biochemistry (Paris)** **36**: 279- 283.

DENG, M.D.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; CABOCHE, M. (1990) Nitrate reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. **Planta** **180**: 257-261.

ENDRES, L.; MERCIER, H. (2001a) Ammonium and urea as nitrogen sources for bromeliads. **Journal of Plant Physiology** **158**: 205-212.

ENDRES, L.; MERCIER, H. (2001b) Influence of nitrogen forms on the growth and nitrogen metabolism of bromeliads. **Journal of Plant Nutrition** **24**: 29-42.

ENDRES, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. (2002) *In vitro* nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. **In Vitro Cell Development Biology Plant** **38(5)**: 481-486.

FAO – Food and Agriculture Organization of The United Nations. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&ser vlet=1&hasbulk=0&version=ext&language=EM>>. Acessado em setembro de 2006.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ M., OLIVARES J., BEDMAR E.J. (1996) Purification and characterization of the membrane-bound nitrate reductase isoenzymes of *Bradyrhizobium japonicum*. **FEBS Letters** **392**: 1-5. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00670-9

FERRARIO S., VALADIER M.H., FOYER C.H. (1996) Short-term modulation of *nitrate reductase* activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays* leaves. **Planta (Heidelberg)** **199**: 366- 371.

FERRARIO, S.; VALADIER, M.H.; FOYER, C.H. (1996) Short term modulation of nitrate reductase activity by exogenous nitrate in *Nicotiana plumbaginifolia* and *Zea mays*. **Planta** **199**: 366-371.

FRESCHI L, NIEVOLA CC, RODRIGUES MA, DOMINGUES DS, VAN SLUYS M-A, MERCIER H. (2009) Ther- moperiod affects the diurnal cycle of nitrate reductase expression and activity in pineapple plants by modulating the endogenous levels of cytokinins. **Physiol Plantarum** **137**:201–12.

FRESCHI L.; RODRIGUES M.A.; TINÉ, M.A.S; MERCIER H. (2010) Correlation between citric acid and nitrate metabolisms during CAM cycle in the atmospheric bromeliad *Tillandsia pohliana*. **J. of Plant Physiology** doi:10.1016/j.jplph.2010.06.002

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.

GALLAGHER, S. R. AND LEONARD, R.T. (1982) Effect of Vanadate, Molybdate, and Azide on Membrane-Associated ATPase and Soluble Phosphatase Activities of Corn Roots **Plant Physiol.** **70**: 1335-1340

- GOWRI, G.; CAMPBELL, W.H. (1989) cDNA clones for corn leaf NADH:nitrate reductase and chloroplast NAD(P)<sup>+</sup>: gliceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Plant Physiology** **90**: 792-798.
- HAGEMANN, R.H.; REED, A.J. Nitrate reductase from higher plants. **Methods Enzymol.** **69**: 270-280.
- HAMASAKI, R.M.; PURGATTO, E. AND MERCIER, H. (2005) Glutamine enhances competence for organogenesis in pineapple leaves cultivated *in vitro*. **Brasilian Journal of Plant Physiology** **17 (4)**: 383-389.
- HELENIUS, A. and SIMONS, K. (1975) **Biochimica et Biophysica Acta** **415**: 29
- HERNÁNDEZ-MUNAÍN, C.; FERNÁNDEZ, M A; ALCINA, A AND FRESNO, M (1991) Characterization of a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane protein from *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** **59(4)**: 1409-1416.
- HODGES TK, RT LEONARD (1974) Purification of a plasma membrane-bound adenosine triphosphatase from plant roots. **Methods Enzymol** **32**: 392-406.
- HODGES, T. K. and MILLS, D. (1986) Isolation of the plasma membrane. **Methods Enzymol** **118**: 41-54.
- HOFF, T.; TRUONG, H.N.; CABOCHE, M. (1994) The use of mutants and transgenic plants to study nitrate assimilation. **Plant, Cell and Environment** **17**: 489-506.
- JONES G.J.; MOREL, F.M.M. (1988) Plasmalemma redox activity in the diatom *Thalassiosira*. **Plant Physiology** **87**: 143-147.
- 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.; WEINER, H. and HUBER, S.C. (1999) Nitrate reductase in higher plants: A case study for transduction of environmental stimuli into control of catalytic activity. **Physiologia Plantarum** **105**: 385-390.
- KAISER WM, KANDBINDER 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**:801-7.
- KAISER, W.M. (1997) Regulatory interaction of carbon and nitrogen metabolism. **Progress in Botany** **58**: 151-163.
- KAISER, W.M.; BRENDLE-BEHNISCH, E. (1995) Acid-base-modulation of nitrate reductase in leaf tissues. **Planta** **196**: 1-6.
- KAISER, W.M.; HUBER, S.C. (1994) Pos-translational regulation of nitrate reductase in higher plants. **Plant. Physiology** **106**: 817-821.

KAISER, W.M.; WEINER, H.; ANDLBINDER, A.; TSAI, C.B.; ROCKEL, P.; SONODA, M.; PLANCHET, E. (2002) Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. **Journal of Experimental Botany** 53(370): 875-882.

KANDBINDER, A.; WEINER, H.; KAISER, W.M. (2000) Nitrate reductases from leaves of *Ricinus* (*Ricinus communis* L.) have different regulatory properties. **Journal of Experimental Botany** 51(347): 1099-1105.

KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. (1990) Advances in nitrate assimilation. In: MIFLIN, B.J.; STEWARD, P.J. **The Biochemistry of Plants**. Academic Press Inc., London, v.16, p. 89-120.

KLOBUS, G.; LOBOCKA, J.; BUCZEC, J. (1991) Effect of sodium tungstate on NO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake by cucumber seedlings. **Acta Physiologia Plantarum** 13: 227-233.

KUNZE, M.; RIEDEL, J.; LANGE, U.; HURWITZ, R.; TISCHNER, R. (1997) Evidence for the presence of GPI-anchored PM-NR in leaves of *Beta vulgaris* and for PM-NR in barley leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** 35: 507-512.

LAM, H.M.; COSCHIGANO, K.; SCHULTZ, C.; MEIO-OLIVEIRA, R.; TJADEN, G.; OLIVEIRA, I.; NGAL, N.; NSIEH, M.H.; CORRUZI, G. (1995) use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. **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 Enzymol.** 148: 491-501.

LEA, U.S.; LEYDECKER, M.T.; QUILERE 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(3) : 1085-1094.

LI, X.Z.; OAKS, A. (1993) Induction and turnover of nitrate reductase in *Zea mays*. Influence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. **Plant Physiology** 102:1251-1257.

LILLO C. (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. **Physiologia Plantarum** 62: 89-94.

LILLO, C. (1984) Diurnal variations of nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase, alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in barley leaves. **Physiologia Plantarum** 61: 214-218.

LILLO, C. (1994) Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. **Physiologia Plantarum** 90: 616-620.

LILLO, C.; KAZAZAIC, S.; RUOFF, P.; MEYER, C. (1997) Characterization of nitrate reductase from light and dark-exposed leaves. Comparison of different species and effects of 14-3-3 inhibitor proteins. **Physiologia Plantarum** 114: 1377-1383.

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 Physiology** **93**: 846-850.
- LU, J.L.; ERTL, J.R.; CHEN, C.M. (1990) Cytokinin enhancement of the light induction of nitrate reductase transcript levels in etiolated barley leaves. **Plant Molecular Biology** **14**: 585-594.
- LU, J.L.; ERTL, J.R.; CHEN, C.M. (1992) Transcriptional regulation of nitrate reductase mRNA levels by cytokinin-abcisic acid interactions in etiolated barley leaves. **Plant Physiology** **98**: 1255-1260.
- MAGALON A., ROTHERY R.A., LEMESLE-MEUNIER D., FRIXON C., WEINER J.H., BLASCO F. (1998) Inhibitor binding within the NarI subunit (cytochrome bnr) of *Escherichia coli* nitrate reductase A. **Journal of Biological Chemistry** **273**: 10851-10856. DOI: 10.1074/jbc.273.18.10851
- MAN, H.; BAKI, G. K. A.; STEGMANN, P.; WEINER, H.; KAISER, W. M. (1999) The activation state of nitrate reductase is not always correlated with total nitrate reductase activity in leaves. **Planta** **209**: 462-468.
- MATT, P.; GEIGER, M.; WALCH-LIU, P.; ENGLES, C.; KRAPP, A.; STITT, M. (2001) Elevated carbon dioxide increases nitrate uptake and nitrate reductase activity when tobacco is growing on nitrate, but increases ammonium uptake and inhibits nitrate reductase activity when tobacco is growing on ammonium nitrate. **Plant, Cell and Environment** **24**: 1119-1137.
- 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.
- MELZER, J.M.; KLEINHOF, A.; WARNER, R.L. (1989) Nitrate reductase regulation: effects of nitrate and light on nitrate reductase mRNA accumulation. **Molecular and General Genetics** **217**: 341-346.
- MERCIER, H.; ENDRES, L. (1999) Alteration of hormonal levels in a rootless epiphytic bromeliad in different phenological phases. **Journal of Plant Growth Regulation** **18**: 121-125.
- MERCIER, H.; KERBAUY, G.B. (1997) Micropropagation of ornamental bromeliads (Bromeliaceae). In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**. Ed. Bajaj Y.E.S., Springer, Berlin, 40: 43-55.
- MERCIER, H.; SOUZA, B.M.; KRAUS, J.E.; HAMASAKI, R.M.; SOTTA, B. (2003) Endogenous auxin and cytokinins contents associated with shoot formation in leaves of pineapple cultured *in vitro*. **Brazilian Journal of Plant Physiology** **15** (2): 107-112.
- MERLO, L.; FERRETI, M.; PASSERA, C.; CHISI, R. (1995) Light-modulation of nitrate reductase activity in leaves and roots of maize. **Physiologia Plantarum** **94**: 305-311.
- MEYERHOFF, P.A.; FOX, T.C.; TRAVIS, R.L.; HUFFAKER, R.C. (1994) Characterization of the association of nitrate reductase with barley (*Hordeum vulgare* L.) root membrane. **Plant Physiology** **104**: 925-936.

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) C<sub>3</sub> e induzidas a CAM por termoperíodo. Tese de doutorado. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 120p.

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.

OAKS, A.; HIREL, B. (1985) Nitrogen metabolism in roots. **Annual Rev. Plant Physiology** **36**: 345-365.

PM-NR in leaves of *Beta vulgaris* and for PM-NR in barley leaves. **Plant Physiology and Biochemistry** **35**: 507-512.

PROVAN, F.; HAAVIK, J.; LILLO, C. (2006) The regulatory phosphorylated serine in full-length nitrate reductase is necessary for optimal binding to a 14-3-3 protein. **Plant Science** **170**(2): 394-398.

PRYDE, J.G. (1986) Triton X-114: a detergent that has come from the cold. **Trends Biochem. Sci.** **11**: 160-163.

RANGAN, T.S.. Pineapple. In: Ammirato, P.V.; Evans, S.W.R.; Yamada, Y. (ed.), **Handbook of Plant Cell Culture**. New York: Moemillan Publ. Co., 1984, p. 373-382.

RITENOUR, G.L.; JOY, K.W.; BUNNING, J.; HAGEMAN, R.H. (1966) Intracellular localization of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. **Plant Physiology** **70**: 872-874.

RUFTY, T.W.; JR.; THOMAS, J.F.; REMMLER, J.L.; CAMPBELL, W.H.; VOLK, R.J. (1986) Intracellular localization of nitrate reductase in roots. **Plant Physiology** **82**: 675-680.

S. SIVASANKAR and A. OAKS (2006) Regulation of Nitrate Reductase during Early Seedling Growth (A Role for Asparagine and Glutamine) **PLANT PHYSIOLOGY** **107** (4): 1225-1231

SIQUEIRA, J.O.; FRANCO, A.A. (1988) Biotecnologia do solo – Fundamentos e Perspectivas. Brasília, MEC – ESAL – FAEPE – ABEAS.

SITT, M. (1999) Nitrate regulation of metabolism and growth. **Current Opinion in Plant Biology** **2**: 178-186.

SODEK, L. (2004) Metabolismo do Nitrogênio. Em: Kerbauy, G.B. – Fisiologia Vegetal, p. 94-113.

SOLOMONSON, L.P.; BARBER, M.J. (1990) Assimilatory nitrate reductase: functional properties and regulation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology** **41**: 225-253.

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

- STITT, M.; MÜLLER, C.; MATT, P.; GIBON, Y.; CARILLO, P.; MORCUENDE, R.; SCHEIBLE, W.R.; KRAPP, A. (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. **Journal of Experimental Botany** **53** (370): 959-970.
- STÖHR C., TISCHNER R., WARD M.R. (1993) Characterization of the plasma-membrane-bound nitrate reductase in *Chlorella saccharophila* (Krüger) Nadson. **Planta** **191**: 79- 85.
- STÖHR, C. (1999) Relationship of nitrate supply with growth rate, plasma membrane-bound and cytosolic nitrate reductase and tissue nitrate content in tobacco plants. **Plant, Cell and Environment** **22**: 169-177.
- STÖHR, C.; GLOGAU, U.; MÄTSCHKE, M.; TISCHNER, R. (1995) 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.; 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.
- SU, W.; HUBER, S.C.; CRAWFORD, N.M. (1996) Identification *in vitro* of a post-translational regulatory site in the hinge I region of *Arabidopsis* nitrate reductase. **The Plant Cell** **8**: 519-527.
- SUZUKI, A.; GADAL, P.; OAKS, A. (1981) Intracellular distribution of enzymes associated with nitrogen assimilation in roots. **Planta** **151**: 457-461.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. (2004) Fisiologia Vegetal **Artmed Editora** 719 p.
- TISCHNER, R. (2000) Nitrate uptake and reduction in higher and lower plants. **Plant, Cell and Environment** **23**: 1005-1024.
- 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.
- VAUCHERET, H.; MARION, P.A.; MEYER, C.; FAURE, J.D. MARIN, E.; CABOCHE, M. (1992) Interest in and limits to the utilization of reporter genes for the analysis of transcriptional regulation of nitrate reductase. **Molecular and General Genetics** **223**: 259-268.
- VINCENTZ, M.; MOUREAUX, T.; LEYDECKER, M.T.; VAUCHERET, H.; CABOCHE, M. (1993) Regulation of nitrate reductase expression in *Nicotiana glauca* leaves by nitrogen and carbon metabolites. **Plant Journal** **3**: 315-324.
- 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 Physiology** **88**: 1141-1145.

- WEINER, H.; KAISER, W.M. (1999) 14-3-3 proteins control proteolysis of nitrate reductase spinach leaves. **FEBS Letters** **455**: 75-78.
- WEINER, H.; KAISER, W.M. (2000) Binding to 14-3-3 proteins is not sufficient to inhibit nitrate reductase in spinach leaves. **FEBS Letters** **480**: 217-220.
- WEINER, H.; KAISER, W.M. (2001) Antibodies to assess phosphorylation of spinach leaf nitrate reductase on serine 543 and its binding to 14-3-3 proteins. **Journal of Experimental Botany** **52(359)**: 1165-1172.
- WIENKOOOP, 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.
- WIENKOOOP, 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.
- 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.
- 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.
- YU, X.; SUKUMARAN, S.; MÁRTON, L. (1998) Differential expression of the *Arabidopsis* Nia1 and Nia2 genes. **Plant Physiology** **116**: 1091-1096.

## Anexo 1

Reagente	Motivações para o uso
DTT	<p>O DTT é um reagente comumente utilizado em estudos bioquímicos como um protetor antioxidante, prevenindo a oxidação de grupos SH (tiol) e para reduzir bissulfetos a ditióis. Esses agentes são substâncias que ao combinarem-se rapidamente com radicais livres inibem ou retardam o seu efeito degenerativo (Berg <i>et al.</i>, 2004). A redução pelo DTT tem por objetivo romper a ligação bissulfeto que é formada pelo grupo sulfidríla (-SH). Ao romper esta ligação, o DTT, como agente redutor, acrescenta um hidrogênio à valência livre do átomo de enxofre (Patrícia <i>et al.</i>, 2002).</p> <p>Tendo em vista que em um ensaio enzimático <i>in vitro</i> todos os componentes celulares são expostos no meio de extração, inclusive a enzima de interesse, faz-se necessária a utilização de vários protetores.</p> <p>Os resultados negativos com o aumento da concentração de DTT pode ter sido causado por alguma reação desse composto com um componente do extrato que afetou a NR em algum momento.</p>
PVP	<p>O PVP é um protetor contra compostos fenólicos também utilizado em extrações de NR (Kaiser <i>et al.</i>, 1997; Man <i>et al.</i>, 1999; Kandlbinder <i>et al.</i>, 2000). Em abacaxizeiro, o PVP é utilizado para extrair outras enzimas, como a PEPcase (fosfoenolpiruvato carboxilase). No entanto, os resultados com a NR (fig. 18 - Resultados) demonstraram que a utilização desse composto não foi favorável.</p>
BSA	<p>A albumina bovina (BSA) funciona como uma fonte protéica preferencial para as proteases. Sabemos que as bromélias possuem uma classe de proteases chamadas bromelinas (Benzing, 2000). Essas proteases são resistentes e, possivelmente, consomem a NR quando esta encontra-se no meio de extração. Na extração da arginase em <i>Vriesea gigantea</i> (Bromeliaceae) a utilização de maiores concentrações de BSA foi decisiva para que a atividade enzimática fosse detectada (Cambuí, 2009). Porém, os resultados com o abacaxizeiro não confirmaram essa ação positiva.</p>
Leupeptina	<p>A leupeptina no meio de extração foi aumentada porque esse composto é um inibidor específico para proteases que tem afinidade por grupos serina e cisteína (informação obtida no Índice Merck). Sabemos que a nitrato redutase é uma proteína que contém um resíduo de serina (Tischner, 2000; Buchanan, 2000), logo, a leupeptina seria um ótimo protetor utilizado em todos os tampões de extração da NR.</p>

## Biografia

- ✓ Graduada em Ciências Biológicas (Licenciatura) pela Faculdade de Formação de Professores da Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ (2002).
- ✓ Bolsista PIBIC/CNPq (Iniciação Científica), SANTOS, A. S., LAGE, D. A., FIGUEIREDO, S. F. L. Avaliação da capacidade regenerativa de *Oxypetalum banksii* subsp. *Corymbiferum* (Asclepiadaceae) **11ª Semana de Iniciação Científica da UERJ**, 2002, Rio de Janeiro. Livro de Resumos. , 2002. p.37 - 38
- ✓ Atividades de monitoria do “Programa de Aperfeiçoamento do Ensino (PAE)” na disciplina de “Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal”, realizadas nos primeiros semestres de 2008 e 2009.
- ✓ Exame de qualificação do mestrado prestado no dia 03/04/2008.

### Trabalhos apresentados em congressos durante a graduação:

- ✓ SIMÕES, C., SANTOS, A. S., SABINO, K. C. C., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S. F. L. Avaliação do indicativo de atividade antiinflamatória em extratos metanólicos de *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae) **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2002, Cuiabá. Livro de Resumos. , 2002.
- ✓ LAGE, D. A., SANTOS, A. S., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S. F. L. Maximização da proliferação de brotos de *Oxypetalum banksii* subsp. *Corymbiferum* . **XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2002, Cuiabá. Livro de Resumos.
- ✓ SIMÕES, C., SANTOS, A. S., GIANFALDONI, M. G., CASTRO, T. C., FUCKS, R., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S. F. L. Efeito das citocininas BA e KIN sobre a propagação in vitro de *Cleome rosea* **52º Congresso Nacional de Botânica**, 2001, João Pessoa.
- ✓ SIMÕES, C., CORDEIRO, L. S., SANTOS, A. S., ROCHA, A. S., CASTRO, T. C., RIBEIRO, I. G., MANSUR, E., ALBARELLO, N. *Cleome rosea* vahl. Como modelo para estudos em cultura de tecidos vegetais na família Capparaceae. **58º Congresso Nacional de Botânica**, 2007, São Paulo.

### Artigo completo publicado em periódico:

- ✓ SIMÕES, C., SANTOS, A. S., ALBARELLO, N., FIGUEIREDO, S. F. L. Shoot Organogenesis and Plantlet Regeneration from Stem Explants of *Cleome rosea* Vahl (Capparaceae). **Journal of Plant Biotechnology**, v.6, p.199 - 204, 2004.

### Trabalhos apresentados em congressos durante o mestrado:

- ✓ SANTOS, A., MERCIER, H. Variação da atividade da nitrato redutase entre parte aérea e raiz em plantas de abacaxizeiro submetidas a termoperíodo. **59º Congresso Nacional de Botânica - Sub-área de Fisiologia Vegetal**: 451/549, 2008, Natal - RN.
  
- ✓ SATAKE, P.M., RODRIGUEZ, M. A., SANTOS, A. S., FRESCHI, L., KERBAUY, G. B. Mudanças morfológicas na atividade da nitrato redutase *in vitro* durante o desenvolvimento de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae). **IXVII Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo**, 2008.
  
- ✓ SANTOS, A., MERCIER, H. Indução termoperiódica da nitrato redutase (NR) e detecção de uma possível isoforma associada à membrana plasmática. **XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal**, 2009, Fortaleza – CE.