

Paulo Tamaso Mito

**Sinalização da indução do metabolismo ácido
das crassuláceas (CAM) por ácido abscísico e
óxido nítrico em *Guzmania monostachia*
(Bromeliaceae)**

**Abscisic acid and nitric oxide signaling on the
induction of crassulacean acid metabolism in
Guzmania monostachia (Bromeliaceae)**

São Paulo

2011

Paulo Tamaso Mito

**Sinalização da indução do metabolismo ácido
das crassuláceas por ácido abscísico e óxido
nítrico em *Guzmania monostachia*
(Bromeliaceae)**

**Abscisic acid and nitric oxide signaling on the
induction of crassulacean acid metabolism in
Guzmania monostachia (Bromeliaceae)**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenice Mercier

São Paulo

2011

Ficha Catalográfica

Mioto, Paulo Tamaso
Sinalização da indução do
metabolismo ácido das crassuláceas por
ABA e NO em *Guzmania monostachia*
(Bromeliaceae)
69 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São Paulo.
Departamento de botânica.

1. metabolismo ácido das crassuláceas
2. óxido nítrico
3. ácido abscísico

Universidade de São Paulo. Instituto de
Biotecnologia. Departamento de botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a). Helenice Mercier
Orientador(a)

“Life... is like a grapefruit. It's orange and squishy, and has a few pips in it, and some folks have half a one for breakfast.”

Douglas Adams

**Dedico este trabalho aos meus
pais e à minha irmã. Vocês
sabem bem como é passar por
isso...**

Agradecimentos

Agradeço a todas as pessoas que ajudaram (e muito!) para fazer esse trabalho andar.

Primeiramente, agradeço à professora Helenice Mercier pela grande ajuda, pelo tempo e, principalmente, pela dedicação. Sempre contribuindo muito com o trabalho e dando conselhos valiosos.

Agradeço também ao Prof. Luciano, que talvez devesse estar como co-orientador dessa dissertação. Só que pra mestrado não pode ter co-orientador. Então deixa pra lá.

O Prof. Gilberto Kerbauy também ajudou dando algumas dicas importantes, e como um exemplo de dedicação a ser seguido.

As pessoas do laboratório (e os agregados) também ajudaram muito, dando apoio sempre, dentro e fora do laboratório. Segue a lista em ordem alfabética, pra ninguém achar que foi favorecido: Alessandra, Alex, Aline B., Aline T., Ana Maria, Auri, Bruno G., Bruno, Cássia, Dioceni, Fabio, Ilton, Leo, Lia, Lucas, Malka, Max, Michel, Nielda, Paula, Rafael, Renato, Rodrigo e Rosana.

O pessoal de casa merece um parágrafo à parte: O Perdigão foi um baita companheiro, sempre pronto pra ajudar em qualquer coisa. Só que eu também quero DESagradecer ele pelo tamanho do buraco deixado na camada de ozônio. A Alejandra, que agora é pessoa da casa, também é uma grande companheira (apesar de colombiana!). Sempre dando apoio, carinho e amor. Mesmo sem saber, ela ajudou muito em vários momentos da dissertação, e continua ajudando. Espero que eu consiga ajudar ela também.

A Paula, do Laboratório de Anatomia Vegetal do IBUSP, também foi uma ajuda valiosa, ensinando a trabalhar com anatomia.

O Prof. Eduardo Purgatto gentilmente passou as amostras de ABA no GC-MS e sempre se mostrou interessado nos resultados do nosso laboratório. Agradeço a ele também.

O pessoal de Floripa, que deu a maior força na hora de vir pra São Paulo (se era pra se livrar de mim, eu nunca vou saber): Blah, Geba, Gilberto, Frango, Israel, Luis, Miwa, Orié, Pietro, Ryu e Willy.

Uma pessoa que deu muito apoio logo que eu cheguei em São Paulo foi a Marta Campos. Fiquei um tempão morando na casa dela e ela nem me chutou pra fora. Por causa disso ela ganhou o título de “mãe postiça”. Obrigado, Marta!

Falando em mãe, tenho que agradecer a minha família também. Eles são os que sempre estão por perto quando precisamos. Agradeço à Regina, minha mãe, por sempre fazer de tudo pra me ver bem. O Carlão, meu pai, sempre acreditou que eu podia fazer mais do que eu pensava (e sempre cobrou para que eu fizesse mesmo!). A Mi! (Beatriz, minha irmã) é outra pessoa que faz de tudo pra me ver contente. Menos quando a gente era pequeno, que ela se mordida pra botar a culpa em mim...

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

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Óxido nítrico.....	1
1.1.1. Breve histórico.....	1
1.1.2. Natureza química.....	2
1.1.3. Biossíntese.....	3
1.1.4. Metabolismo.....	4
1.1.5. Funções conhecidas.....	5
1.2. O metabolismo ácido das crassuláceas.....	7
1.3. Fisiologia das folhas de bromélias.....	9
1.4. Guzmania monostachia e indução ao CAM.....	11
2. Objetivos.....	13
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. Material e métodos.....	15
3.1. Condições de cultivo e transição ao CAM.....	15
3.2 Avaliação da expressão do CAM.....	17
3.3. Conteúdo hídrico.....	19
3.4. Dosagem de ABA.....	19
3.5. Quantificação de NO e H ₂ O ₂	21
3.6. Localização in situ do NO.....	22

3.7. Análise estatística.....	22
4. Resultados.....	23
4.1. Caracterização do tipo de fotossíntese em folhas de plantas inteiras submetidas a suspensão de rega ou folhas isoladas submetidas ao PEG.....	23
4.2. Efeito da adubação prévia de <i>G. monostachia</i> sobre a transição C3-CAM.....	24
4.3. Variações dos teores de água e da acidez noturna.....	26
4.4. Atividades da PEPC e da MDH.....	31
4.5. Atividade da PEPC e da MDH, teor de acidez titulável e teor de água em folhas isoladas mantidas por 8 dias consecutivos em déficit hídrico.....	32
4.6. Quantificação do teor endógeno de ABA.....	34
4.7. Quantificação de NO e H ₂ O ₂	35
4.8. Localização <i>in situ</i> do NO por microscopia de fluorescência.....	38
4.9. Aplicação de SNP (doador de NO) em folhas isoladas mantidas por 7 dias em água.....	42
4.10. Quantificação da emissão de NO por quimioluminescência.....	43
5. Discussão.....	45
6. Conclusões.....	58
7. Resumo.....	59
8. Abstract.....	61
9. Referências bibliográficas.....	63

1. Introdução

1.1. Óxido Nítrico

1.1.1. Breve histórico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula conhecida há muito tempo, mas a sua atuação como um sinalizador indispensável aos seres vivos é conhecimento recente (DURNER & KLESSIG, 1999). Atribui-se a sua descoberta, juntamente com outros gases, a Joseph Priestley, em 1772, conforme descrito na sua obra “Experiments and Observations on Different Kinds of Air”. Após sua descoberta, o NO foi negligenciado na biologia por muitos anos, só voltando a ser estudado recentemente. Um dos primeiros trabalhos publicados foi o de ARNOLD *et al.* (1977), mostrando que o NO era capaz de induzir a guanilato ciclase em extratos de vários tecidos animais. Logo após, GRUETTER *et al.* (1980) constataram a ação vasodilatadora do NO na artéria coronária de bovinos. Esses trabalhos lançaram marcos no estudo do NO que resultou em um grande aumento no número de publicações relacionadas a essa molécula nas décadas seguintes. De fato, o NO foi considerado a molécula do ano em 1992 pela revista Science e rendeu o Prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 1998 aos descobridores das suas propriedades vasodilatadoras. Atualmente, o número de pesquisas com o NO vem aumentando cada vez mais, assim como suas aplicações, principalmente na área farmacêutica.

O estudo do NO em plantas começou já há bastante tempo, com estudos como o de KLEPPER (1979), no qual se detectou a produção de NO endógena. No entanto, isso foi atribuído aos efeitos de poluentes atmosféricos e herbicidas, que sobrecarregavam a planta com nitrito (KLEPPER, 1979). Nesse período, portanto, não se imaginava que o NO poderia ser um sinalizador que ocorre nas plantas em condições naturais. Finalmente, em 1997, foi constatada a produção endógena substancial de NO por várias espécies vegetais, de maneira independente de

herbicidas ou poluentes (WILDT *et al.* 1997). Apesar de sua importância, ainda são escassos os trabalhos sobre a sinalização promovida pelo NO em plantas, se comparados com o grande número de publicações tratando da ação dessa molécula em animais (NEILL *et al.*, 2003). As pesquisas que demonstram o envolvimento do NO nos vegetais vem crescendo significativamente, mas, mesmo assim, muitos estudos ainda são necessários (WILSON *et al.*, 2008).

1.1.2. Natureza química

O NO é um radical livre gasoso que tem um tempo de meia-vida relativamente longo em sistemas biológicos, indo de 3 a 5 segundos (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007) e, quando em baixas concentrações, essa molécula pode ser ainda mais estável (LAMATTINA *et al.* 2003). Devido ao seu pequeno tamanho e propriedades hidrofóbicas, ele é altamente difusível pelas células, tanto no citosol quanto através das membranas, com uma difusibilidade de $4,8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ em água (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007). Alguns pesquisadores consideram a possibilidade do NO ser um novo hormônio vegetal, já que atua de maneira dose-dependente e é produzido em pequenas concentrações, podendo sinalizar zonas distantes daquela onde foi produzido (BELLIGNI & LAMATTINA, 2001). Seu transporte pode ser feito por difusão (distâncias curtas) ou a longa distância, através da ligação reversível com a glutatona, gerando S-nitrosoglutatona (BELLIGNI & LAMATTINA, 2001; LEITNER *et al.*, 2009).

1.1.3. Biossíntese

Os mecanismos pelos quais o NO é sintetizado em plantas ainda são controversos (CRAWFORD, 2006; FROHLICH & DURNER, 2011). Uma das rotas de biossíntese proposta tem como base estudos realizados em animais e sugere a produção do NO pela enzima sintase do óxido nítrico (NOS). Em mamíferos, a síntese do NO parece depender, em boa parte, da NOS, a qual promove a produção de NO e L-citrulina a partir da oxidação de L-arginina, utilizando O₂, NADPH, flavina, tiol e tetrahydro-L-biopterina como cofatores (WENDEHENNE *et al.* 2001; ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007; WOJTASZEC, 2000). De fato, existem alguns trabalhos apontando para a existência de atividade NOS em plantas semelhante àquela de mamíferos (CUETO *et al.*, 1996; NINNEMANN & MAIER, 1996; CORPAS *et al.* 2007), mas mesmo assim a existência dessa enzima é incerta. Os seguintes motivos contradizem a existência da NOS em plantas: nenhum gene que codifica uma NOS foi encontrado nas plantas superiores (ZEMOJTEL *et al.*, 2006; CRAWFORD *et al.* 2006; FROHLICH & DURNER, 2011); as respostas das plantas aos inibidores de NOS são muito variáveis (DURNER & KLESSIG, 1999); a tetrahydro-L-biopterina ainda não foi encontrada em plantas (ZEMOJTEL *et al.* 2006; CRAWFORD *et al.*, 2006; NEILL *et al.*, 2008). No entanto, foi caracterizada recentemente uma NOS na alga *Ostreococcus tauri*, que pertence a uma linhagem muito basal da linhagem das plantas verdes (FORESI *et al.*, 2011), aumentando a possibilidade de que as plantas superiores possuam uma enzima similar. Outra via de síntese do NO, mais bem estabelecida, é dependente da redutase do nitrato (NR), a enzima responsável pela redução do nitrato a nitrito na via de absorção do nitrogênio. Em um extrato purificado da enzima, foi detectada a emissão de NO a partir do nitrito, sendo essa emissão foi completamente bloqueada

pela adição de azida de sódio (YAMASAKI & SAKIHAMA, 2000). Vários outros trabalhos também associaram a produção de NO à atividade da NR (ROCKEL *et al.*, 2002; XU & ZHAO, 2003; SAKIHAMA *et al.*, 2002). A capacidade de a NR produzir NO *in vitro* foi estimada em aproximadamente 1% da atividade total da enzima, acreditando-se que *in vivo* essa capacidade gire em torno de 0,01–0,1% (ROCKEL *et al.*, 2002). Ainda assim, essa função da NR não deve ser subestimada, uma vez que em muitas espécies vegetais essa enzima mostrou ser uma importante fonte de produção de NO (YAMASAKI & SAKIHAMA, 2000). Também foi encontrada uma enzima na membrana plasmática das células radiculares de tabaco, a redutase do nitrito-NO (Ni-NOR), que também foi capaz de converter o nitrito em NO, utilizando elétrons provenientes de um doador ainda desconhecido (STOHR *et al.*, 2001). Além disso, o transporte de elétrons nas mitocôndrias pode também produzir NO *in vitro*, mas em tecidos intactos essa via não se mostrou muito significativa e por isso não está ainda bem estabelecida (PLANCHET *et al.*, 2005). RUMER *et al.* (2009) detectaram a formação de NO a partir de hidroxilaminas em culturas celulares quando em presença de oxigênio. Essa produção parece depender de espécies reativas de oxigênio (EROs) e esses autores sugeriram que as EROs seriam o fator limitante na produção de NO por essa via. Foi também proposta uma via de síntese do NO a partir das poliaminas espermidina e espermina (TUN *et al.*, 2006; YAMASAKI & COHEN, 2006), mas essa rota ainda não está bem caracterizada.

1.1.4. Metabolismo

Uma vez sintetizado, o NO reage principalmente com outras moléculas, gerando peroxinitrito, quando reagem com oxigênio ou peróxido de hidrogênio e

nitrito, quando reage com si próprio ou oxigênio (LEITNER *et al.*, 2009). O peroxinitrito é um intermediário nas reações de nitração de resíduos de tirosina, uma das formas pelas quais o NO interage com proteínas (BESSION-BARD *et al.*, 2008). Outras formas pelas quais a interação NO-proteína ocorre são a S-nitrosilação de resíduos de cisteína e a nitrosilação de metaloproteínas (ARASIMOWICZ & FLORYSZAK-WIECZOREK, 2007; BESSION-BARD *et al.*, 2009). Dessa forma, o NO pode regular, direta ou indiretamente, várias propriedades das proteínas, como conformação, atividade, ou até mesmo localização intracelular (LEITNER *et al.*, 2009). O NO pode se ligar reversivelmente à glutatona (GSH), gerando S-nitrosoglutatona (GSNO) (NEILL *et al.*, 2008). Sendo assim, a GSNO pode ser considerada tanto como uma forma de regulação ou armazenamento do NO livre quanto uma forma de transporte a longa distância (LEITNER *et al.*, 2009).

1.1.5. Funções conhecidas

Muitas pesquisas demonstram a importância do NO como sinalizador de uma grande variedade de processos nas plantas. Entre eles pode-se destacar: 1) abertura e fechamento estomático induzido pelo fitormônio ácido abscísico (ABA) (DESIKAN *et al.*, 2002; GARCÍA-MATA & LAMATTINA 2003; GARCÍA-MATA & LAMATTINA 2007); 2) resposta de hipersensibilidade (DELLEDONNE *et al.*, 1998; DURNER *et al.*, 1998; LEITNER *et al.*, 2009); 3) germinação (BETHKE *et al.*, 2004; BETHKE *et al.*, 2007); 4) desestiolamento e inibição do crescimento do hipocótilo e dos entrenós (BELIGNI & LAMATTINA, 2000). Nos processos 3 e 4, a via metabólica desencadeada pelo NO é similar àquela do fitocromo, o que pode indicar algum nível de interação entre essas duas moléculas (BELIGNI & LAMATTINA, 2000); 5) morte celular programada da camada de aleurona em

Arabidopsis thaliana, atuando após a ação do ácido giberélico (GA), um fitormônio que sabidamente atua nesse processo (LIBOUREL *et al.*, 2006; BETHKE *et al.*, 2007); 6) inibição da floração (SELIGMANN *et al.*, 2008), possivelmente através do silenciamento dos genes CONSTANS e GIGANTEA (promotores da floração) e indução da expressão do gene FLOWERING LOCUS C (inibidor da floração) (HE *et al.*, 2004); 7) inibição da senescência induzida pelo ABA (HUNG & KAO 2003); 8) aumento da competência à formação de gemas adventícias em bases foliares em abacaxizeiro (*Ananas comosus*) cultivadas *in vitro* (NARITA, 2010).

Recentemente, o Laboratório de Fisiologia Vegetal obteve resultados inéditos que associaram a produção de NO à indução ao metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em plantas jovens de abacaxizeiro C₃ (FRESCHI *et al.*, 2010). O nitroprussiato de sódio (SNP), um doador de NO, estimulou, de maneira dose dependente, o acúmulo noturno de ácidos orgânicos (principalmente ácido málico), aumentando, também, a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH). Esses parâmetros indicam fortemente que o CAM foi induzido nessas plantas cultivadas *in vitro* (FRESCHI *et al.*, 2010). De modo condizente, as análises da produção de NO, por meio da técnica de quimiluminescência, revelaram um aumento na produção desse radical livre durante a indução de *A. comosus* ao CAM em resposta ao estresse hídrico ou à aplicação de ABA. Adicionalmente, as análises *in situ* da produção de NO, por microscopia confocal, demonstraram que a elevação na síntese de NO nos tecidos foliares de abacaxizeiro ocorreu, principalmente, no parênquima clorofiliano, sendo este tecido um dos principais alvos das alterações metabólicas necessárias ao estabelecimento da fotossíntese CAM (FRESCHI *et al.*, 2010).

1.2. O metabolismo ácido das crassuláceas (CAM)

O CAM ocorre em aproximadamente 16.000 espécies, que englobam 328 gêneros contidos em 33 famílias (HERRERA, 2009). Dentro das famílias Bromeliaceae e Orchidaceae, esse tipo de fotossíntese ocorre em aproximadamente 50 a 60% das espécies epífitas (LARCHER, 2006). Já é bem estabelecido que essa forma de assimilação de CO₂ ajuda na adaptação das plantas a ambientes áridos, uma vez que os estômatos permanecem abertos predominantemente durante a noite, diminuindo bastante a perda de água por transpiração (WINTER *et al.*, 2005). Também é sugerido que esse tipo de metabolismo é capaz de proteger o aparato fotossintético da fotoinibição quando há baixa disponibilidade de água e/ou alta irradiância (LUTTGE, 2004). O CAM também é capaz de reciclar o CO₂ respirado (HERRERA, 2009). Algumas plantas, porém, chamadas de C₃-CAM facultativas, podem apresentar tanto metabolismo C₃ quanto CAM, alternando-os conforme as condições ambientais ou fases do desenvolvimento (SLESLAK *et al.*, 2003). A mudança do metabolismo C₃ para o CAM talvez seja uma das mudanças metabólicas mais complexas das plantas em resposta ao ambiente, já que é necessária uma integração da regulação nos níveis celular, tecidual e do organismo como um todo (FRESCHI & MERCIER 2011).

Entre os fatores ambientais que podem levar à indução ao CAM nas espécies C₃-CAM facultativas destacam-se o estresse hídrico, alta irradiância (MAXWELL *et al.*, 1994; CUSHMAN & BORLAND 2002; HASLAM *et al.*, 2003; SLESLAK *et al.*, 2003; LUTTGE, 2004) ou variações termoperiódicas de temperatura (NIEVOLA *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que essa mudança no tipo de fotossíntese pode se dar de maneira independente em folhas diferentes, como constatado por

SCHMITT *et al.*, (1988), ao submeterem folhas opostas de um mesmo nó a diferentes graus de umidade relativa do ar. Nessas plantas, o CAM foi induzido apenas nas folhas expostas ao ar seco.

Algumas pesquisas foram feitas para caracterizar a sinalização hormonal e molecular da transição ao CAM, tanto em resposta à ontogenia quanto a fatores ambientais usando como principal modelo *Mesembryanthemum crystallinum*, uma espécie na qual a transição C3-CAM é irreversível (CUSHMAN & BORLAND, 2002). As citocininas parecem atuar negativamente na indução ao CAM, uma vez que esse hormônio diminui a expressão do gene *Ppc1*, que codifica para a enzima PEPC em *M. crystallinum* (PETERS *et al.*, 1997). Por outro lado, já é bem conhecida a participação do ABA na indução ao CAM em *M. cristallinum* e *Kalanchöe blossfeldiana*, resultando na ativação do mesmo gene, o *Ppc1* (DAI *et al.*, 1994; TAYBI *et al.*, 1995; TAYBI & CUSHMAN, 1999). Nesse processo, também já foram descritas as participações do inositol 1,4,5-trifosfato, das proteínas cinase dependentes de Ca^{2+} , além do próprio Ca^{2+} (TAYBI & CUSHMAN, 1999). Uma vez que em diversos processos já descritos o Ca^{2+} participa da transdução de sinal do NO (ARASIMOWICZ & FLORIZAK-WIECZOREK, 2007), é possível, então, supor que o NO atue na transição C3-CAM interagindo com o ABA. De fato, estudos realizados por FRESCHI *et al.*, (2010) com plantas de abacaxizeiro *in vitro* apontam fortemente para uma rota de sinalização ao CAM na qual o ABA parece induzir a emissão de NO que, por sua vez, induz o acúmulo citossólico de cálcio. Estudos realizados por ABAT *et al.*, (2008) demonstram que, com a aplicação S-nitrosoglutaciona (um doador de NO), a PEPC pode ser S-nitrosilada *in vivo*, sugerindo que o NO também poderia atuar sem o intermédio do cálcio na regulação do CAM. Para aumentar a abrangência de estudos de transição ao metabolismo

CAM, o emprego de *Guzmania monostachia* pode representar mais um excelente modelo de estudo, por ser uma bromélia que pode alternar, em diferentes condições ambientais, entre o metabolismo C₃ e o CAM (FRESCHI *et al.*, 2009). Ao contrário, a espécie *M. crystallinum*, depois de convertida ao CAM não retorna mais à condição C₃ (MAXWELL *et al.*, 1994; CUSHMAN & BORLAND, 2002).

1.3. Fisiologia das folhas de bromélias

Por ser *G. monostachia* uma bromélia tanque epífita, as suas folhas podem apresentar algumas características particulares. TAKAHASHI *et al.* (2007) observaram que em bromélias epífitas, as folhas possuem um papel importante na absorção e assimilação de nutrientes, já que as raízes são pouco funcionais nesse sentido. Em espécies que apresentam tanque, grande parte da sua nutrição depende de compostos presentes na água acumulada ali. Assim, as bases foliares podem ter diferenças funcionais em relação ao ápice, uma vez que elas estão em contato direto com a solução nutritiva do tanque e os ápices não (FRESCHI *et al.*, 2009). Somado a isso, a incidência de luz decresce do ápice para a base da folha (FRESCHI *et al.*, 2009). Apesar de escassos, existem trabalhos apontando para esse tipo de separação funcional ápice-base. POPP *et al.*, (2003) dosaram os teores de ácidos orgânicos e carboidratos em cinco porções da folha de várias espécies de bromélias. Foi encontrado um gradiente de concentração, sendo que esses compostos se tornavam mais abundantes conforme a proximidade do ápice foliar. A concentração de nitrogênio também apresentou diferenças ao longo das folhas de *A. comosus*, sendo maior nas partes verdes (ápice) do que nas partes não-verdes (base) (MEDINA *et al.*, 2003). Também em abacaxizeiro, foi constatado que os tricomas (estruturas importantes para a absorção de nutrientes) do ápice foliar são pouco numerosos

comparativamente àqueles da base(SAKAI & SANDFORD, 1980). No nosso laboratório, TAKAHASHI *et al.* (2007), trabalhando com a bromélia-tanque epífita *Vriesea gigantea*, constataram que as enzimas sintetase da glutamina e desidrogenase do glutamato dependente de NADH apresentaram atividades significativamente maiores nos ápices foliares. Nessa mesma pesquisa, foram detectadas quantidades maiores de tricomas e menores de estômatos na base foliar, quando comparada ao ápice. Mais recentemente, além dos parâmetros já mencionados, foram detectadas maiores atividades da NR e da urease, além de teores de uréia mais altos na região basal das folhas, enquanto que no ápice os teores de clorofila, amido e carboidratos solúveis se apresentaram mais elevados (TAKAHASHI & MERCIER, 2011). Em *G. monostachia*, a atividade da NR se mostrou maior nas bases foliares quando comparadas ao ápice (PEREIRA, 2010 – dados não publicados). Em relação à indução do CAM, FRESCHI *et al.* (2009), mostraram que a expressão do CAM por estresse hídrico ao longo da folha de *G. monostachia* se dá de forma diferente, sendo mais intensa no ápice do que na base e que durante o estresse hídrico, a água presente nos tecidos da base parece ser mobilizada para o ápice. Nessa situação, portanto, o ápice parece não sofrer diretamente o estresse hídrico. No entanto, algum sinal deve ser transmitido da base para o ápice da folha, sinalizando o estresse hídrico. Esses resultados em conjunto mostraram claramente que existe uma divisão funcional ao longo do comprimento da folha, indicando que possivelmente a parte basal é mais especializada na absorção de nutrientes e a parte apical na realização da fotossíntese e assimilação do nitrogênio.

1.4. *Guzmania monostachia* e indução ao CAM

O Laboratório de Fisiologia Vegetal da Universidade de São Paulo investiga há mais de quinze anos o efeito de fitormônios nas mudanças metabólicas e ontogenéticas em plantas da família Bromeliaceae e Orchidaceae e, mais recentemente, iniciou estudos com o óxido nítrico (NO). O NO parece ser uma molécula de extrema importância nesses processos, interagindo também com os fitormônios clássicos (auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico e etileno) já bastante estudados.

Guzmania monostachia é uma bromélia epífita C3-CAM facultativa, que em seu hábitat é submetida anualmente a uma estação chuvosa e uma seca (MAXWELL *et al.*, 1994), sendo, portanto, uma planta que naturalmente alterna entre os dois tipos de fotossíntese. Esse fato torna esse material vegetal um excelente modelo biológico para a investigações acerca da sinalização da fotossíntese CAM.

Estudos anteriores feitos por MAXWELL *et al.* (1994) e, em nosso próprio laboratório, por FRESCHI *et al.* (2009), demonstraram que após a suspensão da rega por sete dias, essa espécie muda seu metabolismo fotossintético de C3 para CAM. Esses mesmos autores observaram ainda que essa alteração ocorreu em diferentes graus de intensidade ao longo do comprimento das folhas, sendo que na porção apical a transição ao CAM foi mais pronunciada. Esse resultado nos entusiasmou a acreditar que a participação do NO nesse processo possa ser bem caracterizada, uma vez que a magnitude da resposta CAM e a produção de NO podem ser avaliadas nas diferentes regiões da folha.

Uma vez que já foi sugerido que o NO participa na transição C₃-CAM de folhas jovens de abacaxizeiro, cujo cultivo *in vitro* na presença de PEG (polietilenoglicol 6000) levou a essa mudança de metabolismo (FRESCHI *et al.*, 2010), seria importante que esse possível envolvimento do NO fosse confirmado em

uma espécie reconhecidamente C3-CAM facultativa na natureza, como *Guzmania monostachia*. Além disso, seria importante determinar se folhas isoladas dessa bromélia, quando submetidas ao estresse hídrico, se converteriam a CAM, como acontece com plantas inteiras, reduzindo o modelo de estudo a folhas destacadas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho visou verificar se o NO estaria envolvido com a indução do metabolismo ácido das crassuláceas (CAM) em diferentes porções da folha (apical, mediana e basal) proveniente de plantas de *Guzmania monostachia* (L.), uma bromélia epífita com tanque C3-CAM facultativa, quando submetidas à escassez d'água. Folhas isoladas também foram empregadas na tentativa de minimizar o modelo de estudo a esse órgão.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Comparar o grau de expressão do CAM em uma planta inteira e em folhas destacadas, com base nos teores de acidez titulável.
- 2) Analisar o tempo mínimo necessário de exposição das folhas de *G. monostachia* ao déficit hídrico induzido por PEG para que ocorra a transição ao CAM, com base nos teores de acidez titulável.
- 3) Verificar a dinâmica temporal da perda de água em diferentes porções de folhas destacadas de *G. monostachia* quando submetida a uma solução de PEG a 30%.
- 4) Analisar as atividades das enzimas PEPC e MDH para diferentes porções de folhas isoladas de *G. monostachia* ao longo do tempo de transição ao CAM.
- 5) Quantificar a emissão de NO em duas porções foliares (basal e apical) por meio de espectrofluorimetria nos dias anteriores à transição ao CAM.

- 6) Quantificar o teor de ABA nas regiões basal e apical de folhas isoladas, ao longo dos últimos 3 dias de transição ao CAM .
- 7) Localizar a produção *in situ* de NO nas três porções foliares por meio de microscopia de fluorescência.
- 8) Verificar a influência de SNP, um doador de NO, na indução ao CAM em folhas isoladas.
- 9) Quantificar a emissão de NO em fluxo contínuo por meio de quimioluminescência.

3. Material e métodos

3.1. Material vegetal e transição ao CAM

Material vegetal

O material vegetal utilizado foram plantas de *Guzmania monostachia* (L.) Rusby ex Mez, crescidas inicialmente em laboratório (cultivo *in vitro*) e depois cultivadas em casa de vegetação até a idade adulta. Também foram feitos experimentos com folhas destacadas, retiradas do oitavo ao décimo segundo nó das plantas adultas.

Transição ao CAM

Plantas adultas provenientes de casa de vegetação foram transferidas para uma câmara de crescimento localizada no Laboratório para sua aclimação. Em experimentos nos quais foram utilizadas plantas inteiras, o déficit hídrico consistiu na suspensão de rega, enquanto as plantas controle eram regadas diariamente. Nesse caso, após o período experimental foram retiradas as folhas do oitavo ao décimo segundo nó para as análises de acidez titulável. No experimentos com folhas isoladas, foram retiradas, sob a água, as folhas do oitavo ao décimo segundo nó de cada planta. As folhas foram então mantidas dentro de frascos do tipo borel, com as bases imersas em 10 mL de água (controle) ou, para provocar o déficit hídrico, mantidas no mesmo volume de uma solução com 30% de polietilenoglicol (PEG) 6000. Uma pequena parte da região basal das folhas ficou submersa durante o experimento, sendo, portanto, essa parte descartada para as análises bioquímicas.

Tanto nos experimentos que utilizaram folhas isoladas quanto nos experimentos empregando plantas inteiras, as folhas foram divididas em três partes após o período experimental. São elas: basal, correspondente à região da bainha

foliar, caracterizado por ser um tecido com pouca clorofila, mediana e apical, ambas porções da lâmina foliar verde (**Figura 1**).

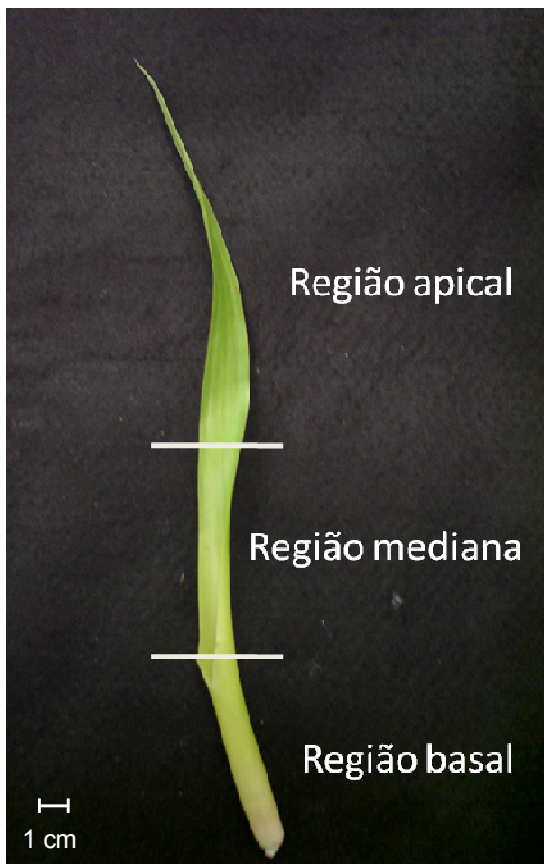


Figura 1: Folha de *G. monostachia* subdividida em três porções: apical, mediana e basal

Ao longo do tempo de transição ao CAM, foram retiradas amostras de 0,5 grama de massa fresca de cada porção foliar visando à realização da análise da variação de acidez, teor de água nas folhas e das atividades das enzimas PEPC e MDH, além das dosagens de ABA e NO. Durante esse período, as folhas destacadas ou plantas inteiras foram mantidas na sala de crescimento, que possuía as seguintes condições ambientais: temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$, umidade relativa do ar de 70%, fotoperíodo de 12 horas e intensidade luminosa de $250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Adicionalmente, as folhas destacadas foram colocadas em câmaras com cobertura de plástico transparente para sua maior proteção contra perda de umidade e vento (**Figura 2**).

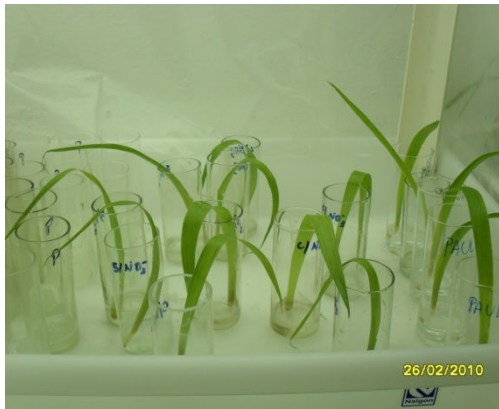


Figura2: Folhas destacadas de *G. monostachia* dentro de boréis colocados em bandejas com cobertura de plástico transparente.

Tratamento com doador de NO (SNP)

Foram testadas duas concentrações de nitroprussiato de sódio (SNP): 1mM, com renovação dessa solução durante os três primeiros dias e 100 μ M, com renovação durante todos os dias. No caso das folhas expostas a 100 μ M de SNP, elas foram mantidas em uma câmara de acrílico vedada para que houvesse um maior acúmulo de NO. Paralelamente, foram mantidas folhas em água, conforme citado no item “transição ao CAM”, como controle. As condições experimentais de temperatura, umidade e luminosidade foram as mesmas citadas anteriormente.

Em todos os casos, foram feitas coletas no sétimo dia para as análises de acidez titulável e teor de água nas folhas.

3.2 Avaliação do grau de expressão do CAM

Acidez titulável

Para a quantificação da acidez titulável, foram coletadas tanto amostras provenientes de plantas inteiras como de folhas isoladas, conforme descrito anteriormente. Alíquotas de 0,5g de massa fresca oriundas das diferentes porções

foliares foram coletadas em dois momentos: uma hora após o início do período luminoso da sala de crescimento e uma hora antes do término do mesmo. As amostras foram então maceradas em nitrogênio líquido, homogeneizadas com 20 ml de água ultrafiltrada (Milli-Q) fervida e incubadas por 15 minutos em banho-maria a 100°C. Após a filtração, as soluções foram analisadas quanto à acidez por meio de titulação com 20 mM de NaOH até o pH 11 (FRESCHI *et al.*, 2009). Os resultados foram expressos como a diferença entre a acidez obtida no início e no final do período luminoso.

Ensaio enzimáticos: PEPC e MDH

Amostras de 0,5g de material fresco, coletadas uma hora após o início do período luminoso e provenientes das diferentes porções foliares foram maceradas em nitrogênio líquido e em seguida imersas em tampão de extração (pH 8), composto por 100 mM de Tris-HCl, MgCl₂, 1mM de ditioneitol (DTT) e 1mM de EDTA. As amostras foram centrifugadas a 15.000g por 2 minutos. O sobrenadante resultante foi coletado e utilizado nos ensaios enzimáticos.

O ensaio para a PEPC foi feito a 30°C em 2 ml de um meio de reação, contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaHCO₃, 20 mM NADH e 3 mM fosfoenolpiruvato (PEP). A reação foi iniciada com a adição de 400 µL do extrato (adaptado de NIEVOLA *et al.*, 2005).

Para o ensaio da atividade da MDH foi avaliado o consumo de NADH, em um meio de reação contendo Tris-HCl 50 mM (pH 8.0), 5 mM MgCl₂, e 0.2 mM NADH e 2mM de oxaloacetato. A reação foi iniciada pela adição de 400 µL do extrato (FRESCHI *et al.*, 2009).

Nos dois ensaios, o consumo de NADH foi quantificado em espectrofotômetro (340 nm) no momento inicial da reação e após 4 minutos. Essas análises foram realizadas em triplicatas.

3.3. Conteúdo hídrico

Uma vez que as folhas submetidas ao PEG 30% e aquelas mantidas em água estavam com diferentes níveis de hidratação, a utilização de massa fresca (MF), como indicadora da quantidade de material, poderia mascarar os resultados. Assim, amostras contendo 0,5g de massa fresca retiradas de folhas submetidas a todos os tratamentos foram mantidas por 48 horas em uma estufa a 60°C, para a obtenção das medidas de massa seca (MS). Uma vez obtidos os valores de MS, eles foram divididos pela quantidade original de massa fresca (0,5g), obtendo-se, assim, uma razão entre a massa fresca e a massa seca. Esses valores foram usados para expressar os resultados obtidos em todos os experimentos. A porcentagem de água contida no tecido vegetal, que foi empregada como indicativo do grau de déficit hídrico sofrido, foi calculada a partir da equação: $[(MF - MS)/MF] \times 100$.

3.4. Dosagem de ABA

Amostras das três porções de folhas que permaneceram em água ou em PEG 30% foram coletadas, pesadas e armazenadas a -80°C para a determinação dos teores de ABA por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GC-MS). Cada amostra foi macerada com 500 µL de uma mistura de isopropanol e ácido acético na proporção de 95% e 5%, respectivamente e, em seguida, agitadas e mantidas por duas horas sob agitação a 4°C, utilizando-se $[^2H_6](+)-cis,trans$ -ácido abscísico (D-ABA) como padrão interno. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13.200

rpm por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e seco em fluxo de nitrogênio, até que restasse apenas 50 µL do extrato. Em seguida, foram adicionados 500 µL de acetato de etila e os extratos foram agitados em vortex durante 1 minuto, antes de serem centrifugados a 13.200 rpm por 5 minutos para a separação de fases. A fase superior foi coletada e o processo de separação de fases foi repetido com mais 500 µL de acetato de etila. A fase superior foi então seca em fluxo de N₂, metilada com 10 µL de trimetilsilil-diazometano e levada para a análise por GC-MS. A etapa seguinte foi realizada no Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, com a colaboração do Dr. Eduardo Purgatto. As amostras metiladas foram solubilizadas com 30 µL de acetato de etila e, então, analisadas em cromatógrafo a gás (CG) Hewlett-Packard modelo 6890 acoplado a um espectrômetro de massas modelo 5973. Utilizou-se uma coluna de separação HP-1701 (30 m, D.I. 0,25 mm, I.T. 0,5 µm), tendo hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 mL min⁻¹. As injeções foram realizadas por meio de injetor automático Hewlett-Packard modelo LS-1100 e o volume injetado de cada amostra foi de 2 µL, sem a utilização do divisor de amostras (splitless), com fluxo de ventilação de 20 mL min⁻¹ após 2 minutos da injeção. A coluna foi mantida a 150°C por 3 minutos, seguida de rampa de temperatura de 150°C até 200°C em taxa de 4°C min⁻¹ e, por fim, de 200°C até 300°C em taxa de 10°C min⁻¹. A quantificação do ABA foi realizada por cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas, com monitoramento seletivo de íons (GC-MS-SIM), conforme descrito em Ludwig-Muller et al. (2008). Foram monitorados os íons com relação massa/carga (m/z) 134, 162 e 190 correspondentes ao ABA endógeno e 138, 166 e 194 correspondentes ao [²H₆]-ABA. A concentração endógena de ABA foi obtida pela comparação entre as áreas dos picos nos cromatogramas extraídos em m/z 190 e 194.

3.5. Quantificação de NO e H₂O₂

Quantificação da emissão de NO por quimioluminescência

Para a quantificação da emissão de NO por quimioluminescência, folhas destacadas foram mantidas em água ou em PEG 30% por 7 dias, em uma câmara vedada submetida a um fluxo contínuo de ar sintético livre de NO (1,5 L. min⁻¹). O ar de saída da câmara foi constantemente analisado por um detector de NO por quimioluminescência (CLD 770 AL ppt; Eco Physics; com limite de detecção de até 20 ppt; tempo de resolução de 20 segundos).

Quantificação de NO por espectrofluorimetria e de H₂O₂ por ensaio enzimático

Amostras pertencentes a folhas destacadas mantidas por até 7 dias em água ou em uma solução de PEG 6000 a 30% foram pesadas e coletadas no período de uma hora após o início do fotoperíodo. As amostras foram divididas em dois lotes, sendo um deles destinado à quantificação de NO por espectrofluorimetria e outro à dosagem de H₂O₂ por meio de ensaio enzimático.

As amostras destinadas à espectrofluorimetria foram fragmentadas, acondicionadas em microtubos e incubadas em uma solução de DAR4M a 75 µM em tampão fosfato (50mM, pH 7,2) por 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 1,5mL de tampão e as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e foram adicionados mais 1,5mL de tampão. Finalmente, as amostras foram lidas em espectrofluorímetro com comprimento de onda de excitação de 560 nm e emissão de 575 nm. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias de fluorescência, que representam a fluorescência quantificada corrigida pela quantidade de massa seca utilizada.

Para a dosagem de H₂O₂ as amostras foram incubadas em uma solução contendo 100 µM de 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico (DCHBS), 10 µM de 4-aminoantipirina (AAP), 10 µM de peroxidase por 120 minutos. Em seguida, a absorbância das amostras foi aferida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 510 nm, representando a oxidação do DCHBS pela peroxidase em presença de H₂O₂ e a coloração desse complexo por meio da sua ligação com a AAP.

3.6. Localização *in situ* do NO

Amostras das folhas destacadas mantidas por 7 dias em água ou em PEG 30% foram divididas em três porções, cada porção cortada com micrótomo de Ranvier e, após o corte, incubadas por 30 minutos em uma solução de DAR4M-AM a 0,5 µM. Parte desses cortes foi mantida em água durante o mesmo intervalo de tempo como controle. Depois do período de incubação, foram montadas lâminas temporárias contendo os cortes. As lâminas obtidas foram imediatamente observadas em microscópio de fluorescência (Leica DMLB) equipado com uma câmera digital (Leica DFC 320) e filtro (Leica N 2.1) de comprimentos de onda de excitação de 560 nm e emissão de 575 nm.

3.7. Análise estatística

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

4. Resultados

4.1. Caracterização do tipo de fotossíntese em folhas de plantas inteiras submetidas a suspensão de rega ou em folhas isoladas submetidas ao PEG

A **Figura 3** mostra o acúmulo noturno de acidez em folhas pertencentes a plantas inteiras submetidas à suspensão de rega (ou regadas diariamente - controle) e em folhas que foram destacadas antes de permanecerem em uma solução de PEG 30% (ou em água - controle). A concentração da solução de PEG foi escolhida após testes preliminares (resultados não mostrados). As amostras de folhas provenientes de plantas inteiras foram coletadas após 7 dias e o experimento realizado em casa de vegetação. Pôde-se notar que de modo geral o comportamento das folhas em ambos os casos foi bastante semelhante. Entretanto, a condição de folha isolada submetida ao PEG apresentou um forte acúmulo de acidez nas porções mediana e apical quando comparada às folhas provenientes da planta inteira. Assim, deste experimental, concluiu-se que a transição fotossintética nas folhas isoladas de *G. Monostachia* submetidas ao PEG parece acontecer de modo semelhante ao de folhas retiradas de plantas inteiras submetidas à suspensão de rega. Após a obtenção desses resultados, foram utilizadas apenas folhas isoladas ao longo dos experimentos, visto que ocupavam menos espaço na sala de crescimento do laboratório e eram mais práticas para manipular nas câmaras vedadas que foram utilizadas nos experimentos envolvendo a dosagem e aplicação de NO.

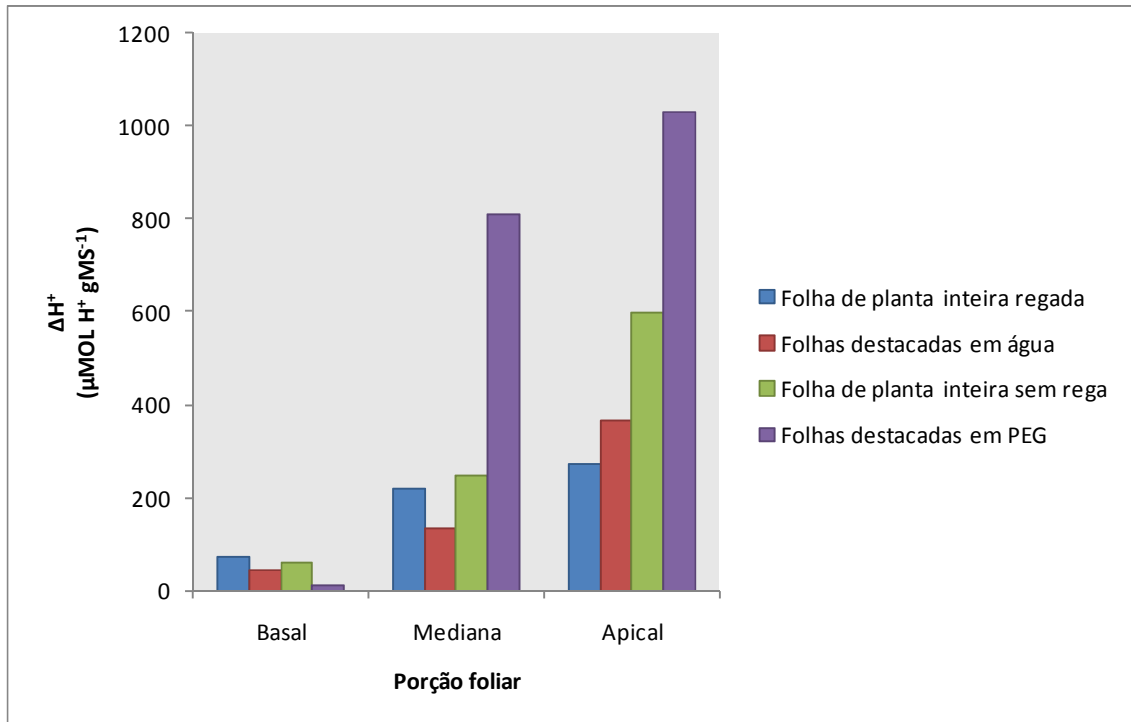


Figura 3: Acúmulo noturno de acidez em folhas retiradas de plantas inteiras mantidas com ou sem rega por 7 dias e em folhas isoladas mantidas em água ou em uma solução de PEG 30% pelo mesmo período.

No início do projeto, foram obtidas folhas isoladas que não eram capazes de se manter C3 (controle), mesmo permanecendo em água durante o período experimental. Para que as folhas pudessem responder de maneira significativa ao tratamento com PEG, foi confeccionada uma cobertura de plástico transparente para minimizar a perda de água do ambiente que circundava as folhas (**Figura 2**). Dessa forma, foi possível obter folhas isoladas que, mesmo após 8 dias (possivelmente mais), eram capazes de se manter C3 quando em água. Essas câmaras foram utilizadas nos experimentos até o final da pesquisa.

4.2. Efeito da adubação prévia de *G. monostachia* sobre a transição C₃-CAM

Em um dos testes preliminares realizados ao longo deste projeto, as plantas foram regadas com uma solução nutritiva comercial (NPK 10:10:10) 5 dias antes de

terem as folhas destacadas para serem usadas nos experimentos. Nessas condições, após 7 dias, mesmo as folhas que permaneceram em PEG, apesar de terem acumulado ácido durante a noite, não apresentaram uma quantidade que classificaria seu comportamento como CAM (**Figura 4**). No entanto, a condição hídrica das folhas foi semelhante àquela das folhas que anteriormente haviam sido induzidas ao CAM (como será mostrado a seguir), indicando a existência de déficit hídrico na base foliar. Com base nisso, pôde-se formular a hipótese de que a adubação reprimiu, ou ao menos retardou a transição C3-CAM. Baseando-se nesses resultados, as plantas utilizadas no projeto passaram a ser adubadas com uma antecedência de, no mínimo, um mês antes da retirada das folhas, evitando assim a diminuição da expressão do CAM.

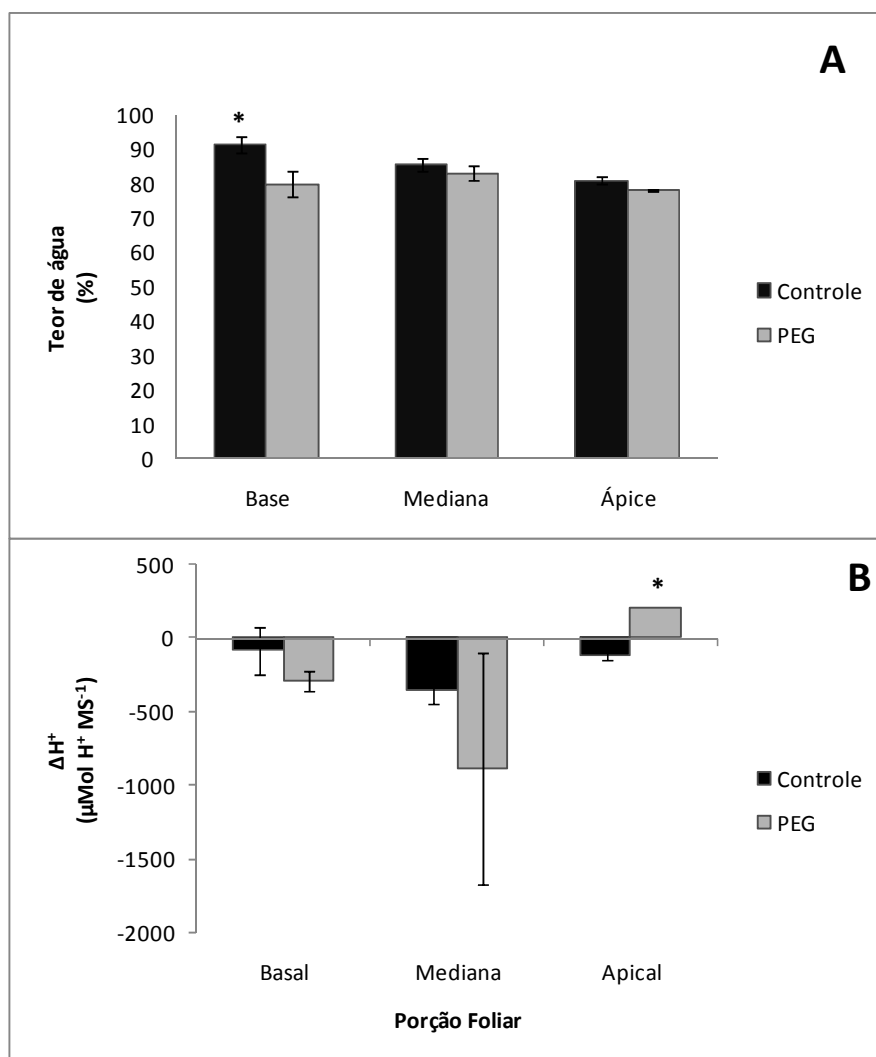


Figura 4: Teor de água (%) (A) e acúmulo noturno de acidez ($\mu\text{Mol H}^+ \text{MS}^{-1}$) (B) de folhas destacadas mantidas por 7 dias em sala de crescimento em frascos contendo água ou PEG. Asteriscos representam diferenças estatísticas entre os tratamentos, segundo o teste T de student em nível de 5% de significância.

4.3. Variações dos teores de água e da acidez noturna

Folhas isoladas foram mantidas em frascos do tipo borel, os quais foram colocados em bandejas com cobertura de plástico transparente (**Figura 2**) e mantidas em sala de crescimento por até 7 dias. As folhas foram imersas em 10 mL de água ou de solução de PEG a 30%. As **figuras 5 e 6** mostram os resultados do conteúdo de água (expresso em porcentagem) nas três porções das folhas nas primeiras 24 horas de exposição ao PEG e ao longo dos 7 dias de experimento, respectivamente.

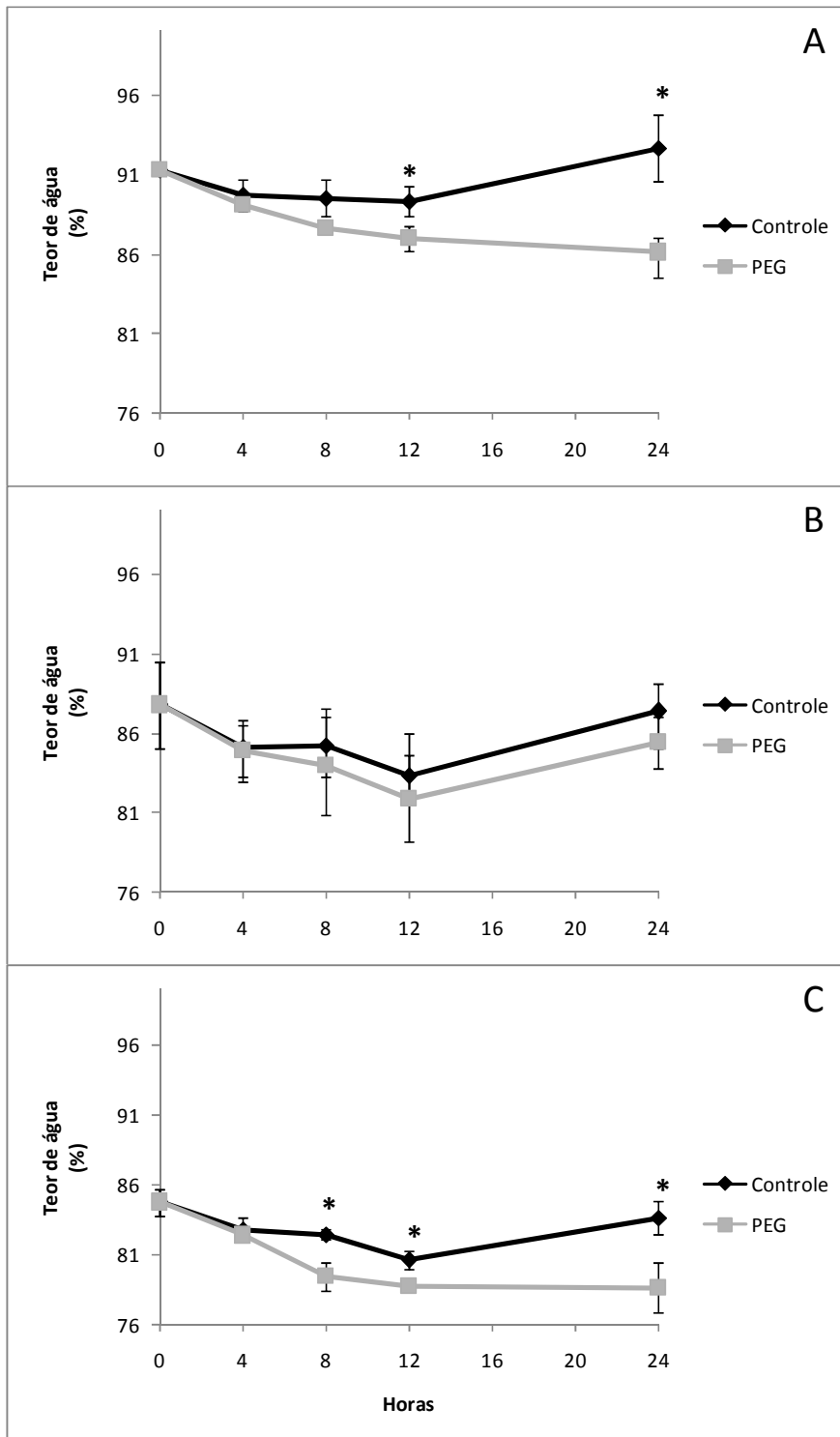


Figura 5: Teor de água (%) nas regiões basal (A), mediana (B) e apical (C) de folhas destacadas mantidas por até 24 horas em sala de crescimento, em frascos contendo água ou PEG 30%. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos, segundo o teste de T de Student em nível de 5% de significância.

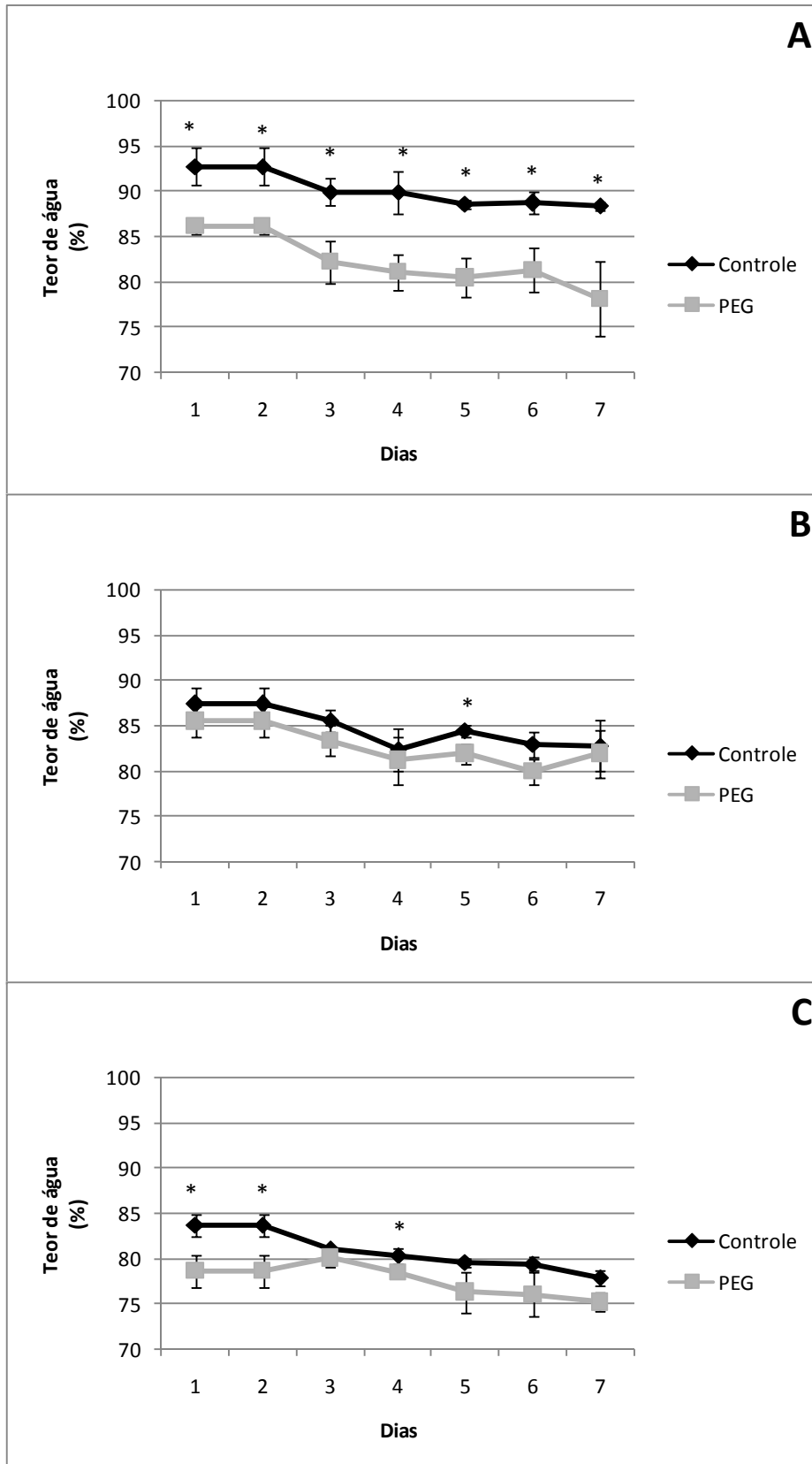


Figura 6: Teor de água (%) nas regiões basal (A), mediana (B) e apical (C) de folhas destacadas mantidas por até 7 dias em sala de crescimento, em frascos contendo água ou PEG 30%. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos, segundo o teste de T de Student em nível de 5% de significância.

Com base nos resultados da **Figura 5**, pode-se notar que o teor de água decresceu marcadamente nas bases foliares ao final das primeiras 24 horas do período experimental, indicando que possivelmente as folhas submetidas ao PEG estavam sob estresse hídrico. De maneira interessante, as porções mediana e apical das folhas apresentaram uma menor diminuição no teor de água mesmo após serem mantidas por 7 dias em PEG, comparativamente ao da porção basal. Nos dois primeiros dias (**Figura 6**), houve diferenças significativas quanto ao teor de água também na porção apical, mas essas diferenças desapareceram nos dias seguintes. Ao contrário, apenas a região basal apresentou diferença significativa após 7 dias na presença do PEG.

De acordo com a **figura 7**, pode-se constatar que o acúmulo noturno de ácidos, característica do CAM, sofreu um aumento marcante do sexto para o sétimo dia, nas regiões mediana e apical, com destaque quantitativo para essa última porção. As bases não apresentaram uma variação noturna de ácidos característica do CAM, embora, intrigantemente, tenha sido notado um acúmulo diurno deles (variação negativa de acidez). Esse resultado não havia sido obtido anteriormente, como mostra a **Figura 3**, de sorte que os motivos pelos quais isso ocorreu estão ainda sendo investigados. A porção mediana se mostrou intermediária em termos de acidez entre as porções apical e basal.

Embora tenham sido recolhidas amostras para a realização das análises de acidez titulável ao longo de 7 dias, os primeiros dias foram feitos a partir de um lote experimental diferente, devido à falta de espaço na sala de crescimento para conduzir todo o experimental simultaneamente. Sendo assim, foram obtidos resultados não conclusivos (não mostrados), muito provavelmente devido a pequenas variações nas condições ambientais da sala de crescimento durante o período de aclimação das

plantas. Preferiu-se, portanto, discutir os resultados de somente um dos experimentais (de 4 a 7 dias).

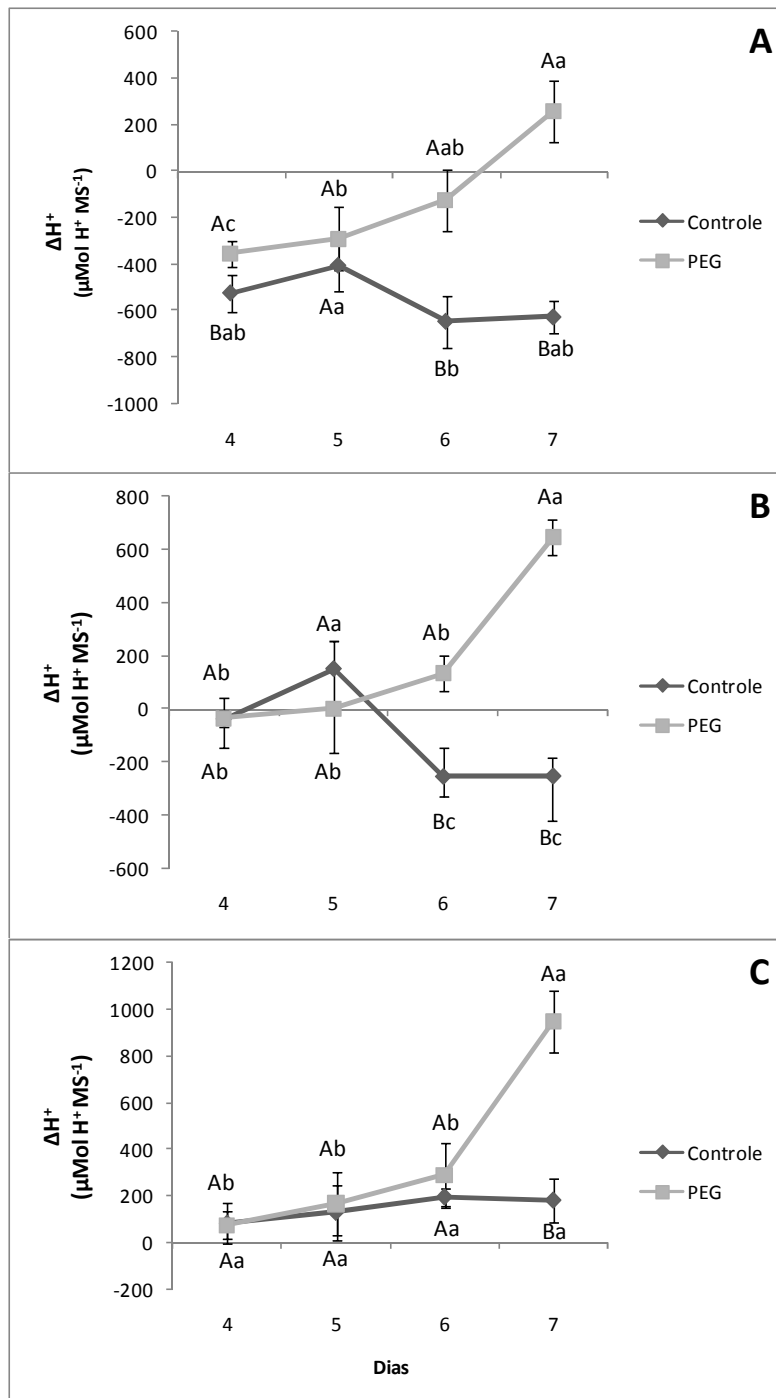


Figura 7: Acúmulo noturno de acidez ($\mu\text{Mol H}^+ \text{MS}^{-1}$) nas porções basal (A), mediana (B) e apical (C) de folhas destacadas mantidas por até 7 dias em sala de crescimento, em água ou em uma solução de PEG 30%. Letras maiúsculas representam diferenças entre os tratamentos, segundo o teste T de Student, e letras minúsculas representam diferenças entre as amostras de uma mesma série temporal, segundo o teste de Fisher em nível de 5% de significância.

4.4. Atividades da PEPC e da MDH

No período de 5 a 7 dias foram medidas as atividades das enzimas PEPC e MDH (**Figura 8**), além do teor de água no sétimo dia (resultado não mostrado) visando confirmar a perda de água dos tecidos foliares quando na presença de PEG.

A enzima PEPC apresentou um aumento significativo no sétimo dia nas folhas, particularmente na região apical, quando mantidas em PEG. Coincidentemente, nesse mesmo dia foi detectado um aumento significativo no acúmulo noturno de ácidos (**Figura 7**). Quanto às porções basal e mediana, não houve diferença significativa entre tratamento e controle.

Já a atividade da enzima MDH não se comportou da maneira esperada, mostrando valores significativamente maiores na porção basal das folhas controle nos três dias analisados. No entanto, pode-se notar que a atividade dessa enzima é bem superior na região apical da folha, quando comparada à basal.

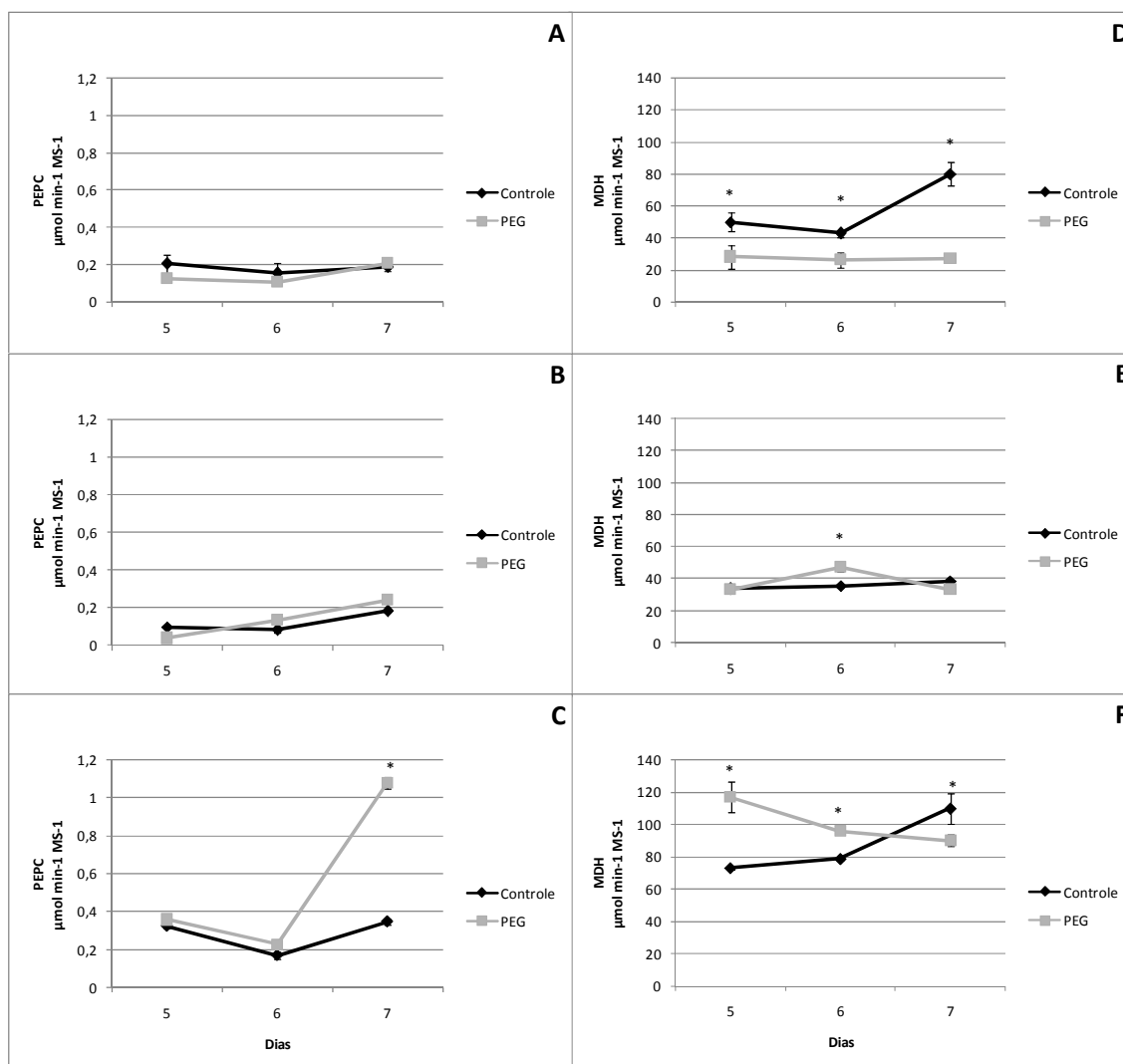


Figura 8: Atividade das enzimas PEPC (A-C) e MDH (D-F) nas porções basal (A, D), mediana (B, E) e apical (C, F) de folhas destacadas mantidas de 5 a 7 dias em água ou em uma solução de PEG 30%. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos, segundo o teste de T de Student em nível de 5% de significância.

4.5. Atividade da PEPC e da MDH, teor de acidez titulável e teor de água em folhas isoladas mantidas por 8 dias consecutivos em déficit hídrico

Tendo em vista que os resultados de acúmulo de acidez noturna (**figura 7**) e atividade da PEPC (**figura 8**) mostraram um aumento apenas no sétimo dia de exposição ao PEG, optou-se por montar um novo experimento no qual as folhas isoladas foram mantidas por 8 dias em PEG ou em água. Após esse período, foram analisados o teor de água, de acidez titulável e a atividade das enzimas PEPC e

MDH. Esses resultados estão mostrados na **Figura 9**. Como se pode notar pelo teor de água, essas folhas, apesar de terem ficado por 8 dias em PEG, não tinham diminuído seu conteúdo hídrico de maneira tão intensa quanto aquelas que ficaram no experimento anterior por 7 dias (**Figura 6**). Pode também ser visto, com base nos teores de acidez titulável, que a transformação ao CAM ocorreu de forma mais branda nessas folhas, sendo compatível com a menor perda d'água observada. Quanto às enzimas PEPC e MDH, houve um aumento na atividade de ambas, da base para o ápice da folha, principalmente nas folhas submetidas ao PEG. Nesse experimento a enzima MDH se comportou conforme o esperado, diferentemente dos resultados apresentados na **Figura 8**. Ao compararmos os resultados dos ensaios enzimáticos (**figura 9 C e D**) com os teores de acidez titulável (**figura 9 B**) na região basal, pode-se ver que o aumento diurno de acidez nessa região parece não estar diretamente relacionado com a indução ao CAM, uma vez que as atividades das enzimas PEPC e MDH não seguiram um padrão similar àquele do acúmulo de ácidos.

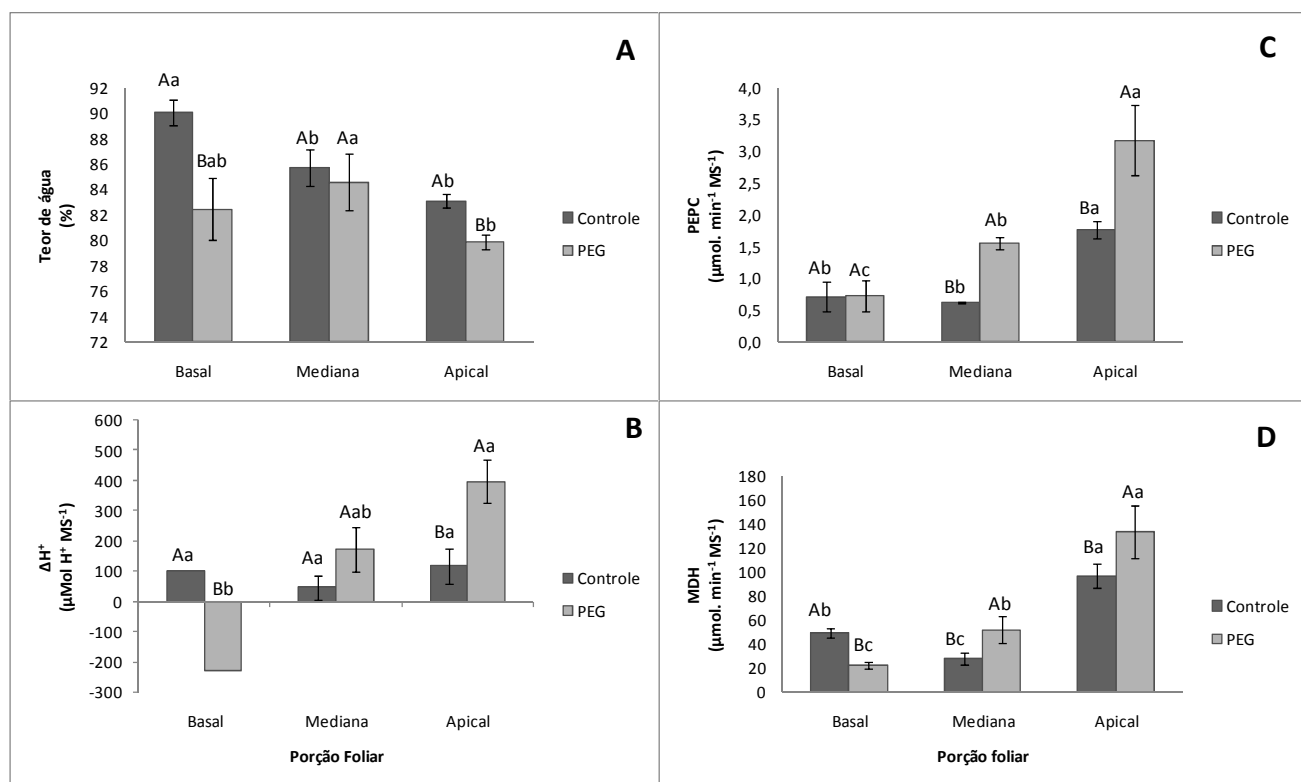


Figura 9: Teor de água (A), acúmulo noturno de acidez (B), atividades da PEPC (C) e da MDH (D) em três porções foliares de folhas destacadas que foram mantidas por 8 dias em sala de crescimento, imersas em água ou em PEG 30%. Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas entre os tratamentos, segundo o teste T de Student, e letras minúsculas representam diferenças entre as porções foliares, segundo o teste de Fisher em nível de 5% de significância.

4.6. Quantificação do teor endógeno de ABA

A **Figura 10** mostra a dosagem do ABA pela técnica de GC-MS. Também foram feitas dosagens pela técnica de HPLC-ELISA, apresentando um perfil similar (resultados não mostrados). Visto que nos demais experimentos a porção mediana estava sempre com valores intermediários entre a apical e a basal, optou-se por descartá-la para a quantificação de ABA e de NO.

Como se pode notar, os níveis de ABA permaneceram significativamente mais elevados nas folhas submetidas ao PEG nos três dias analisados e nas duas porções, sendo que na região apical esse aumento foi muito superior àquele da região basal. Essa diferença entre controle e tratamento diminuiu até o sétimo dia.

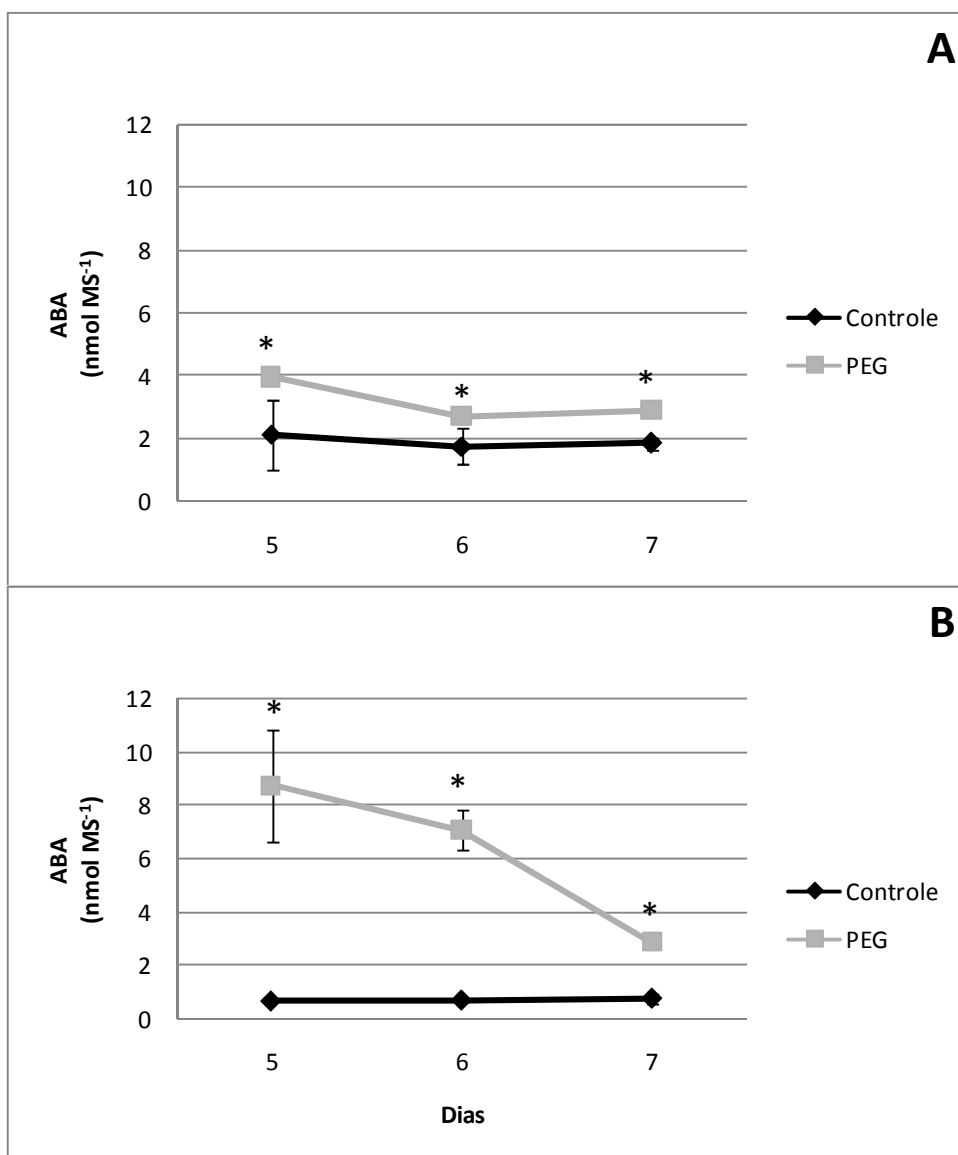


Figura 10: Teores endógenos de ABA obtidos nas porções basal (A) e apical (B) de folhas destacadas e mantidas por 5 a 7 dias em sala de crescimento, em água ou em solução de PEG 30%. Os asteriscos indicam que houve diferença significativa entre os tratamentos, segundo o teste de T de Student em nível de 5% de significância.

4.7. Quantificação de NO e H₂O₂

A **Figura 11** mostra a quantidade de NO medida por fluorescência emitida após a incubação com DAR4M das porções basal e apical de plantas mantidas em PEG por até 7 dias. Pôde-se observar que os teores de NO foram mais elevados

apenas nos ápices das folhas submetidas ao PEG (**figura 10 B**), diferentemente do ABA, cujo teor foi maior nas duas porções da folha sob déficit hídrico.

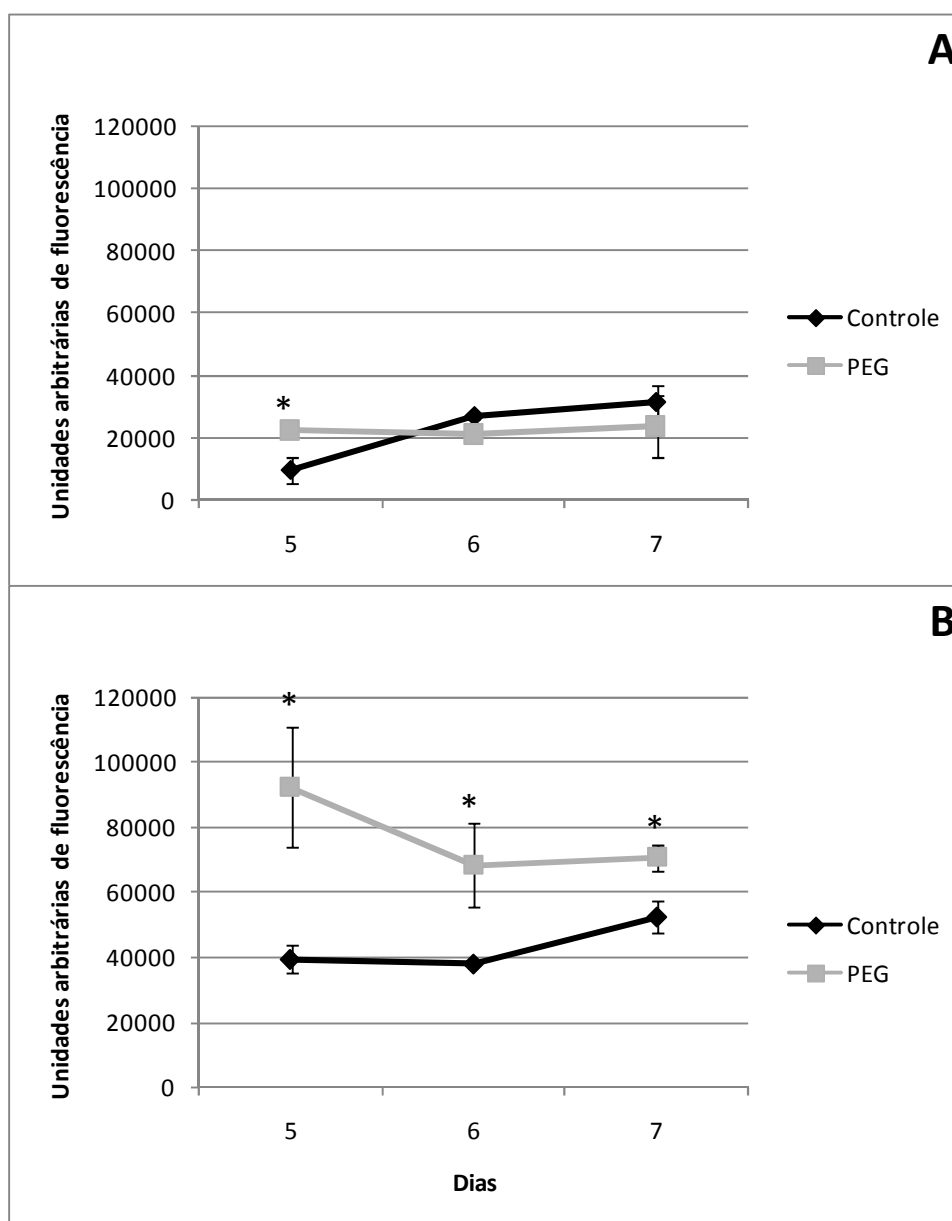


Figura 11: Unidades arbitrárias de fluorescência nas regiões basal (A) e apical (B) de folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em PEG ou em água por até 7 dias. Asteriscos indicam diferença estatística entre os tratamentos segundo o teste T de Student em nível de 5% de significância.

Uma vez que o peróxido de hidrogênio também pode se ligar ao DAR4M, provocando um aumento na fluorescência, ele também foi quantificado por meio de ensaios bioquímicos. A **Figura 12** mostra a dosagem de H_2O_2 nas duas porções foliares, as quais foram também analisadas por espectrofluorimetria. A quantidade de

peróxido de hidrogênio foi mais elevada apenas na região basal das folhas sob déficit hídrico, em contraste com os resultados obtidos na espectrofluorimetria. Esses resultados indicam, portanto, que houve pouca interferência dessa espécie reativa de oxigênio na emissão de fluorescência pelo DAR4M.

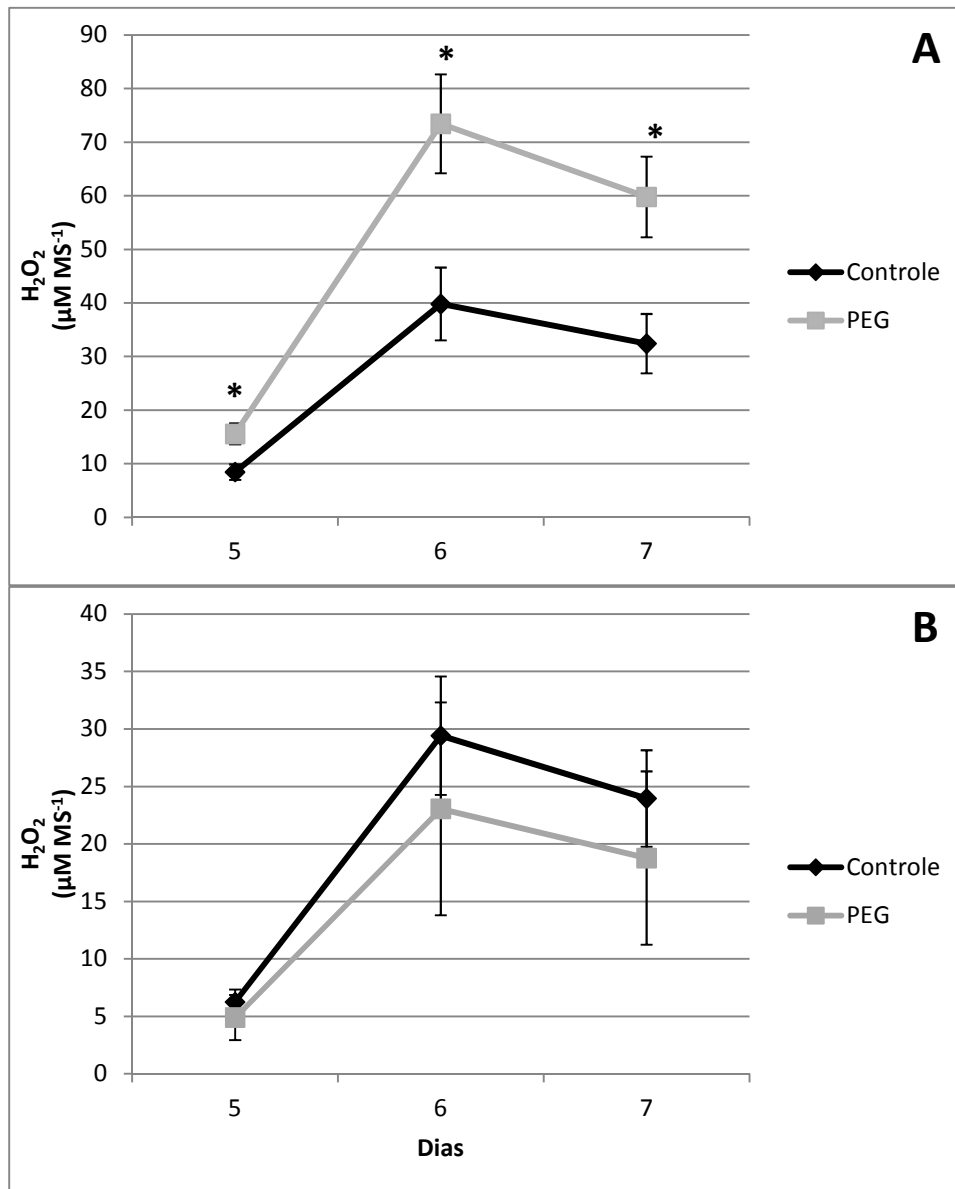


Figura 12: Quantidade de H₂O₂ medida nas regiões basal (A) e apical (B) de folhas destacadas de *G. monostachia* mantidas em PEG ou em água por até 7 dias. Asteriscos indicam diferença estatística entre os tratamentos segundo o teste de Tukey em nível de 5% de significância.

4.8. Localização *in situ* do NO por microscopia de fluorescência

Foram obtidas micrografias das três regiões de folhas mantidas em água ou em PEG 30% ao longo de 7 dias (**Figuras 13, 14 e 15**). Com base nas imagens, é possível perceber um aumento da fluorescência (vermelho) nos primeiros dois dias nas folhas submetidas à solução de PEG, ao longo de todo o seu comprimento, com relação ao controle. A região basal do controle e do tratamento apresentaram maior fluorescência do que as demais regiões no primeiro dia. No quinto dia, notou-se um aumento na fluorescência ao longo de todo o comprimento das folhas controle. No sexto e no sétimo dias, as folhas mantidas em PEG voltaram a mostrar uma fluorescência mais intensa em todas as porções, precisamente quando se detectou um teor mais elevado de ABA (**Figura 10**) e quando iniciou-se um aumento do acúmulo de acidez (**Figura 7**) nas plantas mantidas em PEG.

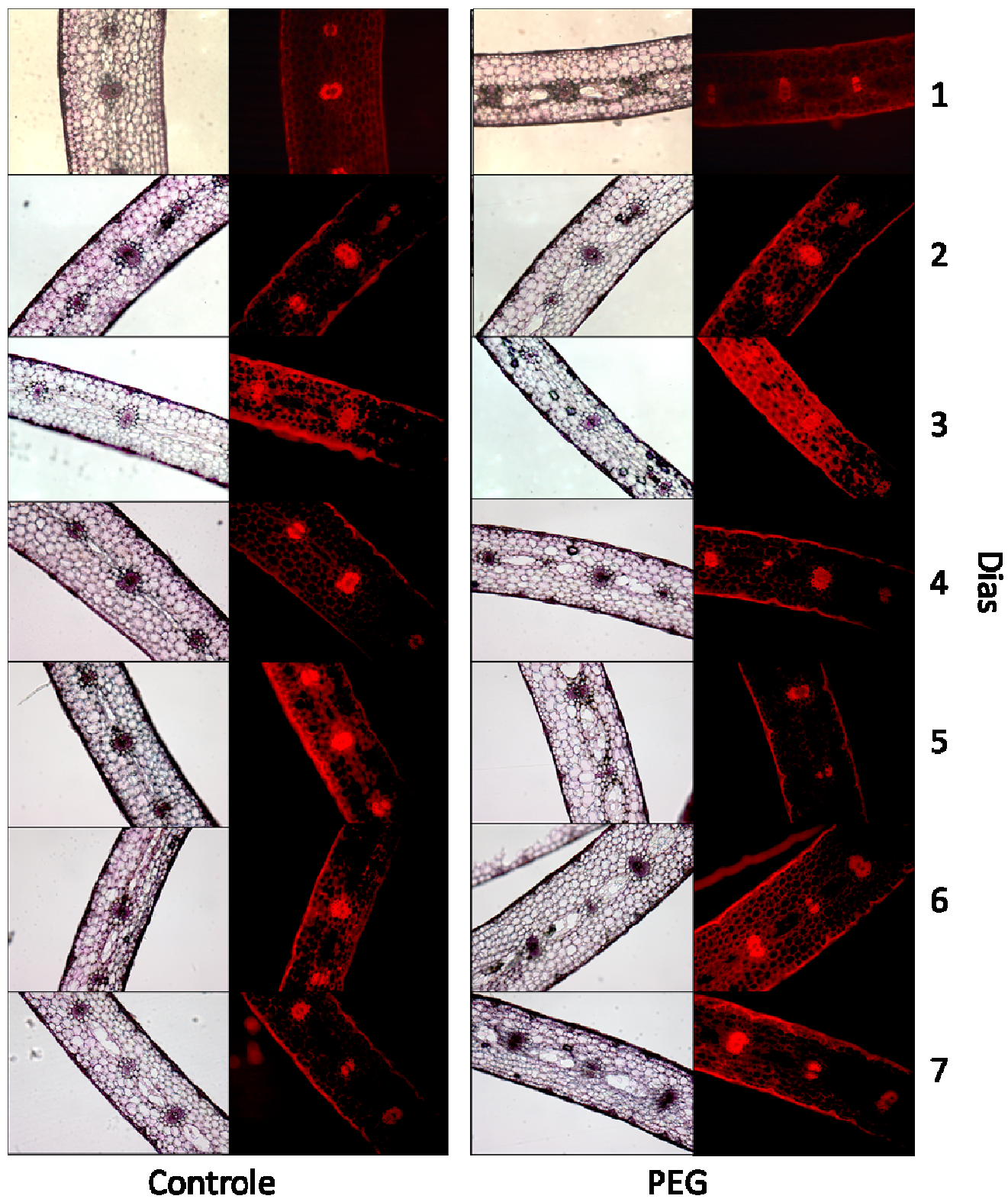


Figura 13: Micrografias da região basal de folhas de *G. monostachia*, Mantidas por 7 dias em água (controle) ou em uma solução de PEG 30%. A primeira e a terceira colunas mostram os cortes na luz visível; a segunda e a quarta mostram a fluorescência na faixa dos 575 nm.

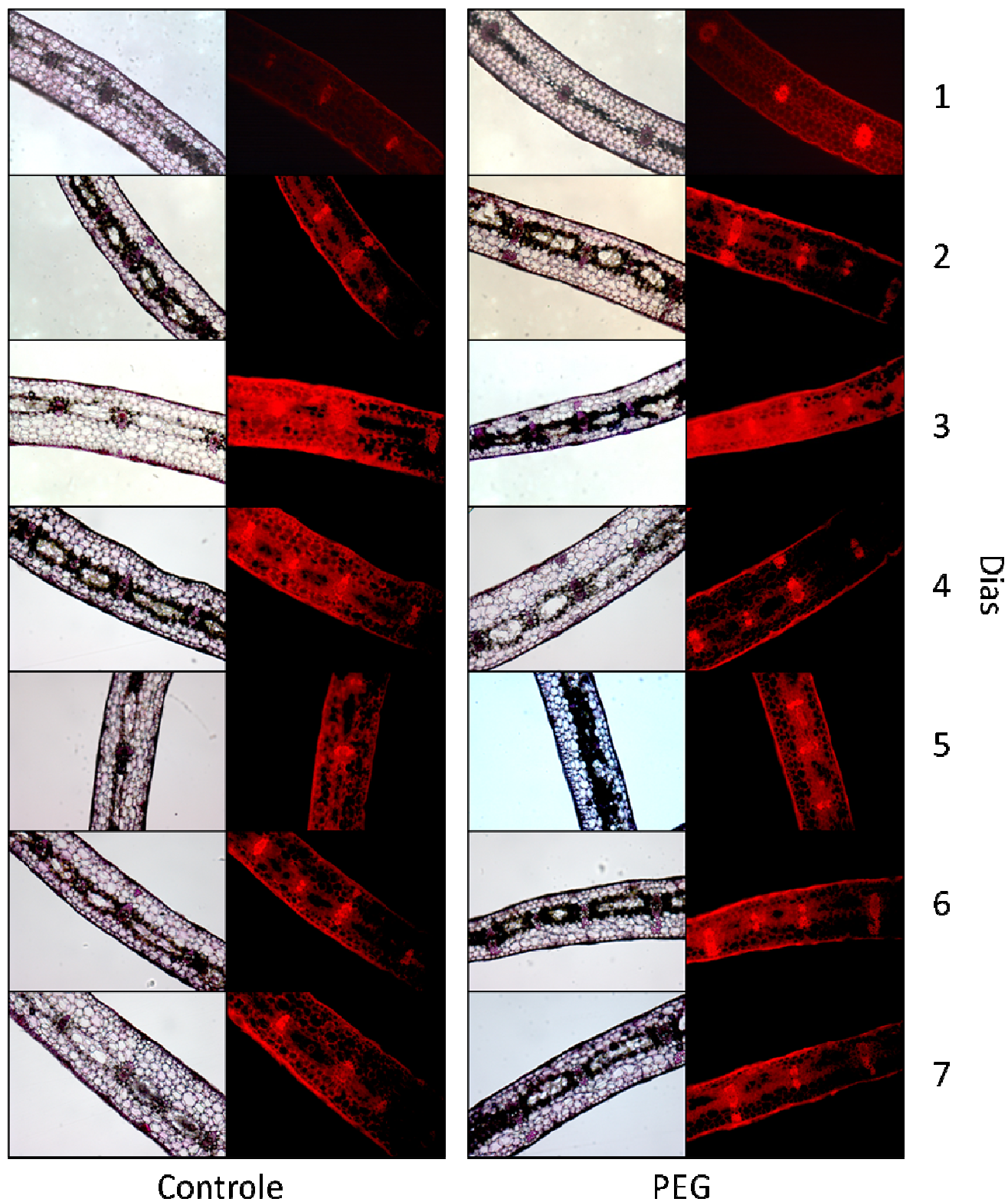


Figura 14: Micrografias da região mediana de folhas de *G. monostachia*, Mantidas por 7 dias em água (controle) ou em uma solução de PEG 30%. A primeira e a terceira colunas mostram os cortes na luz visível; a segunda e a quarta mostram a fluorescência na faixa dos 575 nm.

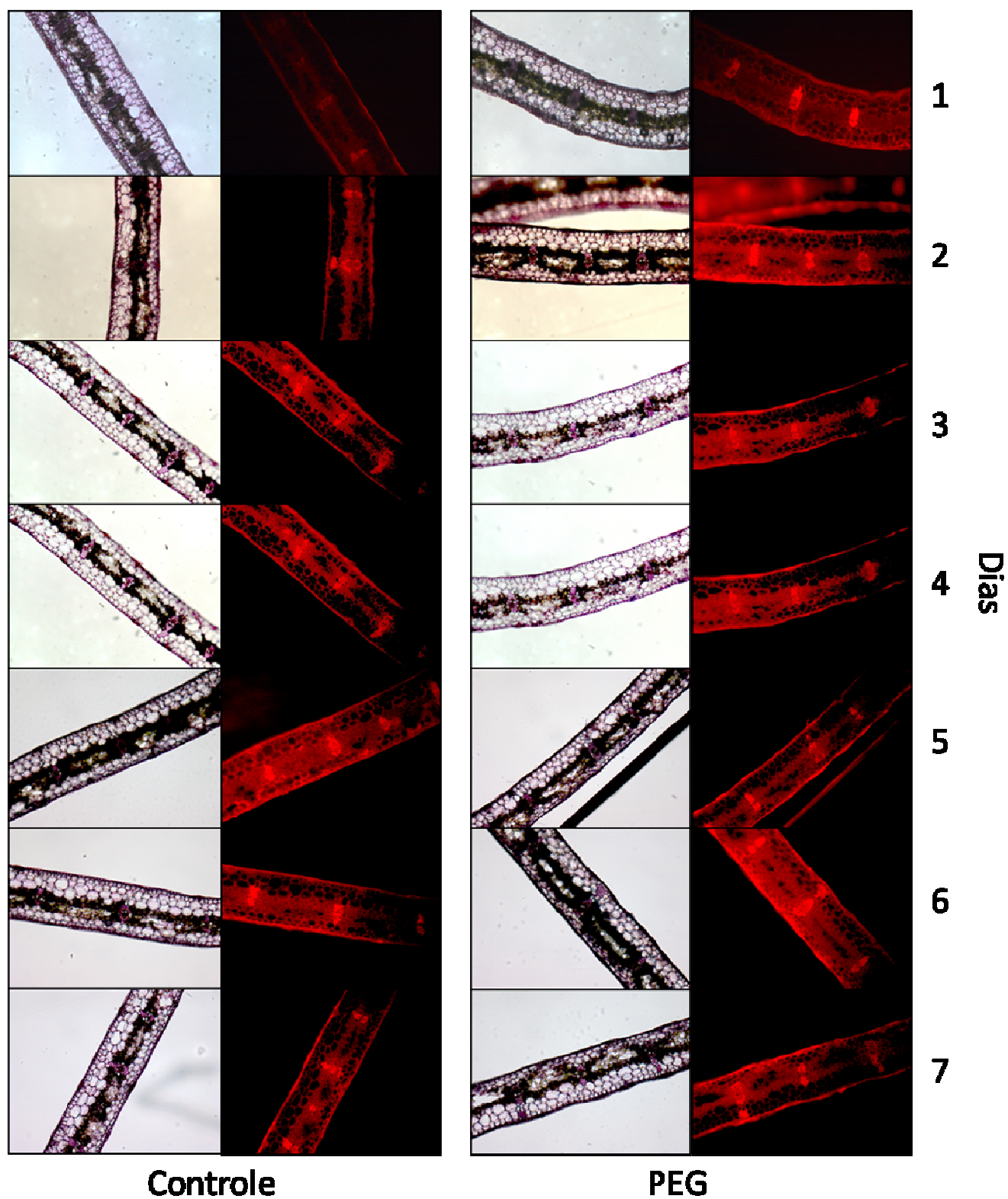


Figura 15: Micrografias da região apical de folhas de *G. monostachia*, Mantidas por 7 dias em água (controle) ou em uma solução de PEG 30%. A primeira e a terceira colunas mostram os cortes na luz visível; a segunda e a quarta mostram a fluorescência na faixa dos 575 nm.

4.9. Aplicação de doador de NO (SNP) em folhas isoladas mantidas por 7 dias em água

As folhas destacadas foram mantidas por 7 dias em água ou em uma solução de SNP a 1mM. Nos primeiros três dias, essa solução foi renovada sempre uma hora após o início do período luminoso. Porém, no quarto dia foi notado que as folhas estavam ficando amarelas, com pontos de necrose. Sendo assim, o SNP não foi mais aplicado nos dias restantes. Alternativamente, optou-se por aplicar uma concentração menor de SNP (100 μ M) ao longo de 7 dias, além de manter as folhas em câmaras vedadas. Os valores do teor de água e do acúmulo noturno de acidez após 7 dias são mostrados na **Figura 16**. Pode-se notar que o status hídrico das folhas não mudou significativamente com a aplicação de SNP em relação ao controle. Observou-se um aumento nos teores de acidez titulável das folhas tratadas com SNP, porém esse aumento também não foi estatisticamente significativo.

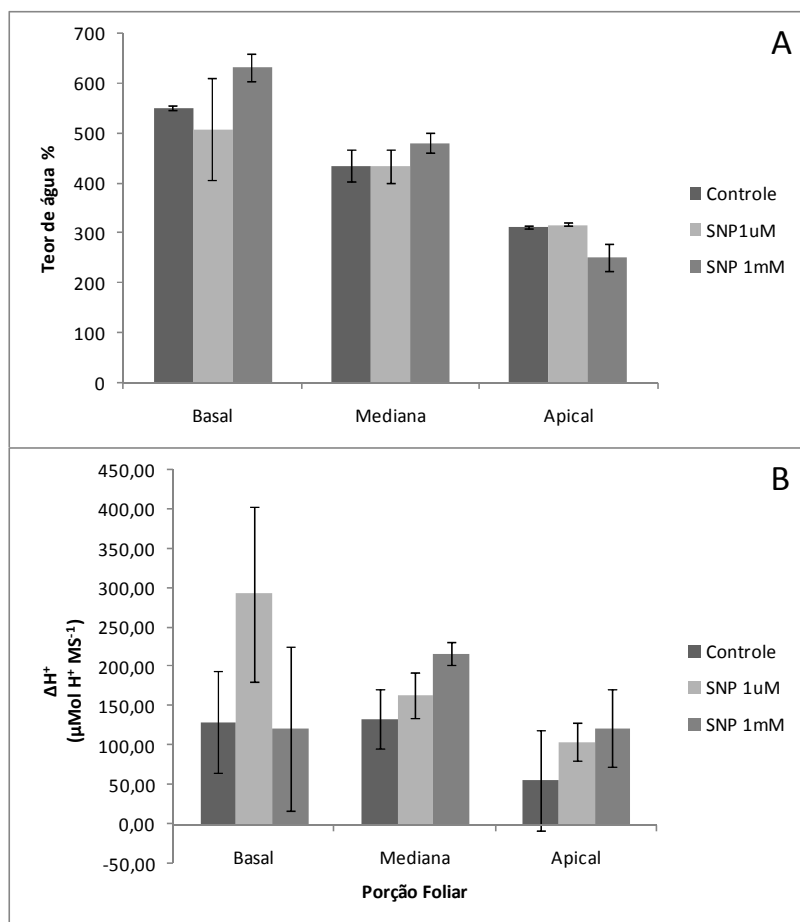


Figura 16: Teor de água (A) e acúmulo noturno de acidez (B) em três porções foliares de folhas destacadas que foram mantidas por 7 dias em sala de crescimento, imersas em água, em uma solução de SNP 1µM ou em uma solução de SNP a 1mM reaplicada diariamente. Não houve diferenças estatísticas entre os tratamentos, segundo o teste T de student em nível de 5% de significância.

4.10. Quantificação da emissão de NO por quimioluminescência

As folhas destacadas foram mantidas em água ou em uma solução de PEG por 7 dias em uma câmara vedada sob fluxo de ar livre de NO. A quantidade de NO analisada ficou muito próxima ao limite de detecção do aparelho, sendo impossível detectar variações (resultados não mostrados). Acredita-se que a produção do NO pela planta seja bastante reduzida, e a emissão de NO pela folha se dilua no ar contido dentro da câmara, fazendo com que os níveis desse composto em seu interior

sejam ínfimos. No entanto, novos testes foram feitos montando-se o equipamento de quimioluminescência de uma forma diferente: sabe-se que a medição de NO é mais significativa quando é utilizado nitrogênio como gás de arraste. No entanto, as folhas ficariam em anóxia contínua nessas condições, o que poderia afetar seriamente o seu metabolismo. Sendo assim, postulou-se que poderia ser colocada uma válvula extra no sistema, capaz de ser programada e alternar a passagem de nitrogênio e de ar sintético. O mecanismo foi montado e testado no nosso laboratório, porém os fluxos temporários de nitrogênio no momento da leitura não intensificaram o sinal captado pelo aparelho (resultados não mostrados).

6. Discussão

Embora seja reconhecida como uma espécie C3-CAM facultativa já há algum tempo, os estudos de indução ao CAM em *Guzmania monostachia* ainda são escassos. Essa bromélia é capaz não somente de mudar do metabolismo C₃ para o CAM, como de reverter de CAM para C₃, em resposta a fatores abióticos como luz e água (MEDINA *et al.*, 1977; LUTTGE *et al.*, 1986; MAXWELL *et al.*, 1994; MAXWELL *et al.*, 1995; MAXWELL *et al.*, 1999; FRESCHI *et al.*, 2009). Dentre os estresses capazes de induzir o CAM, a falta d'água se mostra mais eficiente para que isso ocorra, sendo que o CAM já surge após o sétimo dia de tratamento (MAXWELL *et al.*, 1994; FRESCHI *et al.*, 2009). Após induzida, *G. monostachia* apresentou uma mudança bastante rápida e intensa quanto ao tipo de fotossíntese. FRESCHI *et al.* (2009) constataram que após apenas 7 dias de suspensão de rega, a condutância estomática de plantas adultas passou de um estado próximo ao C₃, com uma leve assimilação de carbono durante a noite, para um estado no qual os estômatos ficaram fechados quase 24 horas. Esse tipo de fotossíntese é conhecido como “CAM-idling” (LUTTGE, 2004; HERRERA, 2009; HERRERA *et al.* 2010). Esse comportamento já havia sido observado por MAXWELL *et al.* (1994), mas após um período mais prolongado de estresse (14 dias). Em outras plantas, como *Clusia spp.* (BORLAND *et al.*, 1992; BORLAND *et al.*, 1998; LUTTGE, 2006) e *Mesembryanthemum cristallinum* (TAYBI *et al.* 2002; CUSHMAN & BORLAND, 2002), essa mudança é ainda mais lenta e não tão intensa.

Também no trabalho de FRESCHI *et al.* (2009), notou-se que a expressão do CAM não se dá de forma igual ao longo da folha de *G. monostachia*, sendo mais pronunciada na região apical. As folhas das bromélias tanque apresentam diferenças

em relação às folhas de plantas que não possuem esse hábito, uma vez que, além de realizarem fotossíntese, devem também absorver e assimilar os nutrientes dissolvidos na água do tanque. Até o momento, a porção apical das folhas parece estar mais relacionada com a realização da fotossíntese e com etapas da assimilação do nitrogênio, enquanto que a porção basal parece exercer uma função mais relacionada com a absorção de nutrientes (SAKAI & SANDFORD, 1980; MEDINA *et al.* 2003; POPP *et al.* 2003; TAKAHASHI *et al.* 2007; FRESCHI *et al.* 2009; TAKAHASHI *et al.* 2011). Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram fortemente essa observação, uma vez que a transição ao CAM praticamente não foi observada nas porções basais, apenas nas regiões mediana e apical, de acordo com os valores de acúmulo noturno de acidez e atividade das enzimas PEPC e MDH (**Figuras 3, 7, 8 e 9**). Somado a isso, quando ocorreu o acúmulo de acidez durante o dia, como observado nas **Figuras 3 e 7**, ele aconteceu com maior intensidade nas porções basal e mediana. Embora os motivos pelos quais exista esse acúmulo diurno de ácidos ainda não estejam esclarecidos, eles reforçam a característica de divisão funcional ao longo da folha. Até mesmo a diminuição do teor de água não se dá de maneira uniforme. Tanto nas folhas destacadas imersas em PEG quanto em plantas inteiras submetidas à suspensão de rega (FRESCHI *et al.* 2009), a perda de água foi significativa apenas na região basal das folhas. Portanto, esse comportamento parece não ser um artefato do contato direto da base foliar com o PEG. É possível, então, que a base da folha funcione como uma reserva de água que tampona a diminuição do teor de água sofrida nas demais regiões, onde ocorre com maior intensidade a fotossíntese. Pode ocorrer também o transporte de água da base da folha em direção ao ápice, uma vez que nos dois primeiros dias existe diferença significativa no conteúdo de água do ápice entre as folhas mantidas em PEG e em água, que logo

desaparece. Concluindo, para folhas isoladas de *G. monostachia*, o tempo de indução, o padrão de diminuição do teor hídrico e o gradiente longitudinal de expressão do CAM são muito similares em uma planta inteira e em folhas destacadas que sofreram o déficit hídrico por exposição ao PEG 6000 (**Figura 3**). Sendo assim, acredita-se que estudos de indução ao CAM possam ser realizados em folhas isoladas, sendo úteis especialmente para experimentos que necessitem de uma condição mais controlada, evitando a necessidade de uso de substrato, por exemplo. O uso de folhas destacadas também permite desenvolver experimentos nos quais as folhas estariam uniformemente expostas a algum sinal (como, por exemplo, a luz), diferentemente de quando elas estão inseridas no caule na conformação de roseta, como ocorre na planta inteira. Permitiria, ainda, descobrir se a diferença funcional observada ao longo das folhas das bromélias com tanque se deve a uma característica intrínseca da folha ou se isso seria resultado de diferenças nas condições às quais essas porções foliares estão expostas ao longo de suas vidas, como uma maior intensidade de luz ou contato com a água do tanque, por exemplo.

A exposição das bases foliares ao PEG 6000 causou uma perda de água muito rápida, que se estabilizou após cerca de 24 horas (**Figuras 5 e 6**). Em experimentos semelhantes realizados em *M. crystallinum*, TAYBI & CUSHMAN (1999) também constataram uma perda de água nas 12 primeiras horas de exposição ao manitol, sendo que houve um aumento na expressão do gene *ppc1*, que codifica para a isoforma da PEPC específica do CAM (CUSHMAN *et al.* 1989), logo nas primeiras 3 horas de exposição. FRESCHI *et al.* (2010) detectaram um aumento nos transcritos da PEPC apenas a partir do quinto dia em plantas de abacaxizeiro, precisamente quando houve uma queda mais acentuada do teor de água. Em *G. monostachia*, porém, a queda do conteúdo hídrico ocorreu principalmente na região basal das

folhas, enquanto que na região apical pareceu não ocorrer essa diminuição. Assim, é possível que a resposta à exposição das folhas dessa espécie ao PEG consista de, pelo menos, dois momentos de sinalização: a percepção do déficit hídrico, que ocorre logo nas primeiras horas (concomitantemente com a diminuição do teor de água nas bases foliares) e a sinalização que resulta na transição para o CAM propriamente dita, que ocorre do sexto para o sétimo dias, nas regiões mediana e apical da folha. O tempo que as folhas levaram para alterar sua fotossíntese de C_3 para o CAM foi de 6 dias. No entanto, experimentos adicionais mostraram que a mudança pode se dar também no quinto ou no sétimo dia (resultados não mostrados), conforme a montagem experimental. Essas variações temporais de indução, provavelmente, são devidas a diferenças genotípicas entre as plantas utilizadas ou das condições climáticas na sala de crescimento, que podem resultar em diferentes níveis de perturbações hídricas. Experimentos utilizando concentrações diferentes de PEG poderiam esclarecer se a severidade do déficit influenciaria no tempo que a planta leva para passar do metabolismo C_3 para o CAM.

O acúmulo de acidez durante o dia, observado principalmente na região basal das folhas (**Figuras 3 e 7**), ainda não foi bem compreendido. Alguns ácidos orgânicos, como o ácido málico, são componentes complexos do metabolismo da planta (FERNIE & MARTINOIA, 2009). Sabe-se que o íon malato pode ser uma forma de acumular poder redutor, além de servir como estoque transitório de CO_2 no CAM (MARTINOIA & RENTSCH, 1994). Portanto, o acúmulo de ácidos durante o dia, possivelmente refletindo o acúmulo de ácido málico, estaria sendo utilizado mais como reserva de poder redutor para o período escuro do que como reserva de CO_2 . Essa hipótese pode ser reforçada levando em conta a atividade das enzimas PEPC e MDH. A PEPC, enzima responsável pela carboxilação do fosfoenolpiruvato, mantém

níveis baixos de atividade na porção basal, e praticamente inalterados. Já a MDH, que é capaz não só de reduzir o oxaloacetato a malato, mas também de fazer a reação inversa, mostrou atividades maiores nas bases das folhas mantidas em água, situação em que ocorre maior acúmulo diurno de acidez. Portanto, o malato que surge durante o dia nas bases pode não ser fruto de carboxilação e sim de outras vias, envolvendo a MDH.

A dosagem dos teores de ABA mostrou que do quinto ao sétimo dias, precisamente quando a mudança no tipo de fotossíntese está se processando, os teores desse hormônio foram significativamente maiores nas folhas tratadas com PEG em relação às mantidas em água (**figura 10**). Já é sabido que o ABA (além do cálcio e, em alguns casos, o NO e o inositol trifosfato) participa da indução do CAM em *Ananas comosus*, *Mesembryanthemum crystallinum*, *Portulacaria afra* e *Kalanchoe blossfeldiana* (TAYBI *et al.*, 1995; TAYBI 2001; TAYBI & CUSHMAN 2002; FRESCHI *et al.* 2010). Nenhum desses estudos, porém, permitiu distinguir entre a sinalização do da queda do teor hídrico e da indução ao CAM propriamente dita. FRESCHI *et al.* (2010) mostraram que o NO participa de uma cascata de sinalização do CAM, atuando após a sinalização do ABA. Os resultados da localização *in situ* do NO por microscopia de fluorescência reforçam a hipótese de que existam duas sinalizações ao longo dos 7 dias de exposição ao PEG, uma vez que foi detectado um aumento na fluorescência nos dois primeiros dias e outro no sexto e sétimo dias. Esses aumentos, possivelmente sinais, ocorreram ao longo de toda a folha. Uma vez que cada região da folha deve apresentar respostas diferentes à falta d'água, a interpretação de um mesmo sinal recebido em partes diferentes da folha também deve variar, como é o caso dos sinais transmitidos pelo NO e pelo ABA. Como as imagens obtidas pela microscopia de fluorescência são apenas qualitativas,

os resultados da quimioluminescência poderiam ser bastante esclarecedores quanto aos picos de NO. Infelizmente, não houve detecção de NO por esse método, provavelmente devido à diluição e degradação do NO emitido pela folha no volume da câmara vedada.

Para completar essa lacuna, buscou-se outro método de quantificar NO: a espectrofluorimetria. Adicionalmente, devido à possibilidade de ligação do fluoróforo (usado tanto na microscopia de fluorescência quanto na espectrofluorimetria) com o peróxido de hidrogênio (TUN *et al.*, 2008), foi feita a dosagem dessa espécie reativa de oxigênio por ensaio enzimático, para avaliar se a detecção de fluorescência se tratava, de fato, do NO. Além disso, também se postula uma interação do peróxido de hidrogênio com o NO na sinalização tanto de processos do desenvolvimento (LIAO *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010) como nas respostas a estresses abióticos ou moléculas indutoras das suas respostas (SUN *et al.*, 2010; CUI *et al.*, 2011; PATAKAS *et al.*, 2011). De acordo com os resultados deste trabalho, os dois radicais livres parecem estar atuando em processos diferentes, uma vez que foram detectados em porções diversas da folha.

Notou-se que do quinto ao sétimo dia ocorreu uma maior intensidade da fluorescência medida por espectrofluorimetria nos ápices das folhas submetidas ao PEG (**Figura 11**), com um perfil diferente da produção de peróxido de hidrogênio (**Figura 12**). Pode-se notar que a produção de H₂O₂ foi superior na região basal, enquanto que a fluorescência foi muito mais intensa na região apical. Esses resultados sugerem fortemente que a fluorescência obtida deveu-se majoritariamente ao NO. Pode-se notar também que os valores de fluorescência obtidos foram significativamente maiores apenas no ápice das folhas, enquanto que os teores de ABA foram mais elevados nas duas porções foliares quando expostas ao PEG. Os

resultados indicam, portanto, que tanto o ABA quanto o NO parecem estar atuando em conjunto no ápice foliar, aumentando a expressão do CAM nessa região. Visto que a sinalização pelo ABA ocorreu tanto na região basal da folha (que não expressa o CAM) quanto na apical (onde o CAM se expressou) e que o NO foi detectado apenas no ápice, postula-se que o ABA seja um sinal mais relacionado com um possível estresse hídrico e o NO um sinal localizado mais apicalmente, envolvido diretamente com a indução ao CAM e, possivelmente, atuando como um mensageiro secundário do ABA. Já foram feitos estudos em algumas espécies visando estabelecer o perfil de S-nitrosilação das proteínas, após a planta receber NO via GSNO. Dentre as proteínas encontradas, notou-se que em *A. thaliana*, uma planta C3, a PEPC não estava S-nitrosilada (LINDERMAYR *et al.*, 2005), diferentemente de *Kalanchoe pinnata*, uma espécie CAM, na qual essa enzima foi encontrada S-nitrosilada (ABAT *et al.*, 2008). Esses resultados reforçam ainda mais a hipótese da participação do NO na indução ao CAM. Esse radical livre pode estar relacionado também a outras respostas apresentadas por essa porção foliar, como o fechamento estomático (DESIKAN *et al.*, 2002; GARCÍA-MATA & LAMATTINA 2003; GARCÍA-MATA & LAMATTINA 2007). Não se deve descartar, no entanto, as diferenças na resposta quando as duas porções foliares são submetidas a um mesmo estímulo. Por exemplo, a base da folha é um tecido mais jovem e, como tal, pode apresentar teores elevados de citocininas que talvez não estejam presentes no ápice. Sabendo-se que as citocininas são importantes reguladoras negativas do CAM, esse pode ser um dos motivos pelos quais as duas porções respondem de maneira diferente quanto à indução do CAM. Mais ainda, o tecido da região basal pode ser incapaz de expressar o CAM devido a restrições anatômicas, morfológicas ou metabólicas. Dosagens de citocininas nos processos estudados poderiam ajudar a desvendar esse evento, uma vez que já foi

constatado que elas atuam negativamente sobre o CAM em trabalhos que empregaram outras espécies.

No caso em que se aplicou um doador de NO às folhas isoladas de *G. monostachia* não houve efeito significativo na indução ao CAM, embora tenha sido constatada uma tendência ao aumento da expressão desse tipo de fotossíntese (**Figura 16**). Futuramente, novas concentrações do doador devem ser testadas, uma vez que os teores aplicados foram baseados naqueles usadas por FRESCHI *et al.*, (2010) para plantas jovens de abacaxizeiro. Como a massa das folhas utilizadas neste trabalho foi bem maior do que as utilizadas por esses autores, provavelmente doses maiores de SNP resultariam em efeito mais pronunciado. O momento da aplicação também pode ser importante para constatar os efeitos desse composto. No entanto, os resultados de detecção do NO obtidos na microscopia de fluorescência e na espectrofluorimetria apontam fortemente para um envolvimento dessa molécula na indução ao CAM em *G. monostachia*.

As plantas parecem possuir, ainda, uma outra via de sinalização ao CAM independente de ABA da qual pouco se conhece (TAYBI & CUSHMAN 2002; FRESCHI *et al.*, 2010). WINTER & GADEMANN (1991) propõem que, além dos sinais hormonais, o CAM possa ser induzido diretamente pela mudança de turgor nas células do mesófilo. Embora essa possibilidade deva ser levada em consideração, vários resultados já apontam que a maior parte das respostas causadas pela seca se deve a moléculas sinalizadoras, e não diretamente de mudanças na pressão de turgor das células (WILKINSON & DAVIES, 2002). LUTTGE (2004) ressalta a importância do transporte de malato através do tonoplasto para a regulação do CAM e que esse fenômeno é influenciado diretamente pela temperatura. De fato,

NIEVOLA *et al.*, (2005) induziram o CAM em *A. Comosus* por meio do termoperiodismo.

Ao se levar em conta o grau de acidez titulável obtido nas folhas mantidas em PEG em dois experimentos diferentes (**Figuras 7 e 9**), pôde-se constatar que o CAM na região apical das folhas que ficaram 8 dias em PEG estava mais fraco do que nos ápices foliares das folhas que haviam permanecido por apenas 7 dias. O teor de água decaiu mais nas folhas de 7 dias do que nas de 8, provavelmente devido a diferenças nas condições da sala de cultivo. Sendo assim, postula-se que o CAM expresso pelas folhas seria proporcional à intensidade do estresse hídrico imposto a ela. Futuros experimentos com concentrações diferentes de PEG devam também ajudar a responder a mais essa questão.

Aparentemente, a adubação da planta antes da montagem dos experimentos impediu a transição ao CAM nas folhas, mesmo quando foram submetidas ao PEG (**Figura 4**). Aventa-se a hipótese de que, além do estresse hídrico, é necessária a imposição de um estresse nutricional para que essa transição ocorra plenamente. CUSHMAN & BORLAND (2002) ressaltam que na natureza, a falta d'água não ocorre isolada de outras mudanças ambientais. Isso é muito claro para uma bromélia-tanque epífita, já que a maior parte de sua nutrição mineral vem dos nutrientes dissolvidos na água do tanque. Assim, na natureza, *G. monostachia* provavelmente sofre simultaneamente os dois tipos de estresse. Esse resultado foi inesperado e muito intrigante, uma vez que a nutrição é um fator constantemente ignorado nas pesquisas sobre a indução ao CAM e estudos desse fenômeno são extremamente raros na literatura científica. SANTOS & SALEMA (1991) descobriram que a privação moderada de nitrogênio em plantas de *Kalanchoe lateritia* aumentou a atividade da PEPC e a fixação noturna de CO₂. No entanto, uma privação mais intensa diminuiu

ambos os parâmetros, possivelmente pela falta de nitrogênio para a síntese de proteínas. MAIQUETÍA *et al.* (2009) notaram uma tendência para o aumento do CAM devido à falta de fosfato em *Clusia minor*, mas os resultados não diferenciam se esse aumento se deveu realmente à deficiência do fosfato ou à ausência de um fungo formador de micorrizas, que também foi retirado. LUTTGE (2004) advoga sobre a possibilidade de ambos os nutrientes influenciarem o grau de expressão do CAM. Adicionalmente, é sabido que o teor hormonal em uma planta varia conforme o seu status nutricional. Citocininas parecem estar relacionadas com a ativação de meristemas e podem ter seus níveis aumentados como resposta a uma abundância nutricional (RUBIO *et al.*, 2009). Esses mesmos autores propõem que as concentrações de ABA podem aumentar quando o estresse nutricional é retirado, como uma forma de impedir a formação de raízes laterais. Assim, é possível traçar um paralelo entre os dois principais hormônios envolvidos na indução do CAM e o estado nutricional da planta. No caso de bromélias-tanque epífitas, com raízes pouco funcionais para absorção, esse papel da sinalização do ABA pode ser diferente daquele que ocorre em plantas terrestres. MERCIER *et al.*, (1997) constataram que nitrogênio na forma de uréia estimulou a produção de citocininas em *Vriesea philippocoburgii*, já a nutrição amoniacal teve um efeito similar em *Tillandsia pohliana*. Vale a pena notar que essas duas espécies citadas são epífitas e que *V. philippocoburgii* é também uma bromélia-tanque. GARNICA *et al.*, (2010), ao aplicarem nitrato em plantas de trigo crescidas em amônio, constataram um aumento de citocininas e uma queda nos teores de ABA. O balanço entre esse dois hormônios (ABA e citocininas) parece atuar também na indução ao CAM (FRESCHI *et al.*, 2010). É possível, então, que, ao menos em nível hormonal, a transição ao CAM e a absorção/assimilação de nutrientes sejam desencadeados por sinais opostos, já que

cada um parece necessitar de um determinado balanço hormonal. Atualmente, estão sendo feitas pesquisas no Laboratório de Fisiologia Vegetal da USP para tentar elucidar mais precisamente qual seria o papel do nitrogênio e de outros nutrientes na indução ao CAM em folhas isoladas de *G. monostachia*.

Folhas destacadas foram mantidas por 8 dias consecutivos expostas ao PEG e depois transferidas para um frasco tipo borel contendo água, onde ficaram por mais um dia. Após esse período, foi medido o teor de água e a dosado o NO por espectrofluorimetria (resultados preliminares – não mostrados). Notou-se que com a reidratação os teores de água voltaram a uma condição similar àquela do controle após um dia e o sinal de NO que estava presente no ápice das folhas diminuiu até níveis comparáveis aos das folhas não submetidas à solução de PEG. Como já é sabido que *G. monostachia* é capaz não só de ser induzida ao CAM, mas também de retornar a condição C₃ quando reidratada (FRESCHI *et al.*, 2009), é possível que essa queda significativa da fluorescência emitida por NO (resultado não mostrado) sinalize a volta para o metabolismo C₃. Existem poucos trabalhos acerca da reversão do metabolismo CAM para o C₃, já que nas espécies mais estudadas como, por exemplo, *M. crystallinum*, essa mudança é irreversível. FRESCHI *et al.*, (2010) constataram que após cerca de 15 dias de reidratação, o conteúdo hídrico de plantas jovens de abacaxizeiro cultivadas *in vitro* se aproximava do controle, concomitantemente à redução de transcritos e atividade de enzimas-chave no metabolismo CAM (PEPC, PEPCK e MDH), além dos teores de acidez titulável. Em *G. monostachia*, sabe-se que após 7 dias de reidratação a planta retorna à condição controle, de acordo com os teores de acidez titulável e a atividade das enzimas PEPC e MDH (FRESCHI *et al.*, 2010). Porém, ainda não se sabe se essa reversão poderia acontecer em menos tempo.

O aumento significativo observado nos teores de ABA ao longo de toda a folha pode estar também relacionado à expressão de aquaporinas. Essas são proteínas-canal presentes em membranas biológicas relacionadas ao transporte de água e/ou solutos de pequeno porte e carga neutra (MAUREL *et al.*, 2008). LIAN *et al.* (2004) constataram um aumento na expressão dos genes de aquaporinas em plantas de arroz submetidas ao déficit hídrico. Em plantas de milho, a aplicação de ABA exógeno resultou em aumento da condutividade hidráulica nos tecidos da planta como um todo em um curto espaço de tempo, sendo que essa mudança estaria relacionada com um incremento da expressão de aquaporinas (HOSE *et al.*, 2000). MADIEH & MOSTAJERAN (2009) mediram a condutividade hidráulica e a expressão de genes de aquaporinas em *Nicotiana tabacum*, após a aplicação exógena de ABA, constatando um aumento de ambos com a aplicação hormonal. Portanto, em *G. monostachia*, a elevação nos teores de ABA, causada pela diminuição do conteúdo hídrico, possivelmente aumentou a condutividade hidráulica do tecido, podendo ser esse o motivo pelo qual existiu diferença significativa no teor de água da porção apical apenas nos dois primeiros dias (**figura 6**): após esse período a condutividade aumentaria e a água poderia ser translocada da região basal para a apical da folha, já que a corrente xilemática provavelmente ficou muito reduzida devido ao fechamento dos estômatos. Portanto, durante toda a duração do período de déficit hídrico parece haver um transporte de água em direção à região apical, mantendo-a bem hidratada, enquanto ocorreu uma perda de água muito mais marcante na região basal (**Figuras 5 e 6**).

É sabido que tanto o ABA quanto o NO podem participar do processo de fechamento estomático (DESIKAN *et al.*, 2002; GARCÍA-MATA & LAMATTINA 2003; GARCÍA-MATA & LAMATTINA 2007; NEILL *et al.*, 2008a). Tanto na

resposta de estresse hídrico quanto na expressão do CAM, o fechamento dos estômatos tem um papel importante. Portanto, uma possível função do ABA e também do NO, presente nas folhas destacadas de *G. monostachia*, muito provavelmente estaria relacionada com a sinalização do controle da abertura e fechamento dos estômatos. Além disso, uma vez que essa planta expressa o “CAM-idling”, é possível que os níveis elevados desses compostos perdurem mesmo após os 7 dias de déficit hídrico, pois a folha precisa manter seus estômatos fechados diuturnamente (FRESCHI *et al.*, 2009).

Para descobrir a origem do NO produzido pelas folhas de *G. monostachia* ainda serão necessários mais experimentos, envolvendo a inibição das principais vias biossintéticas desse radical. Porém, tendo em vista a compartimentalização que ocorre nas folhas das bromélias-tanque, é possível supor que se o NO for produzido no ápice, ele não tenha origem na NR, uma vez que nessa região a atividade dessa enzima é muito inferior àquela da base (PEREIRA, resultados não publicados). Alternativamente, o NO poderia ser oriundo de NR presente na região basal da folha e posteriormente transportado para o ápice, na forma de GSNO (LEITNER *et al.*, 2009) ou, possivelmente, via aquaporinas, uma vez que essas proteínas podem transportar pequenas moléculas gasosas, como é o caso do NO (HERRERA *et al.*, 2006; LIU *et al.*, 2007).

7. Conclusões

Em conclusão, a indução ao CAM em folhas isoladas de *Guzmania monostachia* ocorreu na porção apical após pelo menos 7 dias de exposição da folha destacada a uma solução com 30% de PEG. Nas primeiras 24 horas, pôde-se detectar uma queda significativa do conteúdo d'água nas regiões basal e apical da folha, porém, a maior perda ficou restrita à região basal ao final de sete dias de incubação com PEG. Aparentemente, a indução do CAM dependeu não só da diminuição do conteúdo hídrico imposta pelo PEG, mas também de uma deficiência de nutrientes, imposta por uma ausência de adubação da planta fornecedora das folhas para o experimental.

Tanto o ABA quanto o NO estão provavelmente envolvidos com as respostas desencadeadas pela diminuição do conteúdo hídrico foliar, ocasionada pelo PEG, mas por meio de dinâmicas aparentemente diferentes. O ABA foi detectado em quantidades significativamente maiores ao longo de todo o comprimento da folha, enquanto o teor de NO mostrou-se mais elevado apenas na região apical, justamente onde ocorreu a transição do metabolismo C₃ para o CAM. Os resultados sugerem que o ABA possa ser um sinal vinculado mais de perto à perda d'água pela folha e o NO um segundo sinal, possivelmente, relacionado com a indução do CAM.

8. Resumo

Guzmania monostachia é uma bromélia tanque epífita C₃-CAM facultativa, constituindo-se em um modelo muito interessante para estudar a sinalização que ocorre na transição da fotossíntese C₃ para CAM. Baseado em resultados obtidos pelo Laboratório de Fisiologia Vegetal do IBUSP, constatou-se que a mudança em questão se dá de forma diferente ao longo do comprimento das folhas dessa espécie, sendo muito mais pronunciada na região apical do que na basal. Outra pesquisa, desenvolvida anteriormente no mesmo laboratório, sugere fortemente que na indução ao CAM, em plantas jovens de abacaxizeiro C₃, o óxido nítrico (NO) e o ácido abscísico (ABA) atuam como mediadores dessa resposta. Levando em conta esses fatos, o presente trabalho visou caracterizar a participação do NO e do ABA como sinalizadores do CAM em uma bromélia que é reconhecidamente C₃-CAM facultativa na natureza. Além disso, suas folhas apresentam diferentes níveis de expressão do CAM ao longo do comprimento, podendo, assim, constituir-se em um ótimo modelo para estudos de sinalização. Também se buscou, nesta pesquisa, saber se seria possível reduzir o modelo de estudo para folhas destacadas, não necessitando empregar a planta inteira nos experimentais.

Após a comparação da fotossíntese entre folhas pertencentes a plantas inteiras e folhas destacadas, concluiu-se que é viável trabalhar com as folhas isoladas. Essas foram induzidas ao CAM por déficit hídrico, proporcionado por uma solução de polietilenoglicol (PEG) na concentração de 30%. O acúmulo noturno de acidez e a atividade das enzimas fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC) e malato desidrogenase (MDH) em três porções foliares (porção basal, mediana e apical) foram usadas para caracterizar o grau de expressão do CAM. O conteúdo d'água (expresso em porcentagem) foi usado como um indicativo da perda d'água pelo tecido foliar. A

participação do NO no processo de indução ao CAM foi avaliado por meio de dosagens por quimioluminescência, espectrofluorimetria e localização *in situ* por microscopia de fluorescência. Também foi usado um doador desse radical livre, o nitroprissiato de sódio (SNP). O ABA foi quantificado pela técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS).

As folhas mudaram seu metabolismo fotossintético de C₃ para CAM no sexto dia de incubação com PEG (segundo o acúmulo noturno de ácidos e a atividade da enzima PEPC), mas a primeira queda detectável no teor d'água ocorreu logo nas 12 primeiras horas, aumentando até 24ª hora. Nos dias seguintes (até o 7º), o menor teor de água foi encontrado na região basal da folha, enquanto que o CAM se expressou com maior intensidade na porção apical, sugerindo a existência de uma sinalização da redução hídrica entre a parte basal e a apical da folha.

De fato, foram detectados maiores quantidades de ABA, em resposta ao déficit hídrico imposto pelo PEG, ao longo de todo o comprimento foliar, com maior quantidade na região apical. Teores significativamente maiores de NO foram detectados por espectrofluorimetria nos últimos três dias de experimento, apenas na região apical. A citolocalização do NO corroborou a quantificação por espectrofluorimetria, mostrando um aumento a partir do sexto dia nos ápices foliares. Conclui-se, portanto, que tanto o NO quanto o ABA parecem participar da sinalização do CAM. Possivelmente, o ABA desempenha um papel decisivo quanto à sinalização da diminuição do teor d'água, devido ao seu aumento em todo o comprimento da folha, enquanto que o NO parece atuar como um mensageiro secundário, importante à indução do CAM na porção apical foliar.

9. Abstract

Guzmania monostachia is a C₃-CAM facultative epiphyte tank bromeliad and a very promising model to study the C₃ to CAM transition. Results obtained on the Laboratory of Plant Physiology on IBUSP showed that this transition occurs differently along the leaf blade of this species, as it is much stronger on the apical portion of the leaf, when compared to the basal one. Another research, from the same group, strongly suggests that on the induction of CAM in young pineapple plants is mediated by abscisic acid (ABA) and nitric oxide (NO). Based on both of these results, this work intends to characterize the role of NO and ABA in CAM signaling, using as a model of study a species which is generally accepted to be a facultative CAM on natural conditions. Besides that, *G. Monostachia* shows different degrees of CAM along the leaf blade, which makes an interesting model of it for signaling studies. It was also attempted to use detached leaves as a valid model of study for this species.

Since no remarkable differences were detected between an experiment performed with whole plants or detached leaves alone, it was chosen to carry over the work using only detached leaves. The induction of CAM was performed by drought, using a 30% polyethyleneglycol (PEG) solution. The nocturnal acid accumulation and the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) and malate dehydrogenase (MDH) enzymes were measured in three portions of the leaf (basal, middle and apical). The water amount was indicative of the water loss on foliar tissues. NO participation was assessed through chemiluminescence, spectrofluorimetry and *in situ* localization by fluorescence microscopy. A NO donor

was also used. ABA was quantified by gas chromatography associated with mass spectrometry (GC-MS).

The leaves changed the photosynthetic metabolism from C₃ to CAM on the sixth day after the beginning of PEG exposure (as stated by the nocturnal acid accumulation and PEPC activity), but the decrease in water amount values started soon, after 12 hours of exposure, and stabilizing after 24 hours. The major loss of water percentage was detected on the basal portion, persisting until the seventh day, while on the apical portion, after two days the control and PEG-treated leaves remained similar. Since the C₃-CAM change occurred in the apical portion, it is possible to suggest a signal transport from the base to the apex of the leaf in response to water loss.

Indeed, the ABA levels remained higher with the water loss along the whole leaf, but with greater intensity on the apical portion. Higher NO levels were also detected on PEG-treated leaves, but only on the apical portion. The *in situ* localization of NO corroborates the spectrofluorimetry, showing an increase on the sixth day after PEG exposure on the leaf apex.

In conclusion, both NO and ABA seem to participate on the signaling of CAM. Possibly, ABA plays a decisive role on indicating drought, because it increases on the whole leaf subjected to PEG, while NO is, maybe, a secondary signal, specific to processes that occur only on the apical portion, such as the CAM induction.

8. Referências bibliográficas

- ABAT, J.; MATTOO, A.; DESWAL, R. (2008) S-nitrosylated proteins of a medicinal CAM plant *Kalanchoe pinnata* – ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity targeted for inhibition. *FEBS Journal* **275**: 2862-2872.
- ARASIMOWICZ, M.; FLORYZAK-WIECZOREK, J. (2007) Nitric oxide as a bioactive signalling molecule in plant stress responses. *Plant Sci.* **172**: 876-887.
- ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **74(8)**: 3203-3207.
- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**: 215-221.
- BELIGNI, M.V.; LAMATTINA, L. (2001) Nitric oxide: a non-traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci.* **6**: 508-509.
- BENZING, D.H. (1998) Vulnerabilities of tropical forests to climate change: the significance of resident epiphytes. *Climatic Change* **39**: 519–540.
- BESSON-BARD, A.; PUGIN, A.; WENDEHENNE, D. (2008) New Insights into Nitric Oxide Signaling in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 21–39.
- BETHKE, P.C.; LIBOUREL, I.G.L.; AOYAMA, N.; GHUNG, Y-Y.; STILL, D.W.; JONES, R.L. (2007) The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Phys.* **143**: 1173–1188.
- CORPAS, F.J.; DEL RIO, L.A.; BARROSO, J.B. (2007) Need of biomarkers of nitrosative stress in plants. *TRENDS in Plant Science* **12 (10)**: 436-438.
- CRAWFORD, N.M. (2006) Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J. Exp. Bot.* **57 (3)**: 471-478.
- CRAWFORD, N.M.; GALLI, M.; TISCHNER, R.; HEIMER, Y.M.; OKAMOTO, M.; MACK, A. (2006) Response to Zemojtel et al: Plant nitric oxide synthase: back to square one. *Trends Plant Sci.* **11**: 526-527.
- CUETO, M.; HERNANDEZ-PERERA, O.; MARTIN, R.; BENTURA, M.L.; RODRIGO, J.; LAMAS, S.; GOLVANO, M.P. (1996) Presence of nitric oxide synthase activity in roots and nodules of *Lupinus albus*. *FEBS letters* **398**: 159-164.
- CUI J-X.; ZHOU, Y-H.; DING, J-G.; XIA, X-J.; SHI, K.; CHEN, S-C.; ASAMI, T.; CHEN, Z.; YU, J.Q. (2011) Role of nitric oxide in hydrogen peroxide-dependent

- induction of abiotic stress tolerance by brassinosteroids in cucumber. *Plant, Cell and Environment* **34**: 347-358.
- CUSHMAN, J.C.; BORLAND, A.M. (2002) Induction of crassulacean acid metabolism by water limitation. *Plant, Cell and Environment* **25**: 295–310.
- DAI, Z.; KU, M.S.B.; ZHANG, Z.; EDWARDS, G.E. (1994) Effects of growth regulators on the induction of Crassulacean acid metabolism in the facultative halophyte *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Planta* **192**: 287-294.
- DELLEDONNE, M.; XIA, Y.; DIXON, R.A.; LAMB, C. (1998) Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**: 585-588.
- DESIKAN, R., GRIFFITS, R., HANCOCK, J., NEILL, S.(2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **99**: 16314-16318.
- DURNER, J.; WENDEHENNE, D.; KLESSIG, D.F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 10328–10333.
- DURNER, J.; KLESSIG, D.F. (1999) Nitric oxide as signal in plants. *Cur.Opin.Plant Biol.* **2**: 369-374.
- FERNIE, A.S.; MARTINOIA, E. (2009) Malate: Jack of all trades or master of a few? *Phytochemistry* **70** (7): 828-832.
- FORESI, N.; CORREA-ARAGUNDE, N.; PARISI, G.; CALÓ, G.; SALERNO, G.; LAMATTINA, L. 2011. Characterization of a Nitric Oxide Synthase from the Plant Kingdom: NO Generation from the Green Alga *Ostreococcus tauri* Is Light Irradiance and Growth Phase Dependent. *The Plant Cell* **22**: 3816–3830.
- FRESCHI, L. TAKAHASI, C. A. CAMBUI, C. A. SEMPREGOM, T. R. CRUZ, A. B. MIOTO, P. T. VERSIEUX, L. M. CALVENTE, A. LATANSIO-AIDAR, S. R. AIDAR, M.P.M. MERCIER, H. (2009). Specific leaf areas of the tank bromeliad *Guzmania monostachia* perform distinct functions in response to water shortage. *J Plant Physiol*, **167**(7): 526-33.
- FRESCHI L, RODRIGUES MA, DOMINGUES DS, PURGATTO E, VAN SYLUS MA, MAGALHÃES JR, KAISER WM, MECIER H. (2010) Nitric oxide mediates the hormonal control of Crassulacean acid metabolism expression in young pineapple plants. *Plant Physiol* **4**: 1971-85.
- FROHLICH, A.; DURNER, J. (2011) The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Science* **181**: 401-404.
- GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2003) Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure – is nitrate reductase one of the missing links? *Trends Plant Sci.* **8**: 20-26.

- GARCIA-MATA, C.; LAMATTINA, L. (2007) Abscisic acid (ABA) inhibits light-induced stomatal opening through calcium- and nitric oxide-mediated signaling pathways. *Nitric Oxide* **17**: 143-151.
- GRUETTER, C.A.; BARRY, B.K.; MCNAMARA, D.B.; KADOWITZ, P.J.; IGNARRO, L.J. (1980) Coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by cigarette smoke, N'-nitrosonornicotine and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* **214(1)**: 9-15.
- GUO, F-Q., OKAMOTO, M., CRAWFORD, N.M.(2003) Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**: 100-103.
- GUPTA, K. J.;STOIMENOVA, M.;KAISER, W. M. (2005) In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *Journal of Experimental Botany***56**: 2601-2609.
- HASLAM, R.; BORLAND, A.; MAXWELL, K.; GRIFFITHS, H. (2003) Physiological responses of the CAM epiphyte *Tillandsia usneoides* L. (Bromeliaceae) to variations in light and water supply.*J. Plant Physiol.* **160**: 627–634.
- HE, Y.; TANG, R-H.; HAO, Y.; STEVENS, R.D.; COOK, C.W.; AHN, S.M.; JING, L.; YANG, Z.; CHEN, L.; GUO, F.; FIORANI, F.; JACKSON, R.B.; CRAWFORD, N.M.; PEI, Z-M. (2004) Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition *Science* **305**: 1968-1971.
- HERRERA, A. (2009). Crassulacean acid metabolism and fitness under water deficit stress: if not for carbon gain, what is facultative CAM good for? *Annals of Botany* **103**: 645–653.
- HERRERA, M.; HONG, N.J.; GARVIN, J.L. (2006) Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* **48**: 157-164.
- HERRERA, A.; MARTIN, C.E.; TEZARA, W.; BALLESTRINI, C.; MEDINA, E. (2010). Induction by drought of crassulacean acid metabolism in the terrestrial bromeliad, *Puyafloccosa*. *Photosynthetica* **48(3)**: 383-388.
- HOSE E.; STEUDLE E.; HARTUNG W. 2000. Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes. *Planta* **211**:874–82.
- HUNG, K.T.; KAO, C.H. (2003) Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *J. Plant Physiol.* **160**: 871–879.
- KLEPPER, L. (1979). Nitric oxide (NO) and nitrogen dioxide (NO₂) emissions from herbicide-treated soybean plants. *Atmospheric Environment* **13**: 537-542.
- LAMATTINA, L.; GARCÍA-MATA, C.; GRAZIANO, M.; PAGNUSSAT, G. (2003). Nitric oxide: The Versatility of an Extensive Signal Molecule. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**:109–136.
- LARCHER, W. (2006) *Ecofisiologia Vegetal*.Ed.Rima.

- LEHNER, C.; KERSCHBAUM, H.H.; LÜTZ-MEINDL, U. (2009) Nitric oxide suppresses growth and development in the unicellular green alga *Micrasterias denticulata*. **J. Plant Physiol.** **166**: 117–127.
- LEITNER, M.; VANDELLE, E.; GAUPELS, F.; BELLIN, D.; DELLEDONNE, M. NO signals in the haze: nitric oxide signaling in plant defence. **Current Opinion in Plant Biology** **12**: 451-458.
- LIAO, W.; XIAO, H.; ZHANG, M. (2009) Role and relationship of nitric oxide and hydrogen peroxide in adventitious root development of marigold. **ActaPhysiol Plant.** **31**: 1279-1289.
- LIAN, H.L.; YU X.; YE, Q.; DING, X.S.; KITAGAWA, Y. 2004. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant Cell Physiol.** **45**:481–89
- LIBOUREL, I.; BETHKE, P.C.; DE MICHELE, R.; JONES, R.L. (2006) Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. **Planta** **223**: 813–820.
- LINDERMAYR, C.; SAALBACH, G.; DURNER, J. (2005) Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology** **137** (3): 921-930.
- LIU, H.Y.; YU, X.; CUI, D.Y.; SUN, M.H.; SUN, W.N. TANG, Z.C. KWAK, S.S.; SU, W.A. (2007) The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell research** **17**: 638-649.
- LIU, X.; DENG, Z.; CHENG, H.; HE, X.; SONG, S. (2010) Nitrite, sodium nitroprusside, potassium ferricyanide and hydrogen peroxide release dormancy of *Amaranthus retroflexus* seeds in a nitric oxide-dependent manner. **Plant Growth Regul.** DOI 10.1007/s10725-010-9551-0.
- LUDWIG-MULLER, J.; GEORGIEV, M.; BLEY, T. (2008) Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. **Process Biochemistry** **43**: 15-23.
- MAHDIEH, M.; MOSTAJERAN, A. (2009) Abscisic acid regulates root hydraulic conductance via aquaporin expression modulation in *Nicotiana tabacum*. **J. Plant Physiol.** **166**: 1993–2006.
- MAIQUETÍA, M.; CÁCERES, A.; HERRERA, A. (2009) Mycorrhization and phosphorous nutrition affect water relations and CAM induction by drought in seedlings of *Clusia minor*. **Annals of Botany** **103**: 525-532.
- MARTINOIA, E.; RENTSCH, D. (1994) Malate compartmentation – responses to a complex metabolism. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** **45**: 447-467.
- MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D-T.; SANTONI, V. 2008. Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. **Annu. Rev. Plant Biol.** **59**: 595–624.

- MAXWELL, C.; GRIFFITHS, H.; YOUNG, A.J. (1994) Photosynthetic acclimation to light regime and water stress by the C₃-CAM epiphyte *Guzmania monostachia*: gas-exchange characteristics, photochemical efficiency and the xanthophyll cycle. ***Functional Ecology* 8**: 746-754.
- MEDINA, E.; ZIEGLER, H.; LÜTTGE, U.; TRIMBORN, P.; FRANCISCO, M. (1994) Light conditions during growth as revealed by $\delta^{13}\text{C}$ values of leaves of primitive cultivars of *Ananas comosus*, an obligate CAM species. ***Functional Ecology* 8**: 298-305.
- MODOLO, L.V.; AUGUSTO, O.; ALMEIDA, I.M.G.; MAGALHAES, J.R.; SALGADO, I. (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. ***Febs Letters*, 579**: 3814-3820.
- NEILL, S.J., DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T. (2003) Nitric oxide signalling in plants. ***New Phytol.* 159**: 11-35.
- NEILL, S.J., BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.T.; HARRISON, J.; WILSON, I. (2008) Nitric oxide evolution and perception. ***J. Exp. Bot.* 59 (1)**: 25-35.
- NEILL, S.J.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. (2008a) Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. ***J. Exp. Bot.* 59 (2)**: 165-176.
- NIEVOLA C.C.; KRAUS, J.E.; FRESCHI, L.; SOUZA, B.M.; MERCIER, H. (2005) Temperature determines the occurrence of CAM or C₃ photosynthesis in pineapple plantlets grown *in vitro*. ***In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant* 41**: 832-387.
- NINNEMANN, H.; MAIER, J. (1996) Implications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photon condition of *Neurosporacrassa*. ***Photochem.Photobiol.* 64**: 393–398.
- PATAKAS, A.A.; ZOTOS, A.; BEIS, A.S. (2011) Production, localisation and possible roles of nitric oxide in drought-stressed grapevines. ***Australian Journal of Grape and Wine Research* 16 (1)**: 203-209.
- PETERS, W.; BECK, E.; PIEPENBROCK, M.; LENZ, B, SCHIMITT, J.M. (1997) Cytokinin as a negative effector of phosphoenolpyruvate carboxylase induction in *Mesembryanthemum crystallinum*. ***J. Plant Physiol.* 151**: 362-367.
- PLANCHET, E.; GRUPTA, K.J.; SONODA, M.; KAISER, W.M. (2005). Nitric oxide emission from tobacco leaves and cell suspensions: rate limiting factors and evidence for the involvement of mitochondrial electron transport. ***Plant J.* 41**: 732-743.
- PLANCHET, E.; SONODA, M.; ZEIER, J; KAISER W.M. (2006) Nitric oxide (NO) as an intermediate in the cryptogein-induced hypersensitive response – a critical re-evaluation. ***Plant Cell Environ.* 29**: 59–69.

- POPP M.; JANETT H.P.; LÜTTGE, U.; MEDINA, E. (2003) Metabolite gradients and carbohydrate translocation in rosette leaves of CAM and C3 bromeliads. *New Phytol.* **157**: 649-656.
- ROCKEL, P.; STRUBE, F.; ROCKEL, A.; WILDT, J.; KAISER, W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J. Exp. Bot.* **53 (366)**: 103-110.
- SANTOS, I.; SALEMA, R. (1992) Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthetase, glutamate synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lateritia* Engl. *Plant Science* **84**:145-152.
- SAKAI, W.S.; SANDFORD, W.G. (1980) Ultrastructure of the water-absorbing trichomes of pineapple (*Ananas comosus*, Bromeliaceae). *Ann. Bot.* **46**: 7-11.
- SAKIHAMA, Y.; NAKAMURA, S.; YAMASAKI, H. (2002) Nitric oxide production mediated by nitrate reductase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: an alternative NO production pathway in photosynthetic organisms. *Plant Cell Physiol.* **43**: 290-297.
- SCHMITT, A.K.; LEE, H.S.J.; LÜTTGE, U. (1988) Response of the C₃-CAM tree *Clusia rosea* to light and water stress. *Journal of Experimental Botany* **39**: 1581-1590.
- SELIGMANN, K.; SAVIANI, E.E.; OLIVEIRA, H.C.; PINTO-MAGLIO, C.A.F.; SALGADO, I. (2008). Floral Transition and Nitric Oxide Emission During Flower Development in *Arabidopsis thaliana* is Affected in Nitrate Reductase-Deficient Plants. *Plant Cell Physiol.* **49 (7)**: 1112–1121.
- SLESŁAK, I.; KARPINSKA, B.; SURÓWKA, E.; MISZALSKI, Z.; KARPINSKI, S. (2003) Redox changes in the chloroplast and hydrogen peroxide are essential for regulation of C₃-CAM transition and photooxidative stress responses in the facultative CAM plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Cell Physiol.* **44**: 573-581.
- SUN, J.; LI, L.; LIU, M.; WANG, M.; DING, M.; DENG, S.; LU, C.; ZHOU, X.; SHEN, X.; ZHENG, X.; CHEN, S. Hydrogen peroxide and nitric oxide mediate K⁺/Na⁺ homeostasis and antioxidant defense in NaCl-stressed callus cells of two contrasting poplars. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **103**: 205-215.
- CONTI, S.; SMIRNOFF, N. Rapid triggering of malate accumulation in the C₃/CAM intermediate plant *Sedum telephium*: relationship with water status and phosphoenolpyruvate carboxylase. *Journal of Experimental Botany* **45**: 1613-1621.
- STÖHR, C.; STRUBE, F.; MARX, G.; ULLRICH, W.R.; ROCKEL, P. (2001) A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**: 835-841.
- TAKAHASI, C.A.; CECCANTINI, G.C.T.; MERCIER, H. (2007) Differential capacity of nitrogen assimilation between apical and basal leaf portions of a tank epiphytic bromeliad. *Braz. J. Plant Physiol.* **19**: 119-126.

- TAKAHASHI, C.A.; MERCIER, H. (2011) Nitrogen metabolism in leaves of a tank epiphytic bromeliad: Characterization of a spatial and functional division. *J.Plant Physiol.* doi:10.1016/j.jplph.2011.01.008
- TAYBI, T.; CUSHMAN, J. (1999) Signaling events leading to crassulacean acid metabolism induction in the common ice plant. *Plant Phys.* **121**: 545–555.
- TAYBI, T.; SOTTA, B.; GEHRIG, H.; GÜCLÜ, S.; KLUGE, M.; BRULFERT, J. (1995) Differential effects of abscisic acid on phosphoenolpyruvate and CAM operation in *Kalanchoë blossfeldiana*. *Bot. Acta* **198**: 240-246.
- WENDEHENNE, D.; PUGIN, A.; KLESSIG, D.F.; DURNER, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci.* **6**: 177-183.
- WILDT, J.; KLEY, D.; ROCKEL, A.P.; SEGSCHNEIDER, H. (1997) Emission of NO from several higher plant species. *J. Geophys. Res.* **102(D5)**, 5919-5927.
- WILKINSON, S.; DAVIES, W.J. (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 195-210.
- WILSON, I.D.; NEILL, S.J.; HANCOCK, J.T. (2008) Nitric oxide synthesis and signaling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**: 622-631.
- WOJTASZEK, P. (2000) Nitric oxide in plants: to NO or not to NO. *Phytochemistry* **54**: 1-4.
- XU, Y.C.; ZHAO, B.L. (2003) The main origin of endogenous NO in higher non-leguminous plants. *Plant Phys. And Bioch.* **41**: 833-838.
- YAMASAKI, H.; SAKIHAMA, Y. (2000) Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS letters*: **468** 89-92.
- ZEIDLER, D.; ZHRINGER, U.; GERBER, I.; DUBERY, I.; HARTUNG, T.; BORS, W.; HUTZLER, P.; DURNER, J. (2004) Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *PNAS* **101**: 15811-15816.
- ZEMOJTEL, T.; FRÖHLICH, A.; PALMIERI, C.; KOLANCZYK, M.; MIKULA, I.; WYRWICZ, L.; WANKER, E.E. MUNDLOS, S.; VINGRON, M.; MARTASEK, P.; DURNER, J. Plant nitric oxide synthase: a never-ending story? *Trends Plant Sci.* **11**: 524-525.