

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 Miotto

**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)

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.

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.

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 glutathione, gerando S-nitrosoglutathione (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 nitratação 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 glutathione (GSH), gerando S-nitrosoglutathione (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. crystallinum* e *Kalanchoë 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. 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 s 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.

3. 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**: 832-837.
- 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 co-ordination 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.