
Rafael Zuccarelli

Influência da luz sobre o metabolismo de
óxido nítrico em tecidos vegetativos e
reprodutivos de tomateiro

Light influence on nitric oxide metabolism in
tomato vegetative and reproductive tissues

São Paulo

2015

Rafael Zuccarelli

Influência da luz sobre o metabolismo de
óxido nítrico em tecidos vegetativos e
reprodutivos de tomateiro

Light influence on nitric oxide metabolism in
tomato vegetative and reproductive tissues

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

Orientador(a): Luciano Freschi

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica

Zuccarelli, Rafael

Influência da luz sobre o
metabolismo de óxido nítrico em tecidos
vegetativos e reprodutivos de tomateiro

Número de páginas

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

1. Óxido nítrico 2. S-nitrosilação 3.
desestiolamento

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

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr.(a).

Orientador(a)

Dedicatória

Dedico este trabalho a todas as
pessoas que não puderam,
por dificuldades da vida,
estudar e alcançar seus sonhos.

Epígrafe

EU SOU TREZENTOS

Eu sou trezentos, sou trezentos-e-cincoenta,
As sensações renascem de si mesmas sem repouso,
Ôh espelhos, ôh Pireneus! Ôh caiçaras!
Si um deus morrer, irei no Piauí buscar outro!

Abraço no meu leito as melhores palavras,
E os suspiros que dou são violinos alheios;
Eu piso a terra como quem descobre a furto
Nas esquinas, nos táxis, nas camarinhas seus próprios beijos!

Eu sou trezentos, sou trezentos-e-cincoenta,
Mas um dia afinal eu toparei comigo...
Tenhamos paciência, andorinhas curtas,
Só o esquecimento é que condensa,
E então minha alma servirá de abrigo

(Mário de Andrade, 7/6/1929. Publicada no livro *Remate de Males*, 1930)

Agradecimentos

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu orientador Luciano Freschi pela orientação presente e pela postura serena, que sempre inspirou clareza de propósito e seriedade.

Ao professor Lazáro Eustaquio Pereira Peres pela disponibilização das sementes dos genótipos de tomateiro utilizadas neste trabalho.

A todos os colegas de trabalho, ainda presentes em nossa equipe de pesquisa e aos que já se foram por outros caminhos, Bruna, Aline Tiemi, Cassia, Nielda, Alejandra, Paulo Marcelo, Paulo Mito, Aline Bertinato, Auri, Paula, Lucas, Carol, Bruno, Leonardo, Filipe, Vanessa, Marília e Ricardo.

Por fim, a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Resumo

Ao longo dos últimos anos, o radical livre gasoso óxido nítrico (NO) vem ganhando destaque como uma importante molécula sinalizadora em respostas fotomorfogênicas em plantas. Sua produção e degradação parecem incluir uma diversificada gama de rotas bioquímicas, entretanto, a importância relativa de cada um dos sistemas capazes de regular sua disponibilidade e toxicidade nos tecidos vegetais ainda permanece pouco compreendida. Dentre as possíveis rotas de conjugação e degradação do NO em tecidos vegetais, postula-se que a glutathione (GSH) desempenhe um papel de destaque no armazenamento desse radical livre por meio da formação reversível da S-nitrosoglutathione (GSNO), sendo possível sua subsequente degradação através da ação da enzima S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR). No presente trabalho investigamos a influência da luz sobre o metabolismo de NO em duas etapas de desenvolvimento vegetal caracterizados pela ocorrência de eventos de diferenciação plastidial: (I) o desestiolamento de plântulas e (II) o amadurecimento de frutos carnosos de tomateiro (*Solanum lycopersicum*). Além do genótipo selvagem Micro-Tom (MT), também foram utilizados os mutantes fotomorfogênicos *aurea* (*au*) e *high pigment 1* e *2* (*hp1* e *hp2*). Durante o desestiolamento das plântulas de tomateiro constatou-se um incremento progressivo tanto nos teores endógenos quanto nas taxas de degradação de NO, bem como na atividade da enzima GSNOR. Sob condições luminosas similares, mutantes com respostas exageradas à luz apresentaram incrementos ainda mais evidentes nesses parâmetros do que aqueles observados no genótipo selvagem. A aplicação de inibidores de S-nitrosilação de proteínas, bem como a avaliação do conteúdo de espécies reativas de oxigênio (ROS) indicaram que tanto a formação de S-nitrosotios quanto a interação do NO com ROS contribuíram para a determinação da capacidade de remoção de NO nos tecidos fotossinteticamente ativos de tomateiro. Em frutos, observou-se uma correlação positiva entre a atividade da enzima nitrato reductase (NR) e o padrão temporal de produção de NO, uma vez que ambos os parâmetros apresentaram maiores níveis em frutos imaturos. O amadurecimento desses frutos foi acompanhado por uma diminuição transitória dos conteúdos de NO ao passo que as taxas de degradação de NO mantiveram-se bastante reduzidas durante todo o processo de amadurecimento, sugerindo a existência de um estoque de NO na forma de GSNO ou algum outro S-nitrosotiol. A sinalização

luminosa influenciou positivamente tanto a produção quanto a degradação de NO em frutos imaturos de tomateiro. Em conjunto, os resultados obtidos permitem concluir que o metabolismo do NO em tomateiro é fortemente controlado pela luz, a qual é capaz de modular conjuntamente as taxas de produção e degradação desse importante composto sinalizador.

Abstract

In recent years, the gaseous free radical nitric oxide (NO) has emerged as an important signaling molecule in plant photomorphogenic response. NO production and degradation seems to include a wide range of biochemical routes; however, the relative importance of which one of the systems capable of regulating NO availability and toxicity in plant tissues remains elusive. Among all potential NO degradation and conjugation routes in plant tissues, it has been suggested that glutathione (GSH) plays a key role in NO storage due to the formation of S-nitrosogluthathione (GSNO), being possible its subsequent degradation by the action of enzyme S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR). In this work, we have investigated the light influence on NO metabolism during two plant developmental events characterized by the occurrence of plastidial differentiation: (I) seedling de-etiolation and (II) fruit ripening of tomato (*Solanum lycopersicum*). Besides the wild-type Micro-Tom (MT) genotype, the tomato photomorphogenic mutants *aurea* (*au*) and *high pigment 1* and *2* (*hp1* and *hp2*) were also employed in this study. During the de-etiolation of tomato seedlings, a progressive increment was observed in the NO endogenous levels and degradation rates as well as in the GSNOR activity. Under similar light conditions, light hypersensitive mutants exhibited more conspicuous increases in these parameters than those detected in the wild-type genotype. Feeding protein S-nitrosylation inhibitors and measurements of reactive oxygen species (ROS) production indicated that both S-nitrosothiols formation and NO interaction with ROS may to contribute for determining the NO removal capacity in photosynthetically active tissues of tomato. In fruits, a positive correlation was observed between nitrate reductase (NR) activity and the temporal pattern of NO production since both parameters exhibited increased levels in immature fruits. The ripening of these fruits was accompanied by a transitory reduction in endogenous NO levels whereas its degradation rates were maintained reduced all over the ripening process, thereby suggesting the existence of a more stable NO reservoir such as GSNO or some other S-nitrosothiol. In general light signaling positively influenced both NO production and degradation in mature green tomato fruits. Altogether, the data obtained indicated that tomato NO metabolism is significantly influenced by light, which is able to simultaneous modulate both the production and degradation of this important signaling compound.

Introdução Geral

1. Óxido nítrico como sinalizador em sistemas biológicos

O óxido nítrico (NO) é um composto gasoso que pode ser produzido industrialmente a partir da oxidação da amônia e aparece como poluente atmosférico, sendo precursor da chuva ácida e do “*smog*” fotoquímico, subproduto do funcionamento de motores de combustão interna. Assim como seus análogos químicos monóxido de carbono (CO) e cianeto (CN⁻), o NO se liga irreversivelmente aos centros metálicos de proteínas e por esse motivo, em determinadas concentrações, possui efeito tóxico, particularmente no que diz respeito aos processos fisiológicos de respiração celular e trocas gasosas, como por exemplo na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, na ligação do oxigênio com a hemoglobina sanguínea ou no funcionamento dos pulmões (Cassina & Radi, 1996; Weinberger *et al.*, 2001). No entanto, o NO e algumas outras espécies reativas de oxigênio e nitrogênio vêm sendo caracterizadas recentemente como importantes compostos sinalizadores em sistemas biológicos, atuando em organismos filogeneticamente distantes como bactérias, fungos, plantas e animais (Lamattina *et al.*, 2003; Baidya *et al.*, 2011; Barnes *et al.*, 2014). Devido ao histórico de sua descoberta e interesse médico, a maior parte do conhecimento atual e investimento em pesquisas acerca da atuação e metabolismo do NO encontra-se centrada em modelos animais, particularmente em mamíferos (Palmer *et al.*, 1987; Radomski *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1992; Thomsen *et al.*, 1995; Hirata & Yokoyama, 1996; Förstermann & Sessa, 2012). Um dos primeiros trabalhos desenvolvidos nessa temática demonstrou a participação do NO no relaxamento da musculatura lisa do endotélio dos vasos sanguíneos por meio da ativação da guanilciclase, enzima responsável pela produção do mensageiro secundário monofosfato

cíclico de guanosina cíclico (GMPc) (Arnold *et al.*, 1977). Trabalhos posteriores, também em animais, indicaram a participação do NO em diversos processos, tais como na regulação da neurotransmissão no cérebro (Jaffrey and Snyder, 1995), agregação plaquetária (Radomski *et al.*, 1987), aprendizado e memória (Zoubovsky *et al.*, 2011), função sexual masculina (Melis & Argiolas, 1997), citotoxicidade e citoproteção (Kröncke *et al.*, 1997), desenvolvimento de aterosclerose (Lloyd-jones & Bloch, 1996), ativação das defesas do sistema imune (Wei *et al.*, 1995), entre muitas outras.

Apesar das evidências acumuladas até o momento, os mecanismos exatos de atuação em cada um desses processos ainda é objeto de enorme debate, envolvendo diferentes rotas de transformação química, assim como múltiplas vias de produção, degradação e sinalização (Stamler, 1994; Lundberg *et al.*, 2008; Sato *et al.*, 2012). A partir de 1998, um número crescente de trabalhos tem indicado um importante papel sinalizador para o NO em um grande leque de respostas fisiológicas em plantas (Baudouin, 2011). Além das limitações técnicas em transpor resultados *in vitro* para as condições *in vivo*, as evidências atualmente disponíveis sugerem que em comparação com sistemas animais, as plantas metabolizam o NO através de vias consideravelmente mais complexas e diversificadas (Yu *et al.*, 2014).

Um papel de destaque tem sido atribuído ao NO como molécula sinalizadora em inúmeras respostas à estresses bióticos e abióticos em plantas, tais como alterações bioquímicas em resposta à deficiência nutricional (Lamattina *et al.*, 2003; Graziano & Lamattina, 2007), ativação de mecanismos de defesa a patógenos (Klessig *et al.*, 2000; Romero-Puertas *et al.*, 2004), aumento da tolerância à salinidade (Zhang *et al.*, 2006a) e ao estresse oxidativo (Velikova *et al.*, 2008), resistência a metais pesados (Kopyra & Gwózdź, 2003), dentre outras.

Em processos ligados ao desenvolvimento, o NO tem sido descrito como sinalizador da germinação e desestiolamento (Beligni & Lamattina, 2000), formação de raízes laterais e adventícias (Lanteri *et al.*, 2006), senescência (Leshem & Haramaty, 1996), amadurecimento de frutos (Lamattina *et al.*, 2003), entre muitos outros.

Até o momento, a maioria dos mecanismos de interação do NO com diversas classes de hormônios vegetais sugere sua atuação como um possível mensageiro secundário (Neill *et al.*, 2003). Em contrapartida, tendo em vista sua produção em baixas concentrações, capacidade de desencadear respostas de forma dose-dependente e fácil difusão pelos tecidos, alguns autores consideram que o próprio NO poderia ser classificado como um novo hormônio vegetal (Beligni & Lamattina, 2001).

2. Propriedades químicas e vias de sinalização do óxido nítrico em plantas

O óxido nítrico, ou monóxido de nitrogênio, de fórmula NO, é um composto inorgânico, lipofílico que se destaca por ser um dos poucos compostos gasosos que atuam como sinalizadores em sistemas biológicos (Bleecker & Kende, 2000; Lefer, 2007; Song *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Mur *et al.*, 2013). É também notável por consistir, em sua forma neutra (NO[•]), de um radical livre, possuindo um elétron em seu orbital anti-ligante 2p- π (Stamler *et al.*, 1992), característica essa que confere alta reatividade e instabilidade química, permitindo sua participação em uma grande variedade de reações químicas com compostos presentes em seres vivos. No entanto, nas baixas concentrações em que o NO é encontrado no meio aquoso das células vegetais (pM a nM), este é relativamente estável, apresentando uma meia-vida na faixa de minutos (Planchet & Kaiser, 2006).

O NO prontamente forma complexos com íons de metais de transição, incluindo aqueles encontrados em metaloproteínas (McCleverty, 2004). Reações com proteínas contendo o grupo heme têm sido extensivamente estudadas, particularmente as reações envolvendo hemoglobinas (Wei *et al.*, 1995; Igamberdiev and Hill, 2004). Sua participação em processos bioquímicos envolve uma cadeia de formas redox intercambiáveis: o cátion nitrosônio (NO^+), o óxido nítrico (NO^\bullet) e o ânion nitroxil (NO^-). Tanto o NO^+ quanto o NO^\bullet podem nitrosilar grupos tióis de cisteínas em proteínas e peptídios (R-S-NO), potenciamente regulando as atividades de proteínas e fatores de transcrição (Lamattina *et al.*, 2003). Além dessas formas redox, diversos produtos resultantes de sua reação com outras substâncias são também candidatos prováveis na cadeia de reações envolvendo a sinalização por NO. Por exemplo, em presença de superóxido (O_2^-) o NO é rapidamente convertido em peroxinitrito (ONOO^-) que por sua vez pode levar a formação de nitrito (NO_2) e o potente radical livre hidroxila OH^\bullet . O peroxinitrito pode, também, promover a nitração de tirosinas (Tyr-NO_2) ou a oxidação dos resíduos tióis em ácidos sulfênicos e sulfônicos, modificando a estrutura terciária e funções de proteínas e fatores de transcrição (Lamattina *et al.*, 2003).

Também chama a atenção o fato do NO não poder ser facilmente armazenado na célula, e possuir uma difusibilidade maior do que outros solutos de natureza sólida ou líquida. Além de possuir características lipofílicas e carga neutra, permeando com facilidade as membranas celulares, possui também moderada solubilidade em meio aquoso (McCleverty, 2004). Essas características únicas permitem ao NO ser facilmente transportado através dos meios intra e extracelular, difundindo-se livremente. A especificidade de sua ação como molécula sinalizadora em plantas, parece ser, portanto, altamente dependente do fino controle de sua rápida produção, e

em especial, do controle temporal e espacial de sua degradação ou conjugação com outros compostos.

3. Vias de produção de NO em plantas

A produção de NO em plantas pode ser dividida em duas vias principais: vias dependentes de nitrito (vias redutivas) e vias dependentes de L-arginina (vias oxidativas)(Gupta *et al.*, 2011).

3.1. Vias de produção de NO dependentes de nitrito

Sistemas vegetais parecem apresentar diferentes sistemas de produção de NO a partir de nitrito, os quais seguem a reação química geral:



A nitrato redutase (NR), enzima que normalmente reduz nitrato a nitrito, às custas do consumo de NAD(P)H, é também capaz de transferir um elétron do NAD(P)H para o nitrito resultando na formação de NO (número de oxidação do nitrogênio +5, +3 e +2, respectivamente). Essa enzima, que ocupa uma posição central no metabolismo de nitrogênio das plantas, por realizar uma vez que realiza o primeiro passo na conversão do nitrato em amônia (forma assimilável de N), tem se mostrado uma importante fonte de óxido nítrico, sendo a produção desse radical livre dependente da regulação da atividade da enzima por fosforilação (Rockel *et al.*, 2002).

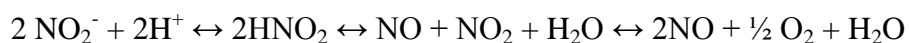
Além da NR citossólica, estudos demonstram que uma NR associada com uma nitrito redutase, ambas ligadas à membrana plasmática, também seriam capazes de produzir NO, estando esse complexo está presente exclusivamente apenas nas raízes e levando à produção de NO no espaço apoplástico (Stöhr & Stremmlau, 2006). Essa via

de produção de NO é altamente dependente de condições ambientais, tais como disponibilidade de nitrato ou oxigênio, e evidências recentes têm demonstrado sua importância no controle da formação de micorrizas (Gupta *et al.*, 2011).

A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial também tem sido indicada como uma fonte potencial de NO, especialmente em situações de baixas tensões de oxigênio (Igamberdiev & Hill, 2004). Na impossibilidade de utilizar o oxigênio como aceptor final de elétrons, a citocromo c oxidase exibe a capacidade de reduzir nitrito a NO, condição inversa a que ocorre em aerobiose, onde esta enzima é capaz de consumir NO e produzir nitrito, mantendo, ao menos parcialmente, o *status* energético da célula (Gupta & Igamberdiev, 2011).

Nos cloroplastos, as membranas dos tilacóides também parecem estar envolvidas no processo de produção de NO a partir de nitrito. Contudo, cabe ressaltar que o cloroplasto é uma importante fonte de radical O_2^- , e a formação de peroxinitrito a partir do NO e O_2^- estaria associada à ocorrência de peroxidação de lipídios e proteínas nessa organela, ambos importantes na modulação de seu funcionamento (Jasid *et al.*, 2006). Ademais, estudos *in vitro* indicam a possibilidade da participação dos peroxissomos na produção de NO a partir da redução do nitrito, sendo esta reação catalizada pela enzima xantina oxidoreductase (XOR). Os produtos predominantes da ação desta enzima em condições aeróbicas são o ácido úrico e o superóxido, entretanto, em condições de anaerobiose, essa enzima reduz o nitrito em NO, utilizando NADH e xantina como agente redutor (Gupta *et al.*, 2011).

Finalmente, existe a produção de NO no espaço apoplástico através da redução não enzimática de nitrito, em pH ácido, segundo a reação reversível:



Agentes redutores como ácido ascórbico e compostos fenólicos podem deslocar o equilíbrio da reação no sentido da formação do NO, aumentando sua taxa de produção (Bethke *et al.*, 2006).

3.2. Vias de produção de NO dependentes de L-arginina

Uma diversificada família de enzimas conhecidas como NO sintases (NOS) estão amplamente presentes em animais, sendo responsáveis pela reação de oxidação de L-arginina em L-citrulina com a liberação de NO. A reação de oxidação ocorre por meio de um grupo heme, em presença de oxigênio, com o consumo de NADPH. Seu funcionamento é dependente da presença de calmodulina e Ca^{2+} (Alderton *et al.*, 2001). Até o presente momento, a existência de NO sintases, sejam elas homologas ou não-homologas às encontradas em animais, não foi demonstrada de maneira definitiva em plantas. Apesar disso, a atividade do tipo NOS, com produção de óxido nítrico dependente de L-arginina já foi extensivamente demonstrada em plantas (Zhao *et al.*, 2007; Issue, 2009; Fröhlich & Durner, 2011).

Outras vias de produção de NO com participação de L-arginina estão sendo investigadas atualmente, com resultados ainda inconclusivos. Dentre elas, destacam-se a liberação de NO durante a síntese de poliaminas e a produção de NO a partir de hidroxilamina (Gupta *et al.*, 2011).

4. Mecanismos de degradação de NO

A diversidade de origens e processos em que o NO participa sugere a existência de mecanismos de degradação ou inativação que sejam capazes de controlar seus níveis, bem como sua reatividade e função sinalizadora. Por exemplo, as hemoglobinas são reconhecidas como capazes de modular a homeostase do NO,

tanto por oxidação quanto por reações de S-nitrosilação em plantas (Perazzolli *et al.*, 2006). Por outro lado, a enzima S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) também tem sido indicada como uma das principais rotas pelas quais o metabolismo do NO e de moléculas derivadas do NO pode ser regulada (Salgado *et al.*, 2013). Outras vias são indicadas na literatura, com resultados ainda incertos em relação a sua importância e com poucas evidências *in vivo* de suas atuações na degradação do NO em plantas.

4.1. Hemoglobinas

As hemoglobinas são encontradas de forma ubíqua em eucariotos e estão também presentes em muitas bactérias (Watts *et al.*, 2001). Ao menos três tipos foram categorizados em plantas: simbiótica, não-simbiótica e truncada.

A hemoglobina simbiótica é certamente a mais conhecida, sendo encontrada principalmente nas células infectadas por bactérias simbióticas fixadoras de nitrogênio de nódulos de raízes de plantas leguminosas (Arredondo-Peter *et al.*, 1998). Estas se acumulam no citosol em concentrações relativamente altas, mantendo a concentração de oxigênio estável e em escala nanomolar. As baixas tensões de oxigênio evitam a inativação da enzima nitrogenase presente nas bactérias, e ao mesmo tempo a hemoglobina armazena oxigênio, permitindo a continuidade da respiração (Ott *et al.*, 2005).

Em contrapartida, as hemoglobinas não-simbióticas, como o próprio nome sugere, não estão ligadas à fixação simbiótica de nitrogênio. Ocorrem em sementes, raízes, folhas e outros órgãos de praticamente todas as espécies vegetais (Igamberdiev & Hill, 2004). São classificadas em dois tipos principais no que diz respeito à intensidade da ligação química com o oxigênio. As pertencentes ao primeiro tipo (classe 1), possuem uma altíssima afinidade com o oxigênio e como resultado

apresentam-se majoritariamente no estado oxigenado na maior parte das condições fisiológicas. São induzidas em condições de estresse, especialmente durante anóxia e hipóxia (Igamberdiev & Hill, 2004). As pertencentes ao segundo tipo (classe 2), possuem afinidade ao oxigênio semelhante a das hemoglobinas simbióticas e sua função ainda não está bem estabelecida (Dordas, 2003).

A importância das hemoglobinas de classe 1 em plantas têm sido evidenciada pela descoberta de uma possível via fermentativa em condições de hipóxia envolvendo o nitrito como aceptor final alternativo, na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, gerando NO como produto (Gupta & Igamberdiev, 2011). A hemoglobina atua convertendo o NO em nitrato (NO_3^-). O nitrato por sua vez é convertido em nitrito (NO_2^-) pela ação da enzima nitrato redutase as custas de consumo de NADH, reiniciando o ciclo (Igamberdiev & Hill, 2004).

A via sugerida nesse, e em outros trabalhos (Perazzolli *et al.*, 2004), estabelece que a oxihemoglobina [$\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$] liga-se ao NO, formando S-nitrosohemoglobina. O NO é oxidado em nitrato (NO_3^-) tendo como produto a metHb [$\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$]. A metHb é então reduzida a [$\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$] por uma metHb redutase, as custas do consumo de NAD(P)H. A [$\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})$] é prontamente oxigenada [$\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$], dada a altíssima afinidade pelo oxigênio, ocorrendo mesmo em concentrações muito baixas (nanomolar), e, desse modo, a oxihemoglobina é regenerada (Figura 1). Esse ciclo mantém o funcionamento da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, resultando na regeneração do NAD(P)H e do NADH no processo, mantendo os níveis de NO sob controle. Essa via contribui com a produção de ATP sob hipóxia, mantendo baixos os níveis de fermentação láctica e alcoólica (Igamberdiev and Hill, 2004).

As hemoglobinas truncadas foram as últimas a serem descobertas e também possuem ampla distribuição, porém suas propriedades bioquímicas e estrutura

terciária distinta sugerem diferentes funções celulares, ainda desconhecidas (Dordas, 2003).

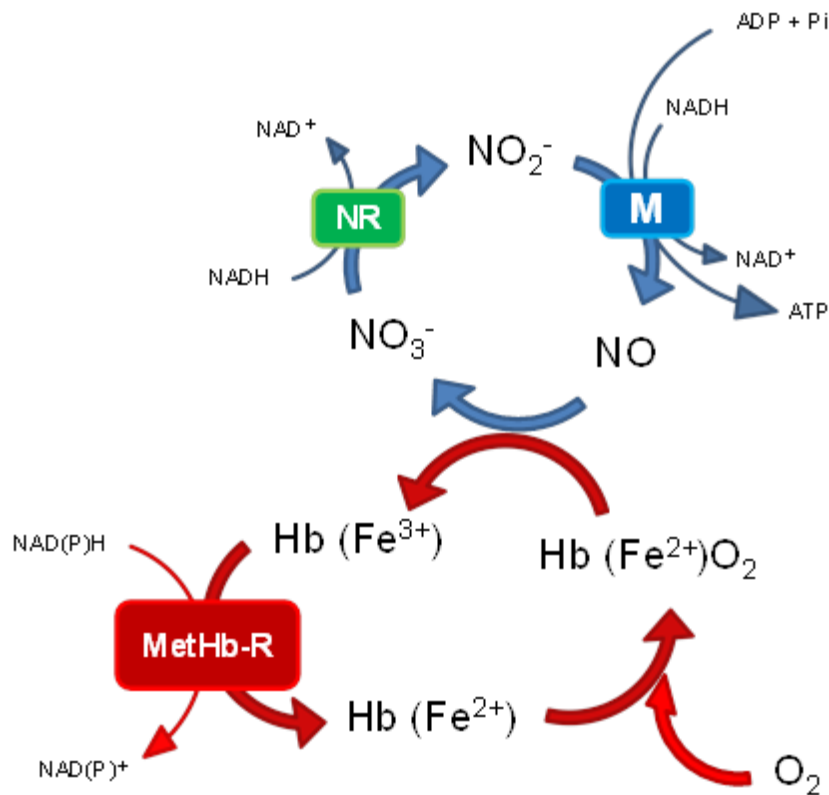


Figura 1. Representação esquemática do ciclo da hemoglobina/NO em plantas sob hipóxia. A enzima nitrato redutase (NR) converte nitrato em nitrito às custas do consumo de NADH. A cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (M) utiliza o nitrito como aceptor final de elétrons alternativo. A oxihemoglobina [$\text{Hb}(\text{Fe}^{2+})\text{O}_2$] converte o NO em NO_3^- convertendo-se em MetHb [$\text{Hb}(\text{Fe}^{3+})$]. A oxihemoglobina é regenerada pela enzima MetHb redutase seguida da ligação com o oxigênio (modificado de Igamberdiev & Hill, 2004).

4.2. S-nitrosoglutathione redutase

A glutathione é um tripeptídeo (γ -glutamilcisteinilglicina) que contém uma ligação peptídica não usual entre o grupo amino de uma cisteína ligado ao grupo carboxil da cadeia lateral de um glutamato. A cisteína está ligada também a uma glicina por uma ligação peptídica normal. É conhecido por atuar direta ou indiretamente em quase todos os processos celulares, tais como síntese protéica e de DNA, atividade enzimática, transporte de metabólitos, proteção celular, entre outros

(Meister & Anderson, 1983). É um potente antioxidante e participa de importantes mecanismos de prevenção de danos celulares causados por formas radicais livres como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Szalai *et al.*, 2009; Zechmann, 2014).

Está presente em grandes concentrações celulares em tecidos de plantas, animais e micro-organismos (0,1-10 mM) (Meister, 1988). Existe sob duas formas como sulfidril (reduzido, GSH) e como dissulfeto (GSSG). O grupo tiol da cisteína, em sua forma reduzida, é capaz de doar um elétron ($H^+ + e^-$) para outras moléculas instáveis, processo pelo qual ela própria se torna instável, ligando-se a outra glutathiona no mesmo estado oxidado, formando o dímero glutathiona dissulfeto (GSSG). A enzima glutathiona redutase (GR) converte-a novamente para a forma GSH às custas do consumo de NAD(P)H. Por esse motivo a maior parte das células possuem 90% de sua glutathiona em sua forma GSH (Meister, 1988).

O óxido nítrico reage com o GSH por meio de uma reação de S-nitrosilação, formando a S-nitrosogluthiona (GSNO) (Figura 2). Essa é atualmente considerada uma das reações mais importantes no metabolismo do NO em plantas, uma vez que a GSNO consistiria num possível reservatório móvel de NO, aumentando, portanto, a possibilidade de estocagem e transporte desse composto sinalizador (Barroso *et al.*, 2006; Corpas *et al.*, 2013). O mais notável sobre essa rota metabólica é a presença de uma GSNO redutase (GSNOR) conservada, de bactérias a humanos, sendo responsável pela conversão de GSNO em GSSG e NH_3 (Figura 2) (Liu *et al.*, 2001). Assim sendo, a molécula GSNO parece atuar não apenas como um estoque móvel de NO, mas também como um composto intermediário na rota de degradação de NO via GSNOR, e, dessa forma, representaria um importante mecanismo de regulação da disponibilidade do NO em tecidos vegetais.

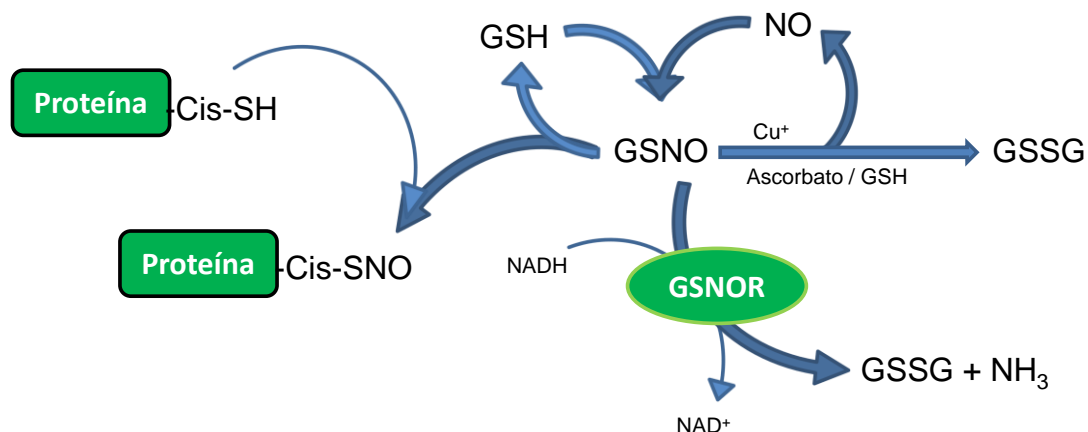


Figura 2. Representação esquemática do metabolismo da GSNO em plantas e sua regulação pela GSNO redutase. O NO reage com a glutatona reduzida (GSH) para formar S-nitrosoglutatona (GSNO), que pode ser convertida em glutatona oxidada (GSSG) e amônia (NH_3). Alternativamente, a GSNO, em presença de GSH, ascorbato e Cu^+ pode produzir NO e GSSG. A GSNO pode transferir NO para resíduos de cisteína de outros peptídeos ou proteínas (reações de S-nitrosilação). Essa modificação pós-traducional pode modificar a função de uma ampla variedade de proteínas (modificado de Leterrier *et al.*, 2014).

4.3. Interação com espécies reativas de oxigênio.

As espécies reativas de oxigênio ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) são substâncias com grande reatividade e podem interagir com a imensa maioria das moléculas biológicas. São as principais causadoras de estresse oxidativo celular e, por esse motivo, podem apresentar efeitos tóxicos, dependendo da concentração em que se encontram (Saed-Moucheshi *et al.*, 2014). Em células vegetais, as ROS são geradas por diferentes mecanismos e ocorrem em diferentes compartimentos celulares como apoplasto, mitocôndria, peroxissomos, cloroplastos e retículo endoplasmático (Saed-Moucheshi *et al.*, 2014).

O NO é capaz de reagir com tais moléculas atuando, dependendo das concentrações e dos radicais envolvidos, ora como antioxidante, ora como fontes de outras espécies reativas com poder oxidante ainda maior (Chaki *et al.*, 2009). Tal fato pode ser ilustrado no caso da reação do NO com o radical superóxido (O_2^-) dando

origem ao potente oxidante peroxinitrito ($\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$). Em baixas concentrações, ($\text{NO}/\text{O}_2^- < 1$), o incremento das taxas de NO é capaz de aumentar as taxas de peroxidação de lípidios pelo aumento na formação de peroxinitrito. Quando a concentração de NO ultrapassa a de superóxido ($\text{NO}/\text{O}_2^- > 1$) este passa a reagir com o peroxinitrito, removendo-o e inibindo a peroxidação (O'Donnell *et al.*, 1997).

Em plantas, as ROS são importantes substâncias sinalizadores em condições de estresse, tanto bióticos como abióticos, sendo responsáveis por diversas respostas de aclimação e resistência (Dat *et al.*, 2000; Baxter *et al.*, 2014). Trabalhos recentes indicam também a participação de compostos derivados da interação do NO com ROS em algumas dessas respostas à estresses (Wrzaczek *et al.*, 2010; Vandelle and Delledonne, 2011).

5. Interações entre NO e fitohormônios no desenvolvimento vegetal

É bem estabelecido que o desenvolvimento vegetal é controlado pela ação coordenada de diversas classes hormonais e outros sinalizadores endógenos, dentre os quais o NO (Freschi, 2013). Por exemplo, respostas controladas pelo hormônio ácido abscísico (ABA), tais como a abertura e o fechamento estomático e o crescimento de raízes, são induzidas concomitantemente à aumentos na produção de NO e de outras espécies reativas de oxigênio como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Hancock *et al.*, 2011).

A quebra da dormência de sementes, outro evento tipicamente controlado por ABA e giberelinas, também envolveria a participação do etileno e NO, os quais agiriam em conjunto na neutralização dos efeitos inibidores do ABA sobre a germinação (Arc *et al.*, 2013b). Em outras respostas vegetais, no entanto, a relação entre a ação do etileno e do NO ocorre de forma antagônica, tais como durante o

amadurecimento de frutos, onde o NO se mantém elevado durante os estágios imaturo do desenvolvimento e diminui sua concentração ao longo do amadurecimento, situação inversa a do etileno (Manjunatha *et al.*, 2012). Aliás, a aplicação de NO tem sido proposta por diversos trabalhos como estratégia para o atraso no processo de amadurecimento de frutos e senescência em folhas e folhas destacadas (Li *et al.*, 2014). No caso da ação do NO durante o amadurecimento de frutos, um dos mecanismos de ação sugeridos envolve a inibição da produção de etileno. Um desses mecanismos parece consistir na ligação do NO com o precursor do etileno, o ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) e a enzima ACC oxidase, formando um complexo estável (Zaharah & Singh, 2011a). Além disso, o NO parece reprimir o acúmulo de transcritos de diferentes enzimas chaves da via de biossíntese de etileno, bem como controlar a produção de etileno por meio da S-nitrosilação da enzima metionina adenosiltransferase, inibindo sua atividade (Lindermayr *et al.*, 2006).

De forma similar, durante a senescência foliar e de peças florais, outro processo promovido pelo etileno, o NO também apresenta um forte efeito inibitório (Leshem *et al.*, 1998). No entanto, alguns desses estudos se valem da aplicação exógena de NO, que em determinadas concentrações é tóxico e está envolvido na sinalização de morte celular programada (Procházková & Wilhelmová, 2011).

6. Luz e metabolismo do NO

A percepção da luz pelas plantas é uma forma de otimizar as reações fotossintéticas e regular seu crescimento e desenvolvimento. Muitos processos tais como a germinação de sementes, inibição do alongamento de hipocótilos e caules, bem como a diferenciação dos cloroplastos são controlados pela luz (Beligni &

Lamattina, 2000). Essas respostas são essencialmente mediadas por fotorreceptores específicos para determinadas faixas de comprimento de onda do espectro luminoso.

São conhecidas ao menos quatro classes de fotorreceptores em plantas: os sensíveis à luz azul (criptocromos e fototropinas) e UV-A (criptocromos), os sensíveis ao UV-B (proteína UVR8, em *Arabidopsis*) e os fitocromos, os quais respondem aos comprimentos de onda vermelho (V) e vermelho-extremo (VE) (Fankhauser & Chory, 1997). Ainda que o conhecimento acerca da percepção da luz em vegetais tenha avançado significativamente, os mecanismos pelos quais esses fotorreceptores traduzem a informação luminosa em sinais bioquímicos ainda necessitam ser melhor esclarecidos. Dentre esses mecanismos, sabe-se, por exemplo, que o NO é capaz de participar do controle de diversas respostas fisiológicas moduladas pela luz via fitocromos, tais como a germinação de sementes fotoblásticas, alongamento caulinar, diferenciação plastidial e síntese de clorofilas (Giba *et al.*, 1998; Beligni & Lamattina, 2000; Melo, 2014).

Além dos receptores de luz clássicos, a presença da atividade fotossintética devido à presença de cloroplastos funcionais também consiste numa importante fonte de informação do contexto luminoso em que a planta se encontra, e parece influenciar a presença de NO nas células vegetais (Ördög *et al.*, 2013). Em contrapartida, estudos têm demonstrado que o NO estimula a formação e diferenciação de cloroplastos bem como a síntese de clorofilas (Tewari *et al.*, 2013; Melo *et al.*, 2014), apresentando, ainda, um importante papel na regulação da atividade fotossintética (Galatro *et al.*, 2013). De modo interessante, fortes indícios de correlação entre a percepção da luz via fitocromos e a produção de NO em plantas também foram recentemente obtidos em nosso laboratório, por meio do uso de mutantes de tomateiro deficientes na síntese desse fotorreceptor (Zuccarelli & Freschi, 2010). Nesse trabalho, verificou-se que a

condição de escuro era capaz de induzir aumentos de até cinco vezes na emissão de óxido nítrico por plântulas selvagens e de mutantes fotormorfogênicos, porém, essa emissão massiva de NO era fortemente inibida sob diversas condições de luz, mesmo sob baixas intensidades luminosas ($5 \mu\text{moles de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Entretanto, no mutante deficiente para fitocromos *yellow green 2* o comportamento de produção de NO sob luz vermelha (630-650 nm) de baixa intensidade ($5 \mu\text{moles de f\u00f3tons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) foi semelhante à condição de escuro, indicando a possível participação dos fitocromos. Neste mesmo mutante, luz vermelha de maior intensidade ($200 \mu\text{moles de f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) foi capaz de inibir a emissão de NO, ainda que os níveis tenham se mantido acima daqueles encontrados na variedade selvagem sob mesma condição luminosa.

7. O tomateiro como modelo para estudos sobre a fotomorfogênese vegetal

O tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) é uma espécie de grande importância não apenas em termos agronômicos, mas também como modelo de estudo para diversos aspectos fisiológicos não presentes em outras plantas modelos tais como *Arabidopsis*, arroz, tabaco, etc. Uma das características mais marcantes desse modelo é a presença de um fruto carnoso, com amadurecimento tipicamente climatérico. Dentre os recursos genéticos disponíveis para essa espécie, encontramos em *S. lycopersicum* uma grande variedade de cultivares, mutantes e transgênicas com alterações em diversos aspectos metabólicos e de desenvolvimento (Gray *et al.*, 1994). Existem, por exemplo, mutantes descritos para a síntese de fotorreceptores (Kendrick, 1996), em vias de transdução de sinais luminosos (Kendrick *et al.*, 1997), padrões de amadurecimento (Lanahan *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 2005), entre outros. Existem também diversos mutantes com alterações na produção ou sensibilidade a

diversos hormônios vegetais como auxinas (Daniel *et al.*, 2014), citocininas (Pino-Nunes, 2005), giberelinas (George Jones, 1987), etileno (Lanahan *et al.*, 1994) e ácido abscísico (Burbidge *et al.*, 1999). Tais recursos genéticos representam uma ferramenta de grande valor para pesquisas diversas.

Quando comparado com o modelo clássico *Arabidopsis thaliana*, a cultivar miniatura de tomateiro Micro-Tom, proposta como modelo genético apresenta diversas vantagens frente às variedades comerciais de tomateiro (Meissner *et al.*, 1997), tais como possuir tamanho reduzido, ser capaz de produzir frutos e sementes em vasos de pequeno volume (50-150 mL) e completando seu ciclo de vida bastante curto (em 70-90 dias). Suas sementes e plântulas apresentam tamanho maior do que as de *Arabidopsis* o que facilita a separação de porções como cotilédones, hipocótilos ou raízes para análises bioquímicas e moleculares (Lombardi-Crestana *et al.*, 2012). Assim como *Arabidopsis*, o tomateiro apresenta um genoma de tamanho relativamente pequeno e com poucas sequências repetitivas de DNA (Breeding & Hall, 1988), o qual já se encontra totalmente sequenciado (Sato *et al.*, 2012).

Diante das interessantes evidências já obtidas em nosso laboratório acerca da influência da luz sobre os teores endógenos de NO em plântulas de tomateiro (Zuccarrelli & Freschi, 2010; Melo, 2014) esse material de estudo parece representar um sistema interessante para estudos mais aprofundados acerca dos mecanismos bioquímicos e fisiológicos responsáveis pela produção, conjugação e degradação desse composto sinalizador. Por exemplo, a avaliação detalhada e simultânea dos conteúdos de NO e de sua degradação, ao longo de diferentes condições luminosas constitui por si só numa estratégia interessante para avaliar a possível interdependência entre diferentes aspectos do metabolismo desse radical livre com vistas à proporcionar a manutenção de seus níveis endógenos em patamares

adequados. Por outro lado, por se tratar de uma espécie modelo para estudos sobre a formação, desenvolvimento e amadurecimento de frutos carnosos climatéricos, o tomateiro representa um material bastante interessante não apenas para estudos sobre o metabolismo do NO em tecidos vegetativos, mas também em tecidos do fruto, cujo amadurecimento encontra-se sob forte influência do NO e que apresenta grande importância nutricional e econômica. Ademais, essa espécie consiste ainda num material de estudo bastante interessante para se investigar a importância de cloroplastos funcionais sobre o metabolismo de NO, uma vez que apresenta não apenas a clássica conversão de etioplastos em cloroplastos durante o desestiolamento de suas plântulas, mas também apresenta a conversão de cloroplastos em cromoplastos em seus frutos carnosos, sendo que ambos esses processos encontram-se sob forte influência de sinais luminosos. Estudos sobre o metabolismo e sinalização do NO durante esses eventos de diferenciação plastidial, poderiam, portanto, proporcionar evidências interessantes sobre o papel dessas organelas no ainda pouco elucidado cenário das interações entre luz e NO em tecidos vegetais.

Objetivos

O presente trabalho buscou investigar a influência da luz sobre o metabolismo de NO durante a conversão de etioplastos em cloroplastos em plântulas de tomateiro e a conversão de cloroplastos em cromoplastos durante o amadurecimento dos frutos carnosos dessa espécie.

Conclusões

No presente trabalho constatamos uma correlação positiva entre os conteúdos endógenos e as taxas de degradação de NO, indicando que a disponibilidade tecidual desse radical livre estaria sob controle preciso de diferentes mecanismos de conjugação e/ou degradação.

De modo geral, tecidos portadores de cloroplastos funcionais (*e.g.*, plântulas desestioladas, frutos imaturos) apresentaram maiores taxas tanto de produção quanto de remoção de NO dos tecidos, denotando um possível papel chave para essa organela no metabolismo de NO.

Tanto a produção quanto a degradação de NO em tomateiro parecem estar sob regulação da luz, uma vez que incrementos em ambos processos foram observados em plântulas expostas à luz, bem como em tecidos cotiledonares e de frutos de mutantes hipersensíveis à esse sinal ambiental.

Os dados obtidos também sugerem que a S-nitrosilação consistiria num importante mecanismo de remoção do NO tanto em plântulas quanto em frutos de tomateiro. Embora os resultados obtidos indiquem a enzima GSNOR de tomateiro seja estimulada pela luz, estudos adicionais ainda serão necessário para esclarecer os mecanismos pelos quais esse sinal ambiental influenciaria a capacidade de remoção de NO nos tecidos vegetativos e reprodutivos de tomateiro.

Referências Bibliográficas

- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG.** 2001. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal* **357**, 593–615.
- Alexander L, Grierson D.** 2002. Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *Journal of experimental botany* **53**, 2039–2055.
- Amaral J a. T, Da Matta FM, Rena AB.** 2001. Effects of fruiting on the growth of Arabica coffee trees as related to carbohydrate and nitrogen status and to nitrate reductase activity. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* **13**, 66–74.
- An L, Liu Y, Zhang M, Chen T, Wang X.** 2005. Effects of nitric oxide on growth of maize seedling leaves in the presence or absence of ultraviolet-B radiation. *Journal of plant physiology* **162**, 317–26.
- Andrews PK, Fahy D a., Foyer CH.** 2004. Relationships between fruit exocarp antioxidants in the tomato (*Lycopersicon esculentum*) *high pigment-1* mutant during development. *Physiologia plantarum* **120**, 519–528.
- Arc E, Galland M, Godin B, Cueff G, Rajjou L.** 2013a. Nitric oxide implication in the control of seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science* **4**, 346.
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A.** 2013b. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in plant science* **4**, 63.
- Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F.** 1977. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3203–3207.
- Arredondo-Peter R, Hargrove M, Moran J, Sarath G, Klucas R.** 1998. Plant hemoglobins. *Plant physiology* **118**, 1121–5.
- Asada K.** 2006. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. *Plant physiology* **141**, 391–396.
- Aslam M, Oaks a, Huffaker RC.** 1976. Effect of light and glucose on the induction of nitrate reductase and on the distribution of nitrate in etiolated barley leaves. *Plant physiology* **58**, 588–591.
- Baidya S, Cary JW, Grayburn WS, Calvo a M.** 2011. Role of nitric oxide and flavohemoglobin homolog genes in *Aspergillus nidulans* sexual development and mycotoxin production. *Applied and environmental microbiology* **77**, 5524–8.
- Barnes RJ, Bandi RR, Chua F, Low JH, Aung T, Barraud N, Fane AG, Kjelleberg S, Rice S a.** 2014. The roles of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides in biofouling of reverse osmosis membranes and nitric oxide induced dispersal. *Journal of Membrane Science* **466**, 161–172.
- Barroso JB, Corpas FJ, Carreras A, et al.** 2006. Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *Journal of Experimental Botany*. 1785–1793.
- Baudouin E.** 2011. The language of nitric oxide signalling. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* **13**, 233–42.

- Baxter A, Mittler R, Suzuki N.** 2014. ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of experimental botany* **65**, 1229–40.
- Becker TW, Foyer C, Caboche M.** 1992. Light-regulated expression of the nitrate-reductase and nitrite-reductase genes in tomato and in the phytochrome-deficient *aurea* mutant of tomato. *Planta* **188**, 39–47.
- Beevers L, Schrader LE, Flesher D, Hageman RH.** 1965. The Role of Light and Nitrate in the Induction of Nitrate Reductase in Radish Cotyledons and Maize Seedlings. *Plant physiology* **40**, 691–698.
- Beligni MV, Fath A, Bethke PC, Lamattina L, Jones RL.** 2002. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant physiology* **129**, 1642–1650.
- 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 in plants: The history is just beginning: Mini review. *Plant, Cell and Environment* **24**, 267–278.
- Beligni M V, Lamattina L.** 2002. Nitric oxide interferes with plant photo-oxidative stress by detoxifying reactive oxygen species. *Plant, Cell and Environment* **25**, 737–748.
- Bethke PC, Libourel IGL, Jones RL.** 2006. Nitric oxide reduces seed dormancy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* **57**, 517–526.
- Bielawski W, Joy KW.** 1986. Reduced and oxidised glutathione and glutathione-reductase activity in tissues of *Pisum sativum*. *Planta* **169**, 267–72.
- Bleecker a B, Kende H.** 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual review of cell and developmental biology* **16**, 1–18.
- Böttcher C, Burbidge C a, Boss PK, Davies C.** 2013. Interactions between ethylene and auxin are crucial to the control of grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening. *BMC plant biology* **13**, 222.
- Bright J, Desikan R, Hancock JT, Weir IS, Neill SJ.** 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **45**, 113–22.
- Bruggink G, Wolting H, Dassen J, Bus V.** 1988. The effect of nitric oxide fumigation at two CO₂ concentrations on net photosynthesis and stomatal resistance of tomato (*Lycopersicon lycopersicum* L. cv. Abunda). *New Phytologist*, 185–191.
- Burbidge A, Grieve TM, Jackson A, Thompson A, Mccarty DR, Taylor IB.** 1999. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant *notabilis* and its relationship with maize Vp14. **17**, 427–431.
- Cara B, Giovannoni JJ.** 2008. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science* **175**, 106–113.
- Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Benedito V a, Peres LE.** 2011. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: “Micro-Tom” as an effective toolkit for plant development research. *Plant methods* **7**, 18.
- Caspi N, Levin I, Chamovitz DA, Reuveni M.** 2008. A mutation in the tomato DDB1 gene affects cell and chloroplast compartment size and CDT1 transcript. *Plant signaling & behavior* **3**, 641–649.

- Cassina a, Radi R.** 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyxynitrite on mitochondrial electron transport. *Archives of biochemistry and biophysics* **328**, 309–316.
- Chaki M, Fernández-Ocaña AM, Valderrama R, Carreras A, Esteban FJ, Luque F, Gómez-Rodríguez M V, Begara-Morales JC, Corpas FJ, Barroso JB.** 2009. Involvement of reactive nitrogen and oxygen species (RNS and ROS) in sunflower-mildew interaction. *Plant & cell physiology* **50**, 265–79.
- Chaki M, Valderrama R, Fernández-Ocaña AM, et al.** 2011. Mechanical wounding induces a nitrosative stress by down-regulation of GSNO reductase and an increase in S-nitrosothiols in sunflower (*Helianthus annuus*) seedlings. *Journal of experimental botany* **62**, 1803–13.
- Chen J, Hu W-J, Wang C, Liu T-W, Xiao Q, He B-Y, Wang W-H, Zheng H-L.** 2014. Proteomic Analysis Reveals Nitric Oxide Functions in Promoting Etiolated Barley Seedlings Greening. *Crop Science* **54**, 757.
- Choy B, Soegiarto L, Wills RBH.** 2004. Fumigation with Nitric Oxide Gas in Air to Extend the Postharvest Life of Broccoli, Green Bean, and Bok Choy. *Hortechonology* **14**, 538–540.
- Corpas FJ, Alché JD, Barroso JB.** 2013. Current overview of S-nitrosoglutathione (GSNO) in higher plants. *Frontiers in plant science* **4**, 126.
- Corpas FJ, Barroso JB.** 2014. Functional implications of peroxisomal nitric oxide (NO) in plants. *Frontiers in plant science* **5**, 97.
- Corpas FJ, Chaki M, Fernández-Ocaña A, Valderrama R, Palma JM, Carreras A, Begara-Morales JC, Airaki M, del Río L a, Barroso JB.** 2008. Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant & cell physiology* **49**, 1711–22.
- Crawford NM.** 2006. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *Journal of experimental botany* **57**, 471–8.
- Crawford NM, Guo F-Q.** 2005. New insights into nitric oxide metabolism and regulatory functions. *Trends in plant science* **10**, 195–200.
- Creissen G, Firmin J, Fryer M, et al.** 1999. Elevated glutathione biosynthetic capacity in the chloroplasts of transgenic tobacco plants paradoxically causes increased oxidative stress. *The Plant cell* **11**, 1277–1292.
- Daniel SG, Rayle DL, Cleland RE.** 2014. Auxin Physiology of the Tomato Mutant *diageotropica*. *Plant physiology* **91**, 804–807.
- Dat J, Vandenameele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F.** 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* **57**, 779–795.
- Davey JE, Van Staden J.** 1978. Endogenous cytokinins in the fruits of ripening and non-ripening tomatoes. *Plant Science Letters* **11**, 359–364.
- Deng MD, Moureaux T, Leydecker MT, Caboche M.** 1990. Nitrate-reductase expression is under the control of a circadian rhythm and is light inducible in *Nicotiana tabacum* leaves. *Planta* **180**, 257–261.
- Desikan R, Griffiths 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*.

- Dordas C.** 2003. Plant Haemoglobins, Nitric Oxide and Hypoxic Stress. *Annals of Botany* **91**, 173–178.
- Egea I, Barsan C, Bian W, Purgatto E, Latché A, Chervin C, Bouzayen M, Pech J-CC.** 2010. Chromoplast differentiation: Current status and perspectives. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1601–1611.
- Egea I, Bian W, Barsan C, Jauneau A, Pech JC, Latché A, Li Z, Chervin C.** 2011. Chloroplast to chromoplast transition in tomato fruit: Spectral confocal microscopy analyses of carotenoids and chlorophylls in isolated plastids and time-lapse recording on intact live tissue. *Annals of Botany* **108**, 291–297.
- Eum HL, Kim HB, Choi SB, Lee SK.** 2009. Regulation of ethylene biosynthesis by nitric oxide in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit harvested at different ripening stages. *European Food Research and Technology* **228**, 331–338.
- Fang K, Ragsdale NV, Carey RM, Macdonald T, Gaston B.** 1998. Reductive Assays for S - Nitrosothiols : Implications for Measurements in Biological Systems. **540**, 535–540.
- Foo E, Ross JJ, Davies NW, Reid JB, Weller JL.** 2006. A role for ethylene in the phytochrome-mediated control of vegetative development. *Plant Journal* **46**, 911–921.
- Förstermann U, Sessa WC.** 2012. Nitric oxide synthases: Regulation and function. *European Heart Journal* **33**, 829–837.
- Foyer CH, Shigeoka S.** 2011. Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. *Plant physiology* **155**, 93–100.
- Freschi L.** 2013. Nitric oxide and phytohormone interactions: current status and perspectives. *Frontiers in plant science* **4**, 398.
- Fröhlich A, Durner J.** 2011. The hunt for plant nitric oxide synthase (NOS): Is one really needed? *Plant Science* **181**, 401–404.
- Galatro A, Puntarulo S, Guamet JJ, Simontacchi M.** 2013. Chloroplast functionality has a positive effect on nitric oxide level in soybean cotyledons. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **66**, 26–33.
- Garay-Arroyo A, De La Paz Sánchez M, García-Ponce B, Azpeitia E, Álvarez-Buylla ER.** 2012. Hormone symphony during root growth and development. *Developmental Dynamics* **241**, 1867–1885.
- García-Mata C, Lamattina L.** 2003. Abscisic acid, nitric oxide and stomatal closure - Is nitrate reductase one of the missing links? *Trends in Plant Science* **8**, 20–26.
- George Jones M.** 1987. Gibberellins and the *procera* mutant of tomato. *Planta* **172**, 280–4.
- Georghiou K, Kendrick RE.** 1991. The germination characteristics of phytochrome-deficient *aurea* mutant tomato seeds. *Physiologia Plantarum* **82**, 127–133.
- Van Gestelen P, Ledeganck P, Wynant I, Caubergs RJ, Asard H.** 1998. The cantharidin-induced oxidative burst in tobacco BY-2 cell suspension cultures. *Protoplasma* **205**, 83–92.
- Giba Z, Grubiši D, Todorovi S, Sajc L, Stojakovi D, Konjevi R.** 1998. Effect of nitric oxide – releasing compounds on phytochrome – controlled germination of Empress tree seeds. , 175–181.
- Gill SS, Anjum N a, Hasanuzzaman M, Gill R, Trivedi DK, Ahmad I, Pereira E, Tuteja N.** 2013. Glutathione and glutathione reductase: a boon in disguise for plant abiotic stress defense operations. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **70**, 204–12.

- Goud K V., Sharma R.** 1994. Retention of Photoinduction of Cytosolic Enzymes in *aurea* Mutant of Tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant physiology* **105**, 643–650.
- Gray JE, Picton S, Giovannoni JJ, Grierson D.** 1994. The use of transgenic and naturally occurring mutants to understand and manipulate tomato fruit ripening. *Plant Cell and Environment* **17**, 557–571.
- Graziano M, Lamattina L.** 2007. Nitric oxide accumulation is required for molecular and physiological responses to iron deficiency in tomato roots. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **52**, 949–60.
- Gupta KJ, Fernie AR, Kaiser WM, van Dongen JT.** 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends in plant science* **16**, 160–8.
- Gupta KJ, Igamberdiev AU.** 2011. The anoxic plant mitochondrion as a nitrite: NO reductase. *Mitochondrion* **11**, 537–43.
- Gupta SK, Sharma S, Santisree P, Kilambi HV, Appenroth K, Sreelakshmi Y, Sharma R.** 2014. Complex and shifting interactions of phytochromes regulate fruit development in tomato. *Plant, cell & environment* **37**, 1688–702.
- Guzmán P, R.Ecker J.** 1990. Exploiting the Triple Response of Arabidopsis to Identify Ethylene-Related Mutants. **2**, 513–523.
- Halliwell B.** 1987. Oxidative damage, lipid peroxidation and antioxidant protection in chloroplasts. *Chemistry and Physics of lipids* **44**, 327–340.
- Hancock JT, Neill SJ, Wilson ID.** 2011. Nitric oxide and ABA in the control of plant function. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **181**, 555–9.
- Hebelstrup KH, Jensen EØ.** 2008. Expression of NO scavenging hemoglobin is involved in the timing of bolting in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **227**, 917–927.
- Hirata K, Yokoyama M.** 1996. Nitric oxide and atherosclerosis. *Respiration and Circulation* **44**, 127–132.
- Huber JL, Huber SC, Campbell WH, Redinbaugh MG.** 1992. Reversible light/dark modulation of spinach leaf nitrate reductase activity involves protein phosphorylation. *Archives of biochemistry and biophysics* **296**, 58–65.
- Hung KT, Kao CH.** 2004. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Journal of plant physiology* **161**, 43–52.
- Igamberdiev AU, Bykova N V., Hill RD.** 2006. Nitric oxide scavenging by barley hemoglobin is facilitated by a monodehydroascorbate reductase-mediated ascorbate reduction of methemoglobin. *Planta* **223**, 1033–1040.
- Igamberdiev AU, Hill RD.** 2004. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: An alternative to classic fermentation pathways. *Journal of Experimental Botany* **55**, 2473–2482.
- Innocenti G, Pucciariello C, Le Gleuher M, Hopkins J, de Stefano M, Delledonne M, Puppo A, Baudouin E, Frendo P.** 2007. Glutathione synthesis is regulated by nitric oxide in *Medicago truncatula* roots. *Planta* **225**, 1597–602.
- Jaffrey SR, Snyder SH.** 1995. NITRIC OXIDE : A Neural Messenger. *Annual review of cell and developmental biology* **11**, 417–40.

- Jasid S, Simontacchi M, Bartoli CG, Puntarulo S.** 2006. Chloroplasts as a nitric oxide cellular source. Effect of reactive nitrogen species on chloroplastic lipids and proteins. *Plant physiology* **142**, 1246–1255.
- Jaworski EG.** 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **43**, 1274–1279.
- Kaiser WM, Weiner H, Kandlbinder A, Tsai C-B, Rockel P, Sonoda M, Planchet E.** 2002. Modulation of nitrate reductase: some new insights, an unusual case and a potentially important side reaction. *Journal of experimental botany* **53**, 875–882.
- Kendrick RE.** 1996. The *aurea* and *yellow-green-2* Mutants of Tomato Are Deficient in Phytochrome Chromophore Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 21681–21686.
- Kendrick RE, Kerckhoffs LHJ, Van Tuinen A, Koornneef M.** 1997. Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant, Cell and Environment* **20**, 746–751.
- Klee HJ, Giovannoni JJ.** 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual review of genetics* **45**, 41–59.
- Klessig DF, Durner J, Noad R, et al.** 2000. Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 8849–55.
- Kolbert Z, Bartha B, Erdei L.** 2008. Exogenous auxin-induced NO synthesis is nitrate reductase-associated in *Arabidopsis thaliana* root primordia. *Journal of plant physiology* **165**, 967–75.
- Kopyra M, Gwózdź E a.** 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 1011–1017.
- Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V.** 1997. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **1**, 107–20.
- Kubienová L, Tichá T, Jahnová J, Luhová L, Mieslerová B, Petřivalský M.** 2014. Effect of abiotic stress stimuli on S-nitrosoglutathione reductase in plants. *Planta* **239**, 139–46.
- Kumar R, Khurana A, Sharma AK.** 2014. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of experimental botany* **65**, 4561–75.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G.** 2003. Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual review of plant biology* **54**, 109–136.
- Lanahan MB, Yen HC, Giovannoni JJ, Klee HJ.** 1994. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *The Plant cell* **6**, 521–530.
- Lanteri ML, Pagnussat GC, Lamattina L.** 2006. Calcium and calcium-dependent protein kinases are involved in nitric oxide- and auxin-induced adventitious root formation in cucumber. *Journal of Experimental Botany* **57**, 1341–1351.
- Laurenzi M, Rea G, Federico R, Tavladoraki P, Angelini R.** 1999. De-etiolation causes a phytochrome-mediated increase of polyamine oxidase expression in outer tissues of the maize mesocotyl: A role in the photomodulation of growth and cell wall differentiation. *Planta* **208**, 146–154.
- Lee U, Wie C, Fernandez BO, Feelisch M, Vierling E.** 2008. Modulation of nitrosative stress by S-nitrosoglutathione reductase is critical for thermotolerance and plant growth in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **20**, 786–802.

Lefter DJ. 2007. A new gaseous signaling molecule emerges: cardioprotective role of hydrogen sulfide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 17907–17908.

Lelievre JM, Lelievre JM, Latche a, Latche a, Jones B, Jones B, Bouzayen M, Bouzayen M, Pech JC, Pech JC. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiologia Plantarum* **101**, 727–739.

Lenucci MS, Cadinu D, Taurino M, Piro G, Dalessandro G. 2006. Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**, 2606–2613.

Leshem YY, Haramaty E. 1996. The Characterization and Contrasting Effects of the Nitric Oxide Free Radical in Vegetative Stress and Senescence of *Pisum sativum* Linn. Foliage. *Journal of Plant Physiology* **148**, 258–263.

Leshem YY, Pinchasov Y. 2000. Non-invasive photoacoustic spectroscopic determination of relative endogenous nitric oxide and ethylene content stoichiometry during the ripening of strawberries *Fragaria ananassa* (Duch.) and avocados *Persea americana* (Mill.). *Journal of experimental botany* **51**, 1471–1473.

Leshem YY, Wills RBH. 1998. Harnessing senescence delaying gases nitric oxide and nitrous oxide: a novel approach to postharvest control of fresh horticultural produce. *Biologia Plantarum* **41**, 1–10.

Leshem YY, Wills RBH, Ku VVV. 1998. Evidence for the function of the free radical gas - nitric oxide (NO·)- as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 825–833.

Leterrier M, Chaki M, Airaki M, Valderrama R, Palma JM, Barroso JB, Corpas FJ. 2014. Function of S-nitrosogluthione reductase (GSNOR) in plant development and under biotic/abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 789–793.

Li X, Wu B, Guo Q, Wang J, Zhang P, Chen W. 2014. Effects of Nitric Oxide on Postharvest Quality and Soluble Sugar Content in Papaya Fruit during Ripening. *Journal of Food Processing and Preservation* **38**, 591–599.

Libourel IGL, Bethke PC, De Michele R, Jones RL. 2006. Nitric oxide gas stimulates germination of dormant Arabidopsis seeds: use of a flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* **223**, 813–20.

Lillo C. 1991. Diurnal variations of corn leaf nitrate reductase: an experimental distinction between transcriptional and post-transcriptional control. *Plant Science* **73**, 149–154.

Lillo C. 1994. Light regulation of nitrate reductase in green leaves of higher plants. *Physiologia Plantarum* **90**, 616–620.

Lillo C, Appenroth K. 2001. Light Regulation of Nitrate Reductase in Higher Plants : Which Photoreceptors are Involved ? *Plant Biology* **3**, 455–465.

Lindermayr C, Saalbach G, Bahnweg G, Durner J. 2006. Differential inhibition of Arabidopsis methionine adenosyltransferases by protein S-nitrosylation. *The Journal of biological chemistry* **281**, 4285–91.

Liu L, Hausladen a, Zeng M, Que L, Heitman J, Stamler JS. 2001. A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* **410**, 490–4.

Liu Y, Li X, Xu L, Shen W. 2013. De-etiolation of wheat seedling leaves: cross talk between heme oxygenase/carbon monoxide and nitric oxide. *PloS one* **8**, e81470.

- Lloyd-Jones DM, Bloch KD.** 1996. The vascular biology of nitric oxide and its role in atherogenesis. *Annual review of medicine* **47**, 365–375.
- Lombardi-Crestana S, da Silva Azevedo M, e Silva GFF, Pino LE, Appezzato-da-Glória B, Figueira A, Nogueira FTS, Peres LEP.** 2012. The tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) natural genetic variation *Rgl* and the DELLA mutant *procera* control the competence necessary to form adventitious roots and shoots. *Journal of experimental botany* **63**, 5689–703.
- Lozano-Juste J, León J.** 2011. Nitric oxide regulates DELLA content and PIF expression to promote photomorphogenesis in Arabidopsis. *Plant physiology* **156**, 1410–1423.
- Ludwig J, Meixner FX, Vogel B, Forstner J.** 2001. Soil-air exchange of nitric oxide: An overview of processes, environmental factors, and modeling studies. *Biogeochemistry* **52**, 225–257.
- Lundberg JO, Weitzberg E, Gladwin MT.** 2008. The nitrate – nitrite – nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Critical Care Medicine* **7**, 156–167.
- Ma Q, Ding Y, Chang J, Sun X, Zhang L, Wei Q, Cheng Y, Chen L, Xu J, Deng X.** 2014. Comprehensive insights on how 2,4-dichlorophenoxyacetic acid retards senescence in post-harvest citrus fruits using transcriptomic and proteomic approaches. *Journal of experimental botany* **65**, 61–74.
- Malik SI, Hussain A, Yun B, Spoel SH, Loake GJ.** 2011. Plant Science GSNOR -mediated denitrosylation in the plant defence response. *Plant Science* **181**, 540–544.
- Manjunatha G, Gupta KJ, Lokesh V, Mur L a J, Neelwarne B.** 2012. Nitric oxide counters ethylene effects on ripening fruits. *Plant signaling & behavior* **7**, 476–83.
- Manjunatha G, Lokesh V, Neelwarne B.** 2010. Nitric oxide in fruit ripening: trends and opportunities. *Biotechnology advances* **28**, 489–99.
- McCleverty J a.** 2004. Chemistry of nitric oxide relevant to biology. *Chemical reviews* **104**, 403–18.
- Meissner R, Jacobson Y, Melamed S, Levyatuv S, Shalev G, Ashri A, Elkind Y, Levy A.** 1997. A new model system for tomato genetics. , 1465–1472.
- Meister A.** 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of biological chemistry* **263**, 17205–8.
- Meister A, Anderson ME.** 1983. Glutathione. *Annual review of biochemistry* **52**, 711–60.
- Melis MR, Argiolas a.** 1997. Role of central nitric oxide in the control of penile erection and yawning. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **21**, 899–922.
- Melo NK gonsalves de, Oliveira.** Cross talk between nitric oxide, ethylene and auxins during light-mediated greening and plastid development in de-etiolating tomato seedlings .São Paulo: USP, 109p Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- Meyer AJ, Hell R.** 2005. Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynthesis research* **86**, 435–57.
- Meyer C, Lea US, Provan F, Kaiser WM, Lillo C.** 2005. Is nitrate reductase a major player in the plant NO (nitric oxide) game? *Photosynthesis research* **83**, 181–9.
- Misra AN, Vladkova R, Singh R, Misra M, Dobrikova AG, Apostolova EL.** 2014. Action and target sites of nitric oxide in chloroplasts. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **39**, 35–45.

Mondal K, Sharma NS, Malhotra SP, Dhawan K, Singh R. 2004. Antioxidant Systems in Ripening Tomato Fruits. *Biologia Plantarum* **48**, 49–53.

Mur L a J, Mandon J, Persijn S, Cristescu SM, Moshkov IE, Novikova G V, Hall M a, Harren FJM, Hebelstrup KH, Gupta KJ. 2013. Nitric oxide in plants: an assessment of the current state of knowledge. *AoB plants* **5**, pls052.

Muramoto T, Kami C, Kataoka H, Iwata N, Linley PJ, Mukougawa K, Yokota A, Kohchi T. 2005. The tomato photomorphogenetic mutant, *aurea*, is deficient in phytochromobilin synthase for phytochrome chromophore biosynthesis. *Plant & cell physiology* **46**, 661–5.

Mustilli AC, Fenzi F, Ciliento R, Alfano F, Bowler C. 1999. Phenotype of the tomato *high pigment-2* mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of DEETIOLATED1. *The Plant cell* **11**, 145–157.

Neill S, Bright J, Desikan R, Hancock J, Harrison J, Wilson I. 2008. Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany*.25–35.

Neill SJ, Desikan R, Hancock JT. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytologist* **159**, 11–35.

Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. 1992. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3030–3034.

Norby RJ. 2009. Introduction to a Virtual Special Issue: Probing the carbon cycle with ¹³C. *New Phytologist* **184**, 1–3.

O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth a, Darley-Usmar VM, Freeman B a. 1997. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* **36**, 15216–15223.

Ohwaki Y, Kawagishi-Kobayashi M, Wakasa K, Fujihara S, Yoneyama T. 2005. Induction of class-1 non-symbiotic hemoglobin genes by nitrate, nitrite and nitric oxide in cultured rice cells. *Plant and Cell Physiology* **46**, 324–331.

Okamoto OK, Pinto E, Latorre LR, Bechara EJH, Colepicolo P. 2001. Antioxidant modulation in response to metal-induced oxidative stress in algal chloroplasts. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **40**, 18–24.

Ördög A, Wodala B, Rózsavölgyi T, Tari I, Horváth F. 2013. Regulation of guard cell photosynthetic electron transport by nitric oxide. *Journal of experimental botany* **64**, 1357–66.

Ott T, van Dongen JT, Günther C, Krusell L, Desbrosses G, Vigeolas H, Bock V, Czechowski T, Geigenberger P, Udvardi MK. 2005. Symbiotic leghemoglobins are crucial for nitrogen fixation in legume root nodules but not for general plant growth and development. *Current biology : CB* **15**, 531–5.

Palmer RM, Ferrige a G, Moncada S. 1987. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–6.

Parks BM, Jones AM, Adamse P, Koornneef M, Kendrick RE, Quail PH. 1987. The *aurea* mutant of tomato is deficient in spectrophotometrically and immunochemically detectable phytochrome. *Plant Molecular Biology* **9**, 97–107.

- Perazzolli M, Dominici P, Romero-Puertas MC, Zago E, Zeier J, Sonoda M, Lamb C, Delledonne M.** 2004. Arabidopsis nonsymbiotic hemoglobin AHb1 modulates nitric oxide bioactivity. *The Plant cell* **16**, 2785–2794.
- Perazzolli M, Romero-Puertas MC, Delledonne M.** 2006. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *Journal of Experimental Botany* **57**, 479–488.
- Peters JL, Schreuder MEL, Verduin SJW, Kendrick RE.** 1992. Physiological Characterization of a High-Pigment Mutant of Tomato. *Photochemistry and Photobiology* **56**, 75–82.
- Pino-Nunes, Lilian Ellen** Obtenção e uso de mutantes com alterações no balanço auxina/citocinina no estudo da competência organogênica em micro-tomateiro (*Lycopersicon esculentum* cv Micro-Tom) Piracicaba : ESALQ, 2005. 73p Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba , São Paulo 2005.
- Planchet E, Kaiser WM.** 2006. Nitric oxide production in plants: facts and fictions. *Plant signaling & behavior* **1**, 46–51.
- Procházková D, Wilhelmová N.** 2011. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* **24**, 61–5.
- Qiao W, Fan L-M.** 2008. Nitric oxide signaling in plant responses to abiotic stresses. *Journal of integrative plant biology* **50**, 1238–46.
- Radomski MWW, Palmer RMJM, Moncada S.** 1987. Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *British journal of pharmacology* **92**, 181–187.
- Radomski MW, Palmer RM, Moncada S.** 1990. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 5193–5197.
- Rajasekhar VK, Gowri G, Campbell WH.** 1988. Phytochrome-Mediated Light Regulation of Nitrate Reductase Expression in Squash Cotyledons1. *Plant physiology* **88**, 242–244.
- Reis AR, Favarin JL, Gallo LA, Malavolta E, Moraes MF, Lavres Junior J.** 2009. Seção Iii - Biologia Do Solo Nitrate Reductase and Glutamine Synthetase Activity in Coffee Leaves During Fruit. , 315–324.
- Renato M, Pateraki I, Boronat A, Azcón-Bieto J.** 2014. Tomato fruit chromoplasts behave as respiratory bioenergetic organelles during ripening. *Plant physiology* **166**, 920–33.
- Del Río L a, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB.** 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant physiology* **141**, 330–5.
- Rockel P, Strube F, Rockel A, Wildt J, Kaiser WM.** 2002. Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *Journal of experimental botany* **53**, 103–10.
- Rogers SC, Gibbons LB, Griffin S, Doctor A.** 2013. Analysis of S-nitrosothiols via copper cysteine (2C) and copper cysteine - Carbon monoxide (3C) methods. *Methods* **62**, 123–129.
- Romero-Puertas MC, Perazzolli M, Zago ED, Delledonne M.** 2004. Nitric oxide signalling functions in plant-pathogen interactions. *Cellular microbiology* **6**, 795–803.

- Saed-Moucheshi A, Shekoofa A, Pessaraki M.** 2014. Reactive Oxygen Species (ROS) Generation and Detoxifying in Plants. *Journal of Plant Nutrition* **37**, 1573–1585.
- Sakamoto A, Ueda M, Morikawa H.** 2002. Arabidopsis glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase is an S-nitrosoglutathione reductase. *FEBS letters* **515**, 20–4.
- Salgado I, Carmen Martínez M, Oliveira HC, Frungillo L.** 2013. Nitric oxide signaling and homeostasis in plants: a focus on nitrate reductase and S-nitrosoglutathione reductase in stress-related responses. *Brazilian Journal of Botany* **36**, 89–98.
- Saroop S, Thaker VS, Chanda S V., Singh YD.** 1998. Light and nitrate induction of nitrate reductase in kinetin-and gibberellic acid-treated mustard cotyledons. *Acta Physiologiae Plantarum* **20**, 359–362.
- Sato S, Tabata S, Hirakawa H, et al.** 2012. The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* **485**, 635–641.
- Seligman K, Saviani EE, Oliveira HC, 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 physiology* **49**, 1112–21.
- Shi J, Le Maguer M.** 2000. Lycopene in tomatoes: chemical and physical properties affected by food processing. *Critical reviews in biotechnology* **20**, 293–334.
- Singh SP, Singh Z, Swinny EE.** 2009. Postharvest nitric oxide fumigation delays fruit ripening and alleviates chilling injury during cold storage of Japanese plums (*Prunus salicina* Lindell). *Postharvest Biology and Technology* **53**, 101–108.
- Soegiarto L, Wills RBH, Seberry J a., Leshem YY.** 2003. Nitric oxide degradation in oxygen atmospheres and rate of uptake by horticultural produce. *Postharvest Biology and Technology* **28**, 327–331.
- Soheila AY, John CF, Jordan B, Thomas B.** 2001. Early signaling components in ultraviolet-B responses : distinct roles for different reactive oxygen species and nitric oxide. **489**, 237–242.
- Song X-G, She X-P, Zhang B.** 2008. Carbon monoxide-induced stomatal closure in *Vicia faba* is dependent on nitric oxide synthesis. *Physiologia plantarum* **132**, 514–25.
- Stamler JS.** 1994. Redox signaling: Nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* **78**, 931–936.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J.** 1992. u ARTICLE Biochemistry Nitric Oxide and Redox-Activated Forms. *Science* **258**, 1896-1902.
- Stöhr C, Stremlau S.** 2006. Formation and possible roles of nitric oxide in plant roots. *Journal of Experimental Botany* **57**, 463–470.
- Suty L, Moureaux T, Leydecker M-T, de la Serve BT.** 1993. Cytokinin affects nitrate reductase expression through the modulation of polyadenylation of the nitrate reductase mRNA transcript. *Plant Science* **90**, 11–19.
- Szalai G, Kellős T, Galiba G, Kocsy G.** 2009. Glutathione as an Antioxidant and Regulatory Molecule in Plants Under Abiotic Stress Conditions. *Journal of Plant Growth Regulation* **28**, 66–80.
- Tatsuki M.** 2010. Ethylene Biosynthesis and Perception in Fruit. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **79**, 315–326.

- Teitel DC, Arad S (Malis., Birnbaum E, Mizrahi Y.** 1986. Nitrate reductase activity in tomato fruits grown in vivo and in vitro. *Plant growth regulation* **4**, 357–362.
- Tewari RK, Prommer J, Watanabe M.** 2013. Endogenous nitric oxide generation in protoplast chloroplasts. *Plant cell reports* **32**, 31–44.
- Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, Bobrow LG, Knowles RG, Moncada S.** 1995. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *British journal of cancer* **72**, 41–44.
- Tian X, Lei Y.** 2006. Nitric oxide treatment alleviates drought stress in wheat seedlings. *Biologia Plantarum* **50**, 775–778.
- Tischner R, Planchet E, Kaiser WM.** 2004. Mitochondrial electron transport as a source for nitric oxide in the unicellular green alga *Chlorella sorokiniana*. *FEBS letters* **576**, 151–5.
- Torres C a, Andrews PK.** 2006. Developmental changes in antioxidant metabolites, enzymes, and pigments in fruit exocarp of four tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) genotypes: *beta-carotene*, *high pigment-1*, *ripening inhibitor*, and “Rutgers”. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Société française de physiologie végétale* **44**, 806–18.
- Trainotti L, Tadiello A, Casadoro G.** 2007. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches. *Journal of experimental botany* **58**, 3299–308.
- Tucker DE, Allen DJ, Ort DR.** 2004. Control of nitrate reductase by circadian and diurnal rhythms in tomato. *Planta* **219**, 277–285.
- Tucker DE, Ort DR.** 2002. Low temperature induces expression of nitrate reductase in tomato that temporarily overrides circadian regulation of activity. *Photosynthesis Research* **72**, 285–293.
- Vandelle E, Delledonne M.** 2011. Peroxynitrite formation and function in plants. *Plant science : an international journal of experimental plant biology* **181**, 534–9.
- Velikova V, Fares S, Loreto F.** 2008. Isoprene and nitric oxide reduce damages in leaves exposed to oxidative stress. *Plant, Cell and Environment* **31**, 1882–1894.
- Wang Y, Feng H, Qu Y, Cheng J, Zhao Z, Zhang M, Wang X, An L.** 2006. The relationship between reactive oxygen species and nitric oxide in ultraviolet-B-induced ethylene production in leaves of maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany* **57**, 51–61.
- Wang X, Jin H, Tang C, Du J.** 2011. The biological effect of endogenous sulfur dioxide in the cardiovascular system. *European Journal of Pharmacology* **670**, 1–6.
- Wang Z, Ying T, Bao B, Huang X.** 2005. Characteristics of fruit ripening in tomato mutant *epi*. *Journal of Zhejiang University. Science. B* **6**, 502–507.
- Watts R a, Hunt PW, Hvitved a N, Hargrove MS, Peacock WJ, Dennis ES.** 2001. A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10119–24.
- Wei XQ, Charles IG, Smith a, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY.** 1995. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**, 408–11.
- Weinberger B, Laskin DL, Heck DE, Laskin JD.** 2001. The toxicology of inhaled nitric oxide. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* **59**, 5–16.

- Wendehenne D, Pugin A, Klessig DF, Durner J.** 2001. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 177–183.
- Wills RBH, Ku VV V, Leshem YY.** 2000. Fumigation with nitric oxide to extend the postharvest life of strawberries. *Postharvest Biology and Technology* **18**, 75–79.
- Wrzaczek M, Overmyer K, Kangasjärvi J.** 2010. Plant ROS and RNS: making plant science more radical than ever. *Physiologia plantarum* **138**, 357–9.
- Xiang C, Werner B, E'Lise M, Oliver D.** 2001. The biological functions of glutathione revisited in *Arabidopsis* transgenic plants with altered glutathione levels. *Plant Physiology* **126**, 564–574.
- Xiao-ping SHE, Xi-gui S, Jun-min HE.** 2004. Role and Relationship of Nitric Oxide and Hydrogen Peroxide in Light / Dark-regulated Stomatal Movement in *Vicia faba*. **46**.
- Xu S, Guerra D, Lee U, Vierling E.** 2013. S-nitrosogluthathione reductases are low-copy number , cysteine-rich proteins in plants that control multiple developmental and defense responses in *Arabidopsis*. **4**, 1–13.
- Yamamoto-Katou A, Katou S, Yoshioka H, Doke N, Kawakita K.** 2006. Nitrate reductase is responsible for elicitor-induced nitric oxide production in *Nicotiana benthamiana*. *Plant & cell physiology* **47**, 726–35.
- Yamasaki H, Cohen MF.** 2006. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends in plant science* **11**, 522–4.
- Yamasaki H, Sakihama Y.** 2000. Simultaneous production of nitric oxide and peroxyxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *FEBS Letters* **468**, 89–92.
- Yaneva I a, Hoffmann GW, Tischner R.** 2002. Nitrate reductase from winter wheat leaves is activated at low temperature via protein dephosphorylation. *Physiologia Plantarum* **114**, 65–72.
- Yang Z, Midmore DJ.** 2005. A model for the circadian oscillations in expression and activity of nitrate reductase in higher plants. *Annals of Botany* **96**, 1019–1026.
- Yen HC, Shelton B a., Howard LR, Lee S, Vrebalov J, Giovannoni JJ.** 1997. The tomato high-pigment (*hp*) locus maps to chromosome 2 and influences plastome copy number and fruit quality. *Theoretical and Applied Genetics* **95**, 1069–1079.
- Yu M, Lamattina L, Spoel SH, Loake GJ.** 2014. Nitric oxide function in plant biology: a redox cue in deconvolution. *The New phytologist* **202**, 1142–56.
- Zaharah SS, Singh Z.** 2011*a*. Postharvest nitric oxide fumigation alleviates chilling injury, delays fruit ripening and maintains quality in cold-stored “Kensington Pride” mango. *Postharvest Biology and Technology* **60**, 202–210.
- Zaharah SS, Singh Z.** 2011*b*. Mode of action of nitric oxide in inhibiting ethylene biosynthesis and fruit softening during ripening and cool storage of “Kensington Pride” mango. *Postharvest Biology and Technology* **62**, 258–266.
- Zaharah SS, Singh Z, Symons GM, Reid JB.** 2011. Role of Brassinosteroids, Ethylene, Abscisic Acid, and Indole-3-Acetic Acid in Mango Fruit Ripening. *Journal of Plant Growth Regulation* **31**, 363–372.
- Zamir D, Tanksley SD.** 1988. Tomato genome is comprised largely of fast-evolving, low copy-number sequences. *MGG Molecular & General Genetics* **213**, 254–261.

Zechmann B. 2014. Compartment-specific importance of glutathione during abiotic and biotic stress. *Frontiers in plant science* **5**, 566.

Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W. 2006a. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* **224**, 545–55.

Zhang F, Wang Y, Yang Y, Wu H, Wang D, Liu J. 2007. Involvement of hydrogen peroxide and nitric oxide in salt resistance in the calluses from *Populus euphratica*. *Plant, cell & environment* **30**, 775–85.

Zhang L, Wang Y, Zhao L, Shi S, Zhang L. 2006b. Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *Journal of Plant Physiology* **163**, 818–826.

Zhao M-G, Tian Q-Y, Zhang W-H. 2007. Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **144**, 206–17.

Zhu S, Liu M, Zhou J. 2006. Inhibition by nitric oxide of ethylene biosynthesis and lipoxygenase activity in peach fruit during storage. *Postharvest Biology and Technology* **42**, 41–48.

Zhu S, Zhou J. 2007. Effect of nitric oxide on ethylene production in strawberry fruit during storage. *Food Chemistry* **100**, 1517–1522.

Zoubovsky SP, Pogorelov VM, Taniguchi Y, Kim S-H, Yoon P, Nwulia E, Sawa A, Pletnikov M V, Kamiya A. 2011. Working memory deficits in neuronal nitric oxide synthase knockout mice: potential impairments in prefrontal cortex mediated cognitive function. *Biochemical and biophysical research communications* **408**, 707–12.

Zuccarelli, Rafael Freschi, Luciano Influência da luz sobre a produção de óxido nítrico no mutante fotomorfogênico *yellow green 2 (yg2)* de tomateiro. USP : Iniciação Científica 23p - Departamento de botânica, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.