

UNIDADE XVI – Giberelinas: Reguladores da altura das plantas e da germinação de sementes

1. Introdução
2. Descoberta
3. Efeitos das giberelinas no crescimento e no desenvolvimento
4. Aplicações comerciais
5. Biossíntese e desativação de giberelinas
6. Sinalização da giberelina: significado da resposta dos mutantes
7. Resposta à giberelina: alvos precoces de proteínas DELLA, a camada de aleurona de cereais, desenvolvimento da antera e fertilidade masculina e crescimento do caule.

Introdução

Por quase 30 anos, após a descoberta da auxina, em 1927, os fisiologistas tentaram atribuir à auxina a regulação de todos os fenômenos do desenvolvimento vegetal. Entretanto, o crescimento e desenvolvimento dos vegetais são processos regulados por vários hormônios, que atuam individualmente ou em conjunto.

O segundo grupo de hormônios a ser caracterizado foi o das giberelinas (GAs). Pelo menos 136 GAs de ocorrência natural foram identificadas.

Diferentemente das auxinas, que são definidas pelas suas propriedades biológicas, as GAs compartilham uma estrutura química semelhante, mas poucas apresentam atividade biológica intrínseca.

Apenas poucas GAs ativas estão presentes em uma dada planta e seus níveis estão geralmente relacionados com o comprimento do caule.

As GAs também desempenham papel importante em vários outros fenômenos fisiológicos, tais como:

- na germinação de sementes,
- na transição para o florescimento e,
- no desenvolvimento do pólen.

A biossíntese das giberelinas está sob um estrito controle genético, ambiental e de desenvolvimento.

Giberelinas: descoberta e estrutura química

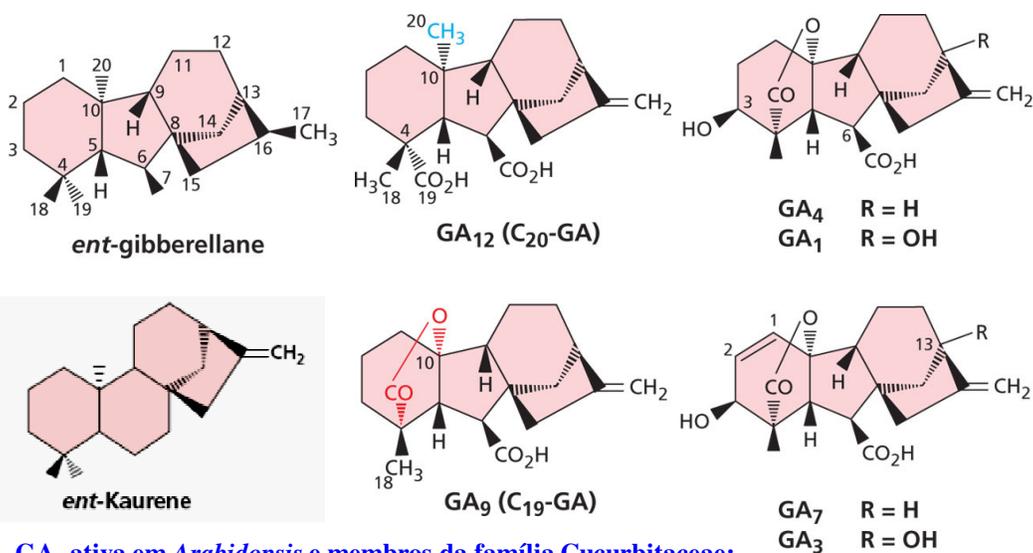
As giberelinas foram descobertas estudando uma doença no arroz (*Oryza sativa*).

- Os orizicultores japoneses conheciam uma **doença fúngica** (chamada de *bakanae* ou *doença da “planta-boba”*) que causava um crescimento excepcional das plantas, mas que suprimia a produção de sementes.
- Os fitopatologistas descobriram que esses sintomas no arroz eram causados por fungo patogênico, *Gibberella fujikuroi*, que infectava o vegetal;
- Na década de 1930, cultivando esse fungo em laboratório e analisando os filtrados das culturas, os cientistas japoneses conseguiram obter cristais impuros com atividade promotora de crescimento vegetal. **Eles chamaram de giberelina A essa mistura de compostos.**

O ácido giberélico foi purificado inicialmente de culturas de *Giberella*

- Na década de 1950, dois grupos – um na Inglaterra e outro nos EUA - elucidaram a estrutura química de um composto que foi purificado de filtrados de culturas de *Giberella*, ao qual denominaram ácido giberélico (GA₃);
- Quase ao mesmo tempo, cientistas japoneses, separaram e caracterizaram três giberelinas diferentes a partir da amostra original e as denominaram de GA₁, GA₂ e GA₃ (ácido giberélico);
- A primeira identificação de uma GA em extrato vegetal ocorreu em 1958, quando GA₁ foi descoberta em sementes imaturas do feijão escarlate (*Phaseolus coccineus*).

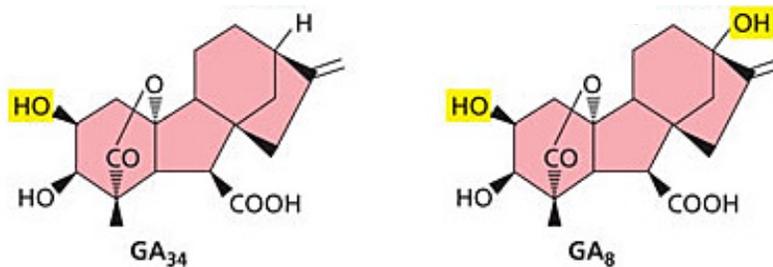
Todas as giberelinas são baseadas em um esqueleto ent-giberelano



GA₄ ativa em *Arabidopsis* e membros da família Cucurbitaceae;

GA₃ principal componente em fungos.

- As giberelinas (GAs) são amplamente distribuídas no reino vegetal.
- Elas estão presentes em toda a planta, podendo ser detectadas em folhas, caules, sementes, embriões e grãos de pólen.
- As giberelinas constituem uma grande família de ácidos diterpênicos tetracíclicos e são sintetizadas por um ramo da via dos terpenoides.
- A presença de um grupo 2 β -OH evita o fechamento da superfície hidrofóbica do receptor de GA e, desse modo, torna inativa uma GA.



Efeitos das giberelinas no crescimento e no desenvolvimento

Embora tenham sido originalmente identificadas como a causa de uma doença que estimulava o alongamento dos entrenós de plantas de arroz, as GAs endógenas influenciam uma grande variedade de processos do desenvolvimento, além do alongamento do caule.

Muitas dessas propriedades têm sido exploradas por décadas na agricultura; A manipulação do conteúdo de GA de plantas cultivadas afeta o tamanho da parte aérea, bem como o estabelecimento e o crescimento de frutos.

As giberelinas podem promover o alongamento intenso dos entrenós em mutantes geneticamente anões.

Associado a este efeito há também:

- Diminuição na espessura do caule;
- Diminuição no tamanho da folha;
- As folhas ficam com uma coloração verde clara.

FIGURA 20.1 O efeito da GA_1 exógena sobre o milho do tipo selvagem (identificado como "normal" na fotografia) e mutante anão (*d1*). A giberelina estimula o alongamento expressivo do caule no mutante anão, mas apresenta pouco ou nenhum efeito sobre a planta alta do tipo selvagem (cortesia de B. Phinney).



As giberelinas estimulam o crescimento do caule (*bolting*) em espécies em "roseta"

PDL

Espinafre

Repolho

Couve

Alface

FIGURA 20.2 O repolho, uma planta de dias longos, permanece com pequeno porte em forma de roseta sob condições de dias curtos, mas pode ser induzido ao *bolting* (com entrenós longos) e ao florescimento por aplicações de GA_3 . No caso ilustrado, foram produzidos escapos florais gigantes (© Sylvan Wittwer/Visuals Unlimited).



As giberelinas são também importantes para o crescimento da raiz

Mutantes anões extremos em ervilha e *Arabidopsis*, nos quais a síntese de GA foi bloqueada, apresentaram raízes mais curtas que as plantas selvagens, e a aplicação de GA na parte aérea promoveu tanto o alongamento da parte aérea quanto da raiz (Yaxley et al., 2001; Fu e Harberd, 2003).

As giberelinas promovem a germinação de sementes

A germinação de sementes pode exigir giberelinas para uma das possíveis etapas:

- Para a quebra de dormência de sementes que requerem luz ou frio para a indução da germinação;
- Para o enfraquecimento da camada do endosperma que envolve o embrião e restringe o seu crescimento;
- Para a produção de enzimas hidrolíticas (como amilases e proteases em cereais);
- Para a mobilização de reservas energéticas do endosperma;
- Para a ativação do crescimento vegetativo do embrião.

As giberelinas regulam a transição da fase juvenil para a fase adulta

Muitas plantas lenhosas perenes não florescem ou não produzem cones até atingirem certo estágio de maturidade; até esse estágio, elas são ditas juvenis.

As GAs aplicadas podem regular a mudança de fases, embora a aceleração ou o retardo da transição da fase juvenil para a adulta que o hormônio provoca dependa da espécie.

Em muitas coníferas, a fase juvenil, com até 20 anos de duração, pode ser encurtada pelo tratamento com GA_3 ou uma mistura de GA_4 e GA_7 , e plantas muito mais jovens podem ser induzidas a entrar precocemente na fase reprodutiva, de produção de cones.

(A) Espruce-branco



(B) Espruce-branco



(C) Plântula de sequoia gigante



FIGURA 20.3 As giberelinas induzem a formação gemas de cones em coníferas jovens. (A, B) As fotografias mostram cones megasporangiados desenvolvendo-se em indivíduos jovens enxertados de espruce-branco (*Picea glauca*). Os caules dessas plantas foram injetados com uma mistura de GA_4/GA_7 , em etanol

aquoso, no verão anterior. (C) Uma plântula de sequoia gigante (*Sequoiadendron giganteum*) de 14 semanas, aspergida com uma solução aquosa de GA_3 oito semanas antes, mostrando o desenvolvimento de um cone de megasporófilos (cortesia de S. D. Ross e R. P. Pharis).

As giberelinas influenciam a iniciação floral e a determinação do sexo

As GAs podem substituir a exigência de dias longos para o florescimento em muitas espécies, especialmente em plantas em “roseta”.

Nas plantas com flores imperfeitas (unissexuais), em vez de perfeitas (bissexuais), a determinação do sexo é regulada geneticamente.

No entanto, tal característica é influenciada por fatores ambientais, como fotoperíodo e *status* nutricional, podendo esses efeitos ambientais ser mediados por GAs, variando com a espécie:

- Em algumas espécies, como milho, GAs suprimem a formação dos estames e promovem a formação do pistilo;
- Em dicotiledôneas, como pepino, cânhamo e espinafre, GAs promovem a formação de flores estaminadas.

As giberelinas promovem o desenvolvimento do pólen e o crescimento do tubo polínico

Mutantes anões, deficientes em giberelina (*Arabidopsis* e arroz), apresentam falhas nos processos de desenvolvimento da antera e da formação de pólen. Estes dois defeitos, que levam à esterilidade masculina, podem ser revertidos pela aplicação de GA bioativa.

Em outros mutantes em que a resposta à GA é bloqueada (em vez da biossíntese de GA), os defeitos no desenvolvimento da antera e do pólen não podem ser revertidos pelo tratamento com GA, de modo que esses mutantes são macho-estéreis (Aya et al., 2009).

Giberelinas promovem o estabelecimento do fruto e a partenocarpia

As aplicações de GAs podem causar o estabelecimento do fruto (o início do crescimento do fruto após a polinização) e o crescimento de alguns frutos (pera e maçã).

O estabelecimento de frutos induzido por GA pode ocorrer em ausência de polinização, resultando em fruto partenocárpico (fruto sem semente).

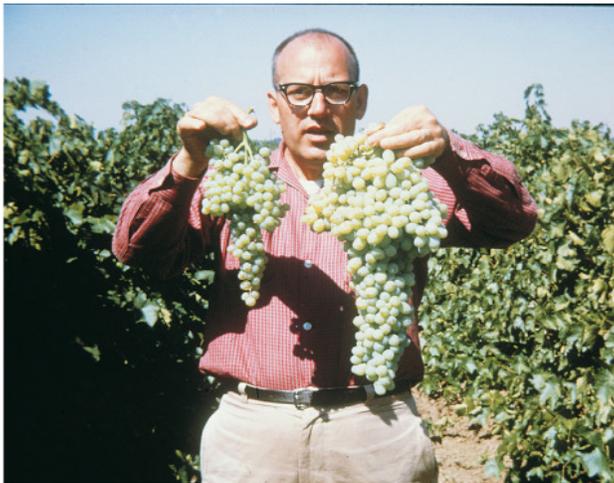


FIGURA 20.4 A giberelina induz o crescimento em uvas “Thompson sem sementes”. Cachos não tratados normalmente permanecem pequenos, devido ao aborto natural de sementes. O cacho da esquerda é não tratado. O cacho da direita foi aspergido com GA₃ durante o desenvolvimento dos frutos, provocando o aumento destes e o alongamento dos pedicelos (pedúnculos dos frutos) (© Sylvan Wittwer/Visuals Unlimited.)

A aplicação de GA em uvas da variedade “Thompson sem sementes” é explorado comercialmente.

Produz frutos maiores e promove o crescimento do pedicelo e, por consequência, reduz a infecção fúngica.

Aplicações comerciais das giberelinas e dos inibidores de sua biossíntese

❖ PRODUÇÃO DE FRUTOS

- UVA – Aumentar o comprimento da haste do cacho;
- MAÇA – Provocar o alongamento do fruto, melhorando sua forma;
- CITRUS – Provocar o retardamento da senescência.

❖ PRODUÇÃO DE CERVEJA E UÍSQE

- Durante a produção do malte, a partir de sementes de cevada, giberelinas são usadas para acelerar a degradação do amido.

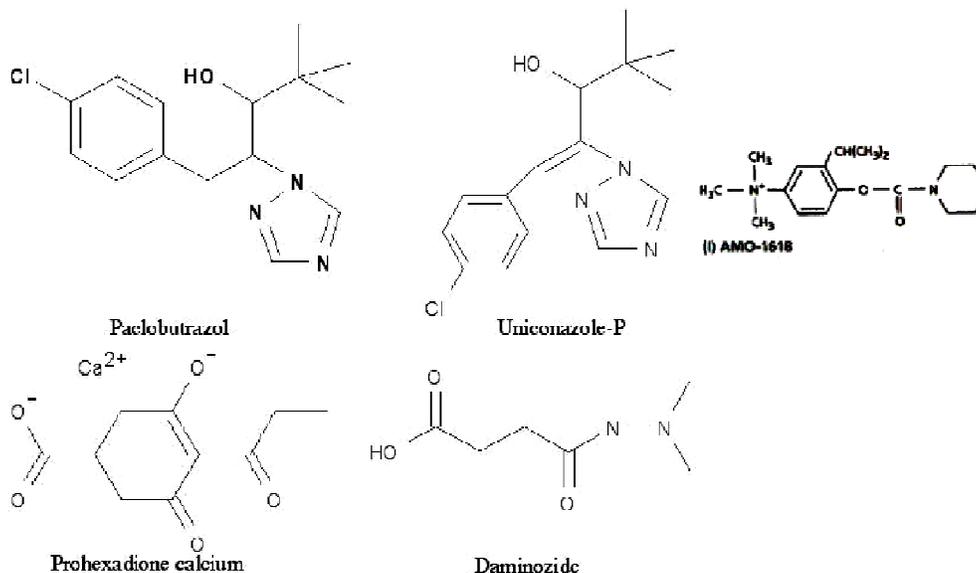
❖ AUMENTAR A PRODUÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR

- Giberelinas aumentam o tamanho dos entrenós, em consequência ocorre aumento na produção de sacarose. Alguns resultados mostram que aplicação de GA induz um aumento de 20 ton/hectare na produção bruta de colmo e de 2 ton/hectare na produção de açúcar.

❖ INIBIDORES DA BIOSÍNTESE DE GAS

- Conhecidos como retardantes do crescimento, eles têm sido utilizados na agricultura, bem como no melhoramento genético, podendo ser utilizados na redução do acamamento de plantas (CCC, em trigo), no crescimento de árvores (paclobutrazol, em girassol), na tolerância a estresses ambientais (AMO-1618, em repolho, proteger de geadas) e na indução do florescimento (paclobutrazol, em manga).

Estruturas de inibidores da biossíntese de giberelinas.



Biossíntese e desativação de giberelinas

As giberelinas constituem uma grande família de ácidos diterpênicos tetracíclicos sintetizados pela rota de terpenoides.

É importante conhecer a biossíntese e a desativação de giberelinas à medida que isso contribui para o entendimento da homeostasia de GA.

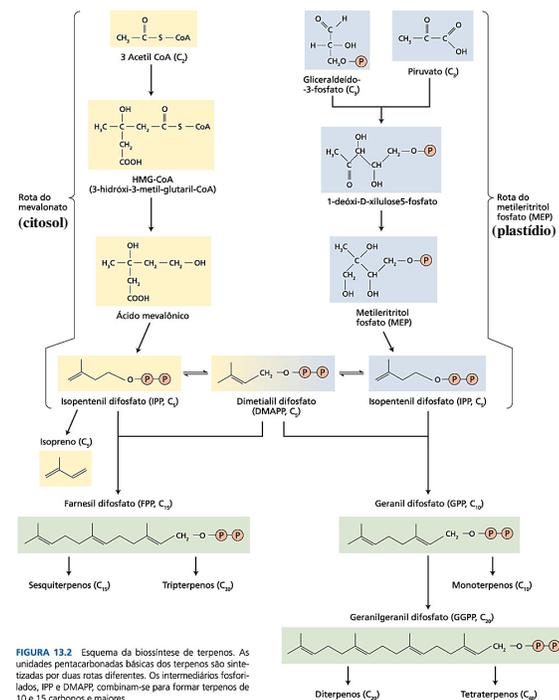
Homeostasia de GA entende-se pela manutenção de níveis apropriados de GA bioativa em células e tecidos vegetais durante o ciclo de vida. A homeostasia depende da regulação da biossíntese, desativação e transporte de GA.

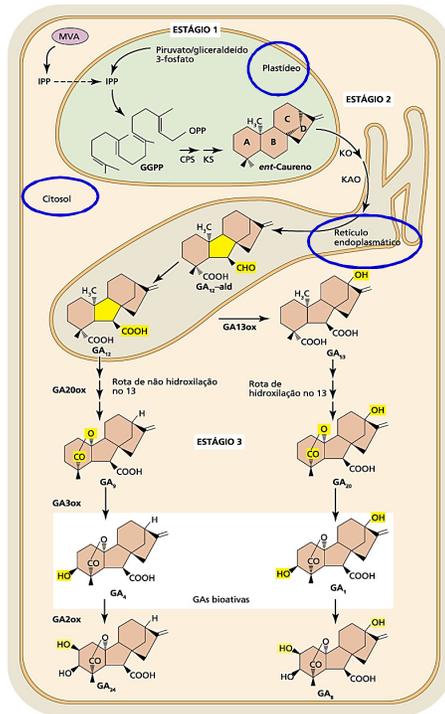
O isolamento de mutantes com comprimento do caule alterado tornou possível determinar quais das GAs presentes em uma planta têm atividade biológica intrínseca.

O uso de mutantes também facilitou a identificação e a clonagem de genes que codificam as enzimas na rota biossintética de GA.

O sequenciamento dos genomas de *A. thaliana* e arroz levaram ao desenvolvimento de bancos de dados completos, que facilitam a rápida identificação de genes e proteínas relacionados ao metabolismo e regulação de giberelinas.

As giberelinas
são sintetizadas
pela rota de
terpenoides





Stage 1: Cyclization reactions
Location: Proplastids
Enzymes: Cyclases
Inhibitors: Quaternary ammonium and phosphonium compounds; AMO-161B, Cycocel, Phosphon D

Stage 3: Formation of all other GAs from GA₁₂-aldehyde
Location: Cytosol
Enzymes: Dioxygenases
Inhibitors: Cyclohexanetriones

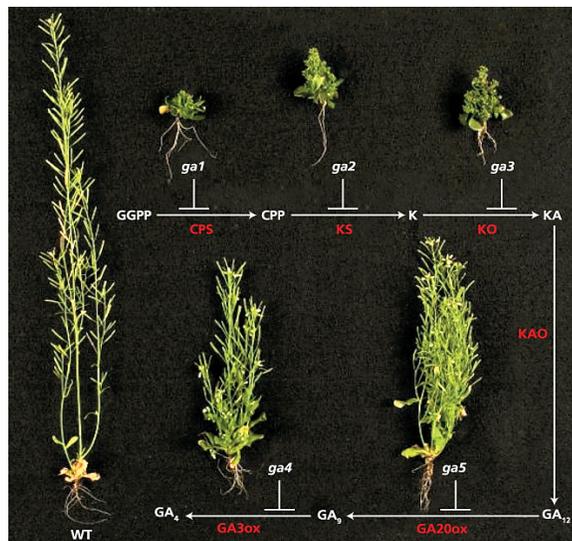
Stage 2: Oxidations to form GA₁₂-aldehyde
Location: Endoplasmic reticulum
Enzymes: P 450 monooxygenases
Inhibitors: N- heterocyclics: Paclobutrazol, Tetcyclacis, Uniconazole

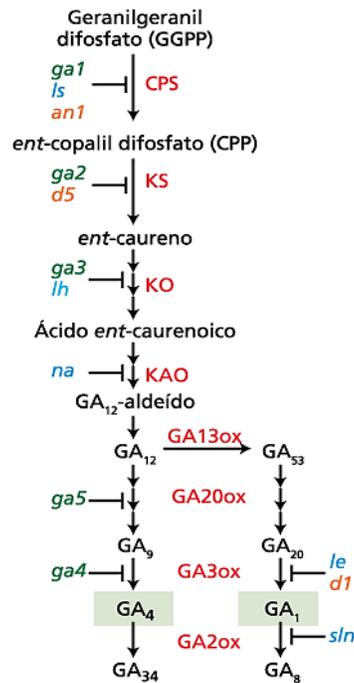
FIGURA 20.5 Os três estágios da biossíntese de GA. No estágio 1, o geranilgeranil difosfato (GGPP) é convertido em *ent*-caureno. No estágio 2, no retículo endoplasmático, o *ent*-caureno é convertido em GA₁₂-aldeído e GA₁₂. Por hidroxilação no carbono 13, GA₁₂ é convertida em GA₃₃. O estágio 3 ocorre no citosol, onde GA₁₂ e GA₃₃ são convertidas em outros GAs, via rotas paralelas. Essa conversão passa por uma série de oxidações no carbono 20, resultando na perda desse carbono e na formação GAs-C19. A 3β-hidroxilação, então, produz GA₄ e GA₁ como as GAs bioativas em cada rota. Após, a hidroxilação no carbono 2 converte GA₄ e GA₁ nas formas inativas GA₃₄ e GA₈, respectivamente. Na maioria das plantas, a rota de hidroxilação no 13 predomina, embora em *A. thaliana* e algumas outras espécies a rota de não hidroxilação no 13 seja a principal. CPS = *ent*-copalil difosfato sintase; KS = *ent*-caureno sintase; KO = *ent*-caureno oxidase; KAO = ácido *ent*-caurenoico oxidase; GA20ox = GA 20-oxidase; GA3ox = GA 3-oxidase; GA2ox = GA 2-oxidase; GA13ox = GA 13-oxidase.

Na rota de GA, algumas enzimas são altamente reguladas

Os trabalhos com mutantes de *A. thaliana*, ervilha e milho facilitaram a clonagem dos genes relacionados a muitas enzimas que participam da biossíntese e desativação de GA.

FIGURA 20.6 Fenótipos do tipo selvagem e de mutantes deficientes em GA de *A. thaliana*, mostrando a posição na rota de biossíntese de GA que é bloqueada em cada mutante. Todos os alelos mutantes (indicados pela letra minúscula em relação aos alelos selvagens) são homocigotos. As plantas foram cultivadas sob luz contínua e têm 7 semanas de idade. Observe que as plântulas *ga1*, *ga2* e *ga3* são estéreis e não produziram cápsulas com sementes (siliquis). Para abreviações, ver Figura 20.5 (cortesia de V. Sponsel).





Do ponto de vista de regulação, as mais conhecidas são três enzimas da etapa 3 da rota: GA 20-oxidase (GA20ox) e GA 3-oxidase (GA3ox), que catalisam as fases anteriores à GA bioativa, e a GA 2-oxidase (GA2ox), envolvida na desativação de GA. As três enzimas são classificadas como dioxigenases e utilizam 2-oxoglutarato como co-substrato e Fe²⁺ como cofator.

FIGURA 20.7 Uma parte da rota de biossíntese de GA, mostrando as etapas metabólicas que estão bloqueadas por mutações conhecidas (indicadas por letras minúsculas em relação aos alelos selvagens), em *A. thaliana* (verde), ervilha (azul) e milho (laranja). Para abreviaturas, ver Figura 20.5. Como uma notação histórica, os nomes GA1-GA5 para 5 loci não alélicos, em *A. thaliana*, que codificam enzimas na rota de biossíntese de GA, foram denominados muito tempo antes do conhecimento sobre a natureza das enzimas ou seus genes (Koorneef e van der Veen, 1980). Após testes genéticos, eles foram colocados em sequência com base na ordem prevista de ação na rota.

A giberelina regula seu próprio metabolismo

Muitos fatores são importantes na manutenção da homeostasia hormonal, incluindo o balanço relativo entre a síntese e a desativação.

Parte da resposta de uma planta a GA bioativa é diminuir a biossíntese de GA estimulando a desativação, para evitar o alongamento excessivo do caule.

A diminuição da biossíntese é atingida por regulação negativa, inibição da expressão (denominado regulação por retroalimentação negativa, *negative feedback regulation*) de alguns dos genes *GA20ox* e *GA3ox*, que codificam as duas últimas enzimas na formação de GA bioativa.

O aumento da desativação de GA também é importante para a manutenção da homeostasia desse hormônio e é obtido por regulação positiva (estímulo) na expressão de alguns genes *GA2ox*, que codifica a enzima que desativa GA.

A capacidade de GA em promover a expressão de genes envolvidos na sua própria desativação é denominada regulação por feed-forward positiva (*positive feed-forward regulation*).

A biossíntese de GA ocorre em múltiplos órgãos vegetais e sítios celulares

Os estudos com gene-repórter têm demonstrado que *GAI*, que codifica CPS (*sintase do ent-copalil difosfato*), a primeira enzima relacionada à biossíntese de GA, é expressa em sementes imaturas, ápices de caule e raízes, e anteras em plantas selvagens de *A. thaliana*.

Conforme esperado, esses são afetados em mutantes *gai*, que exibem dormência de sementes, hábito de nanismo extremo e esterilidade dos estames.

Em embriões de *A. thaliana* em germinação, observa-se que a GA₄ atua nas células nas quais é sintetizada e em células diferentes, indicando que GA₄ ou um componente abaixo dela (precursor) na rota de resposta deve se mover de célula para célula.

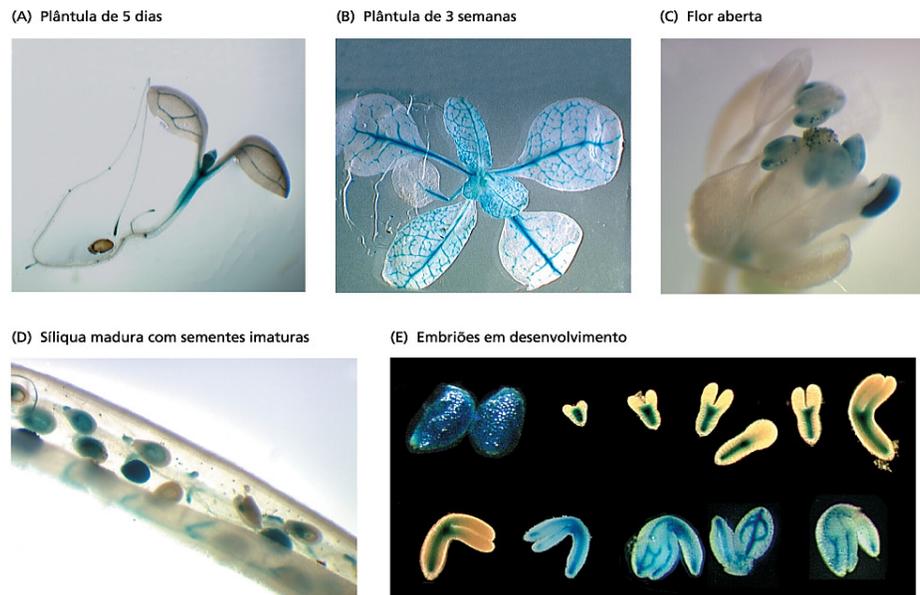


FIGURA 20.8 Análise histoquímica de indivíduos de *A. thaliana* contendo a fusão do promotor *GA1* com o gene *GUS*, em cinco estágios de desenvolvimento diferentes. *GA1* codifica CPS, a primeira enzima relacionada à biossíntese de GA. A coloração azul mostra

onde existe atividade do promotor *GA1*. Estas imagens ilustram que essa etapa inicial da biossíntese de GA ocorre em numerosos tecidos e órgãos e em diferentes estágios do ciclo de vida (de Silverstone et al., 1997a; cortesia de T.-p. Sun).

As condições ambientais podem influenciar a biossíntese de GA

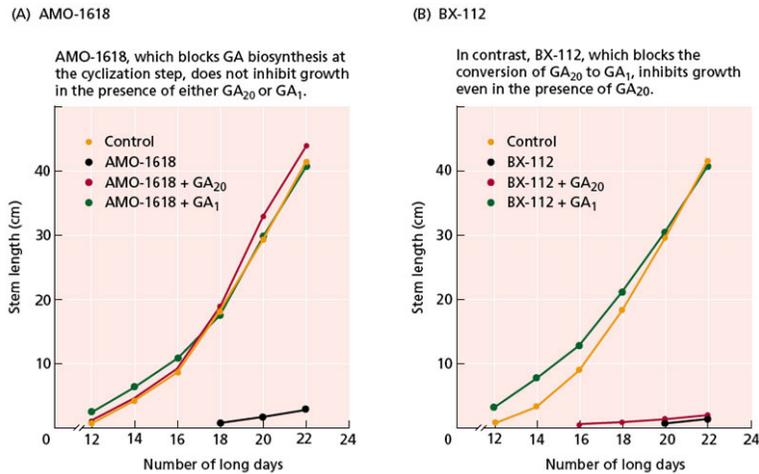
As giberelinas exercem um papel importante na mediação dos efeitos dos estímulos ambientais no desenvolvimento vegetal.

A luz e a temperatura podem ter efeitos profundos no metabolismo de GAs e na resposta a esses hormônios.

Em muitos casos o ambiente pode alterar o metabolismo de outros hormônios ou a resposta a eles, adicionalmente às GAs.

A razão da GA bioativa com ABA é especialmente importante, bem como a sensibilidade relativa de tecidos diferentes a esses dois hormônios.

O uso de inibidores de crescimento evitam o alongamento dos entrenós (*bolting*)



Web Figure 20.5.A The use of specific growth retardants (GA biosynthesis inhibitors) and the reversal of the effects of the growth retardants by different GAs can show which steps in GA biosynthesis are regulated by environmental change, in this case the effect of long days on stem growth in spinach. The control lacks inhibitors or added GA. (After Zeevaart et al. 1993.)

O fotoperíodo controla a formação de tubérculo.

A formação de tubérculos em dias curtos está associada ao declínio nos níveis de GA₁.



Web Figure 20.5.B TubORIZATION of potatoes is promoted by short days. Potato (*Solanum tuberosum* spp. *Andigena*) plants were grown under either long days or short days. The formation of tubers in short days is associated with a decline in GA₁ levels. (Courtesy of S. Jackson.)

GA₁ e GA₄ possuem bioatividade intrínseca para promover o crescimento do caule

Estudos originais com mutantes para a biossíntese de GA (também referidos como mutantes deficientes em GA), realizados na década de 1980, atingiram dois objetivos importantes.

Além de prover evidência para que as rotas de metabolismo de GA fossem definitivamente estabelecidas, esses estudos determinaram que GA₁ é a principal giberelina bioativa no crescimento do caule em ervilha e milho, e que seus precursores não apresentam atividade biológica intrínseca (em *A. thaliana* e membros da família das cucurbitáceas, GA₄ parece ser a principal GA biologicamente ativa).

Os níveis endógenos de GA₁ estão relacionados com a altura.

- Mutante *na/LE/SLN* (ultra-anã) tem 1 cm de altura na maturidade;
- Mutante *NA/le/SLN* (anã) tem entrenós de 3 cm em planta madura;
- Planta normal *NA/LE/SLN* (alta) tem entrenós de 15 cm na maturidade.
- Mutante *NA/LE/sln* (ultra-alta).

Figura 20.9 – Fenótipos e genótipos de ervilhas que diferem no teor de GA₁ nos tecidos vegetativos (todos os alelos estão em homozigose) (Davies, 1995).

O *NA* codifica a KAO.

O gene *LE* codifica a enzima que realiza a 3β-hidroxiilação de GA₂₀ para GA₁ (GA3ox).

O *SLN* codifica GA2ox.



A altura das plantas pode ser geneticamente modificada



Tipo selvagem (não transformado) Plantas transformadas superexpressando a *GA 2-oxidase*

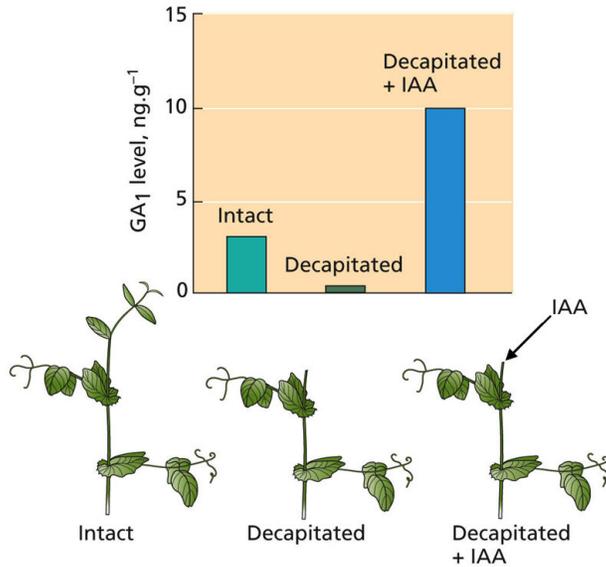
FIGURA 20.10 Plantas de trigo anãs, geneticamente modificadas. O trigo do tipo selvagem (não transformado) é mostrado na extrema esquerda. As três plantas à direita foram transformadas com cDNA *GA 2-oxidase* de feijoeiro, sob o controle de um promotor constitutivo. Consequentemente, a bioativa GA_1 endógena é desativada mais nas plantas transformadas que nas plantas do tipo selvagem. Os graus variados de nanismo refletem os diferentes graus de superexpressão de *GA 2-oxidase* com a expressão mais alta na extrema direita (de Hedden e Phillips, 2000, cortesia de A. Phillips).

Os mutantes anões frequentemente mostram outros defeitos fenotípicos



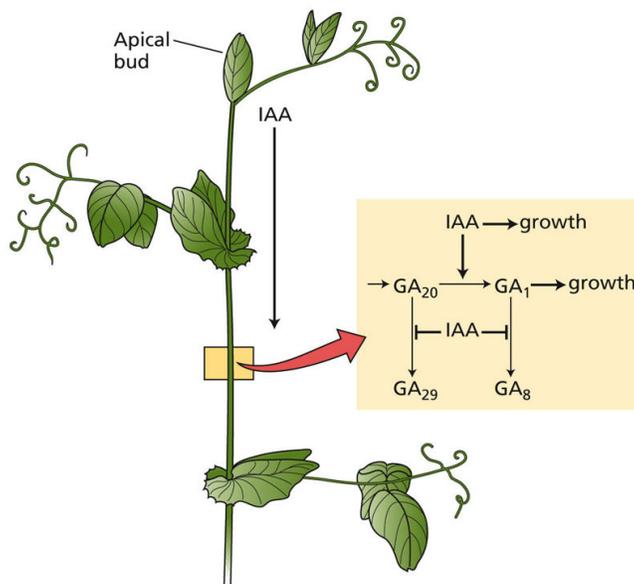
FIGURA 20.11 Redução no desenvolvimento das sementes, em um mutante de ervilha deficiente em GA. Vagens do tipo selvagem (à esquerda) e do mutante *lh-2* (à direita), mostrando o desenvolvimento reduzido das sementes do mutante (cortesia de J. B. Reid).

As auxinas podem regular a biossíntese de GA



Web Figure 20.6.D Extraction of pea seedlings shows that decapitation reduces endogenous GA₁ content of plants after 48 hours. IAA (auxin) applied at time 0 to a decapitated stump (arrow) restores GA₁ levels after 48 hours, and maintains elongation of the uppermost intact internode to the same level as that in the intact plant. The uppermost intact internode in the decapitated seedling elongates slightly less (about 10%) during the 48 hour duration of the experiment.

As auxinas podem regular a biossíntese de GA



Web Figure 20.6.E IAA (from the apical bud) promotes and is required for GA₁ biosynthesis in subtending internodes of pea. IAA also inhibits GA₁ breakdown.

Sinalização da giberelina: significado da resposta dos mutantes

Mutantes de um único gene, com deficiência na resposta à GA, têm sido ferramentas valiosas para a identificação de genes que codificam possíveis receptores de GA ou componentes de suas rotas de transdução de sinal.

Em termos gerais, os fatores que afetam a transdução de sinal podem ser reguladores *positivos* ou *negativos*. Três principais classes de mutantes podem ser distinguidas:

1. Uma mutação que torna não funcional um regulador positivo de sinalização de GA, origina um fenótipo anão. Essas mutações de perda de função são recessivas e os mutantes não respondem à aplicação de GA, devido à deficiência em um componente essencial da rota de transdução de sinal.
2. Uma mutação que torna não funcional um regulador negativo de ação de GA origina um fenótipo *alto*. Novamente, essas mutações de perda de função são recessivas.
3. Uma terceira classe de mutantes, na qual um *regulador negativo* é tornado *constitutivamente ativo*, também origina plantas *anãs* não responsivas à GA, mas, nesses casos, as mutações são de “ganho de função” e, portanto, são semi-dominantes.

O que torna esses mutantes de resposta à GA diferentes daquelas plantas com mutações que bloqueiam enzimas na rota de biossíntese de GA?

A diferença é que a altura desses mutantes de resposta à GA não é proporcional à quantidade desse hormônio. Sabe-se isso porque as plantas anãs insensíveis à GA, não se tornam altas quando tratadas com esse hormônio.

GID1 codifica um receptor solúvel de GA

Um avanço importante na compreensão da transdução de sinal de GA surgiu com a caracterização de um mutante anão recessivo de arroz, denominado *GA-insensitive dwarf (gid1)*. O tipo selvagem codifica uma proteína globular, GID1, que é um receptor de GA.

Para ser identificada como um receptor, uma proteína precisa preencher os seguintes critérios:

- **A ligação do ligante (nesse caso, GA) à proteína deve ser específica. Quando foi testada a ligação de dez GAs, com atividades biológicas relativas variadas, à GID1, as GAs bioativas se ligaram com afinidade mais alta.**

- A ligação ao ligante deveria ser *saturável*; esta mostrou ser a situação de **GID1** (Fig 20.12A). ➡
- A ligação ao ligante deveria ser de *alta afinidade*: quanto mais alta a afinidade das GAs com a proteína, tanto mais fortemente ligadas elas serão, e menos facilmente serão dissociadas (Fig 20.12B). ➡
- A ligação ao ligante deveria ser rápida e reversível. A Fig 20.12C mostra que a ligação total da GA marcada com radioisótopo à **GID1** alcançou a metade do valor máximo em 5 minutos. ➡

Logo após a identificação de GID1 no arroz, três ortólogos (genes em espécies diferentes que têm sequências similares entre si, porque são derivados de um único gene em seu ancestral comum) foram descobertos em *A. thaliana*, a saber: GID1a, GID1b e GID1c. ➡

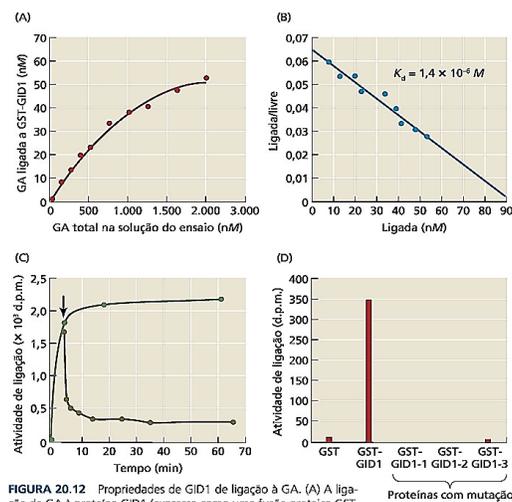


FIGURA 20.12 Propriedades de GID1 de ligação à GA. (A) A ligação de GA à proteína GID1 (expressa como uma fusão proteica GST-GID1) mostra saturação, quando GID1 é incubada com uma quantidade constante de GA_s marcada com radioisótopo e concentrações crescentes de GA_s não marcada. (B) Uma análise de Scatchard plot dos dados de A, resultando uma constante de dissociação (K_d). (C) Taxas de associação/dissociação de GA_s marcada com radioisótopo e GID1. Em cinco minutos, a ligação total de GA_s marcada alcançou a metade do máximo (linha verde). A adição de GA_s não marcada (seta) reduziu a ligação a menos de 10%, em cinco minutos (linha escura). (D) Três diferentes proteínas GID1 que sofreram mutação (expressas como fusões GST-GID1-1, GST-GID1-2 e GST-GID1-3) não se ligam à GA_s marcada, evidenciando enfaticamente que a ligação de GA_s à proteína do tipo selvagem é específica (segundo Ueguchi-Tanaka et al., 2005).

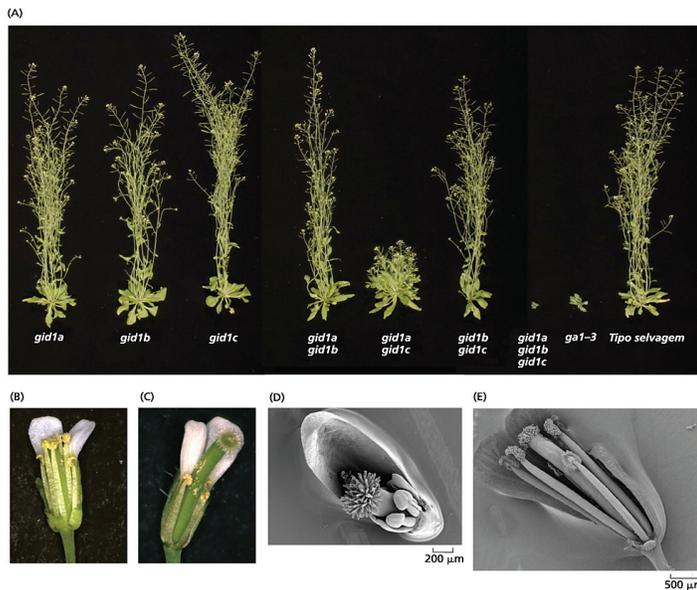


FIGURA 20.13 Fenótipos dos mutantes *gid1a*, *gid1b* e *gid1c* de *A. thaliana*. (A) Porções aéreas de uma planta do tipo selvagem com 37 dias (Col-0) e mutantes homocigotos, mostrando que mutantes simples não têm um fenótipo com comprimento do caule perceptivelmente alterado. O mutante duplo *gid1a/gid1c* é anão, enquanto os outros dois mutantes duplos exibem alguma redundância funcional e são altos. O mutante triplo (*gid1a/gid1b/gid1c*) é um anão extremo.

O mutante *ga1-3* deficiente em GA foi incluído para comparação. (B) Vista em detalhe de uma flor do tipo selvagem. (C) O mutante duplo *gid1a/gid1b* tem anteras defeituosas. (D, E) Micrografias ao microscópio eletrônico de varredura de flores de *gid1a/gid1b/gid1c* (D) e do tipo selvagem (E). Para melhor visualização, as sépalas e as pétalas foram retiradas nas duas imagens (de Griffiths et al., 2006; cortesia de S. Thomas).

A mutação em apenas um desses genes, *GID1a*, *GID1b* ou *GID1c*, de *A. thaliana*, não será expressa como uma diferença perceptível no comprimento do caule. Porém, se os três genes sofrem mutação, então o “mutante triplo” exibe nanismo extremo. Além disso, defeitos graves na antera levam à esterilidade masculina no mutante triplo.

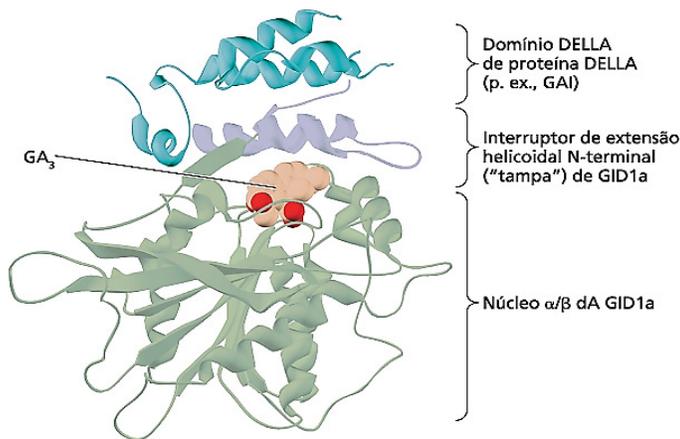
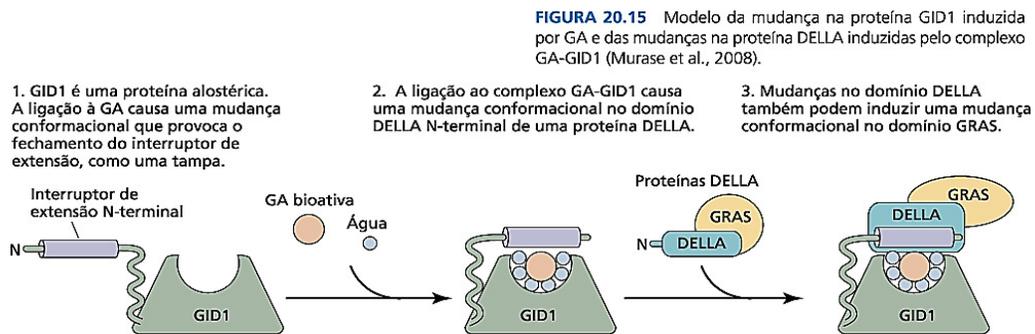


FIGURA 20.14 Estrutura do complexo GA_3 -GID1a-DELLA. A molécula GA_3 ligada está representada como um modelo de preenchimento espacial, com carbono em bege e oxigênio em vermelho. A ligação de uma GA bioativa (p. ex., GA_3) dentro de uma cavidade no receptor GID1a permite que o interruptor de extensão cubra a GA, mais exatamente como uma “tampa” fechando. A tampa fecha a parte “apical” hidrofóbica da GA, a qual não tem átomos de oxigênio expostos. Logo que o interruptor de extensão é fechado, o domínio DELLA de uma proteína DELLA (p. ex., GAI) pode ligar-se à sua superfície superior externa (Murase et al., 2008).

Modificações da molécula de GA podem reduzir a ligação com o receptor: GAs nas quais o ácido carboxílico no C-6 está metilado ou que não possui um 3β -OH liga-se à GID1 com uma afinidade que é várias ordens de grandeza menor que a de uma GA bioativa. Mesmo que uma GA tenha um 3β -OH e COOH no C-6, a presença de um grupo 2β -OH, leva à interferência estérica e, assim, reduz a ligação à proteína receptora.

Interação entre GA bioativa, o receptor GID1 e o regulador negativo GAI (uma proteína DELLA)

Não há uma interação direta entre a GA e a proteína DELLA (a GA está encoberta dentro da GID1) mas a GA bioativa é um ativador alostérico de GID1, que facilita sua ligação a uma proteína DELLA.



As proteínas com domínio DELLA são reguladores negativos de resposta à GA

As proteínas com domínio DELLA (asp, glu, leu, leu e ala) constituem uma subclasse da família GRAS de reguladores transcricionais. Todas as proteínas GRAS (gly, arg, ala e ser) têm homologia no domínio C-terminal. Aquelas envolvidas em respostas à GA também possuem um domínio na extremidade N-terminal, denominado DELLA.

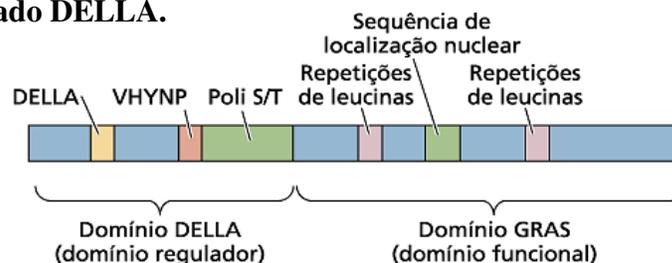


FIGURA 20.16 Estruturas dos domínios das proteínas repressoras RGA e GAI, mostrando o domínio regulador DELLA e o domínio funcional GRAS.



FIGURA 20.17 Demonstração dos efeitos opostos de duas mutações diferentes no mesmo gene repressor *SNL1*. São mostradas três partes aéreas de plântulas de cevada com 2 semanas de idade. No centro: plântula do tipo selvagem (TS). À esquerda: o mutante *sln1c* tem um fenótipo ultra-alto (*slender*) GA-constitutivo, associado à perda de função da proteína repressora, devido a uma mutação no domínio GRAS repressor. À direita: o mutante *sln1d* é um anão dominante, com ganho de função, porque uma mutação no domínio DELLA impede a degradação da proteína repressora (de Chandler et al., 2002; cortesia de P.M. Chandler).

A mutação de reguladores negativos de GA pode produzir fenótipos ultra-alto ou anão.

As giberelinas sinalizam a degradação de reguladores negativos de resposta à GA (RGA).

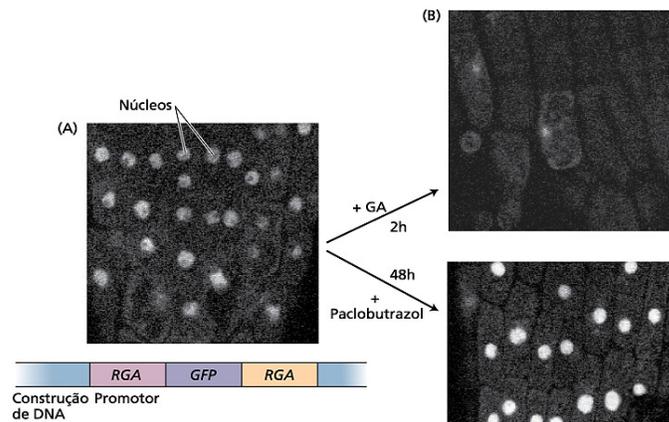
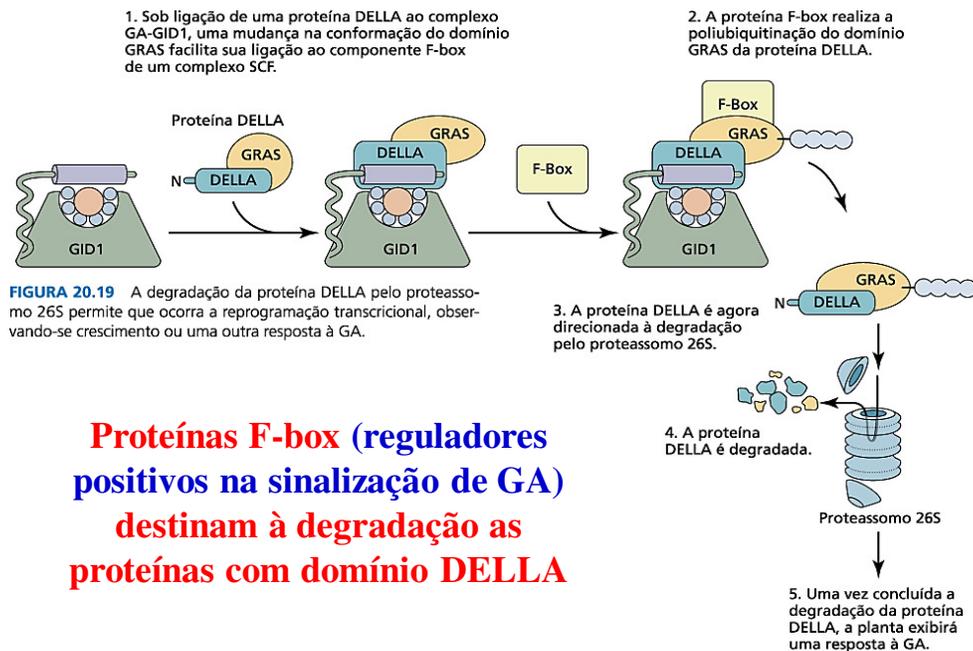


FIGURA 20.18 A proteína RGA é encontrada no núcleo, coerente com a sua identidade como um regulador transcricional, e sua quantidade é afetada pelo nível de GA. (A) Células vegetais foram transformadas com o gene da RGA fusionado ao gene da proteína verde fluorescente (GFP), possibilitando a detecção de RGA no núcleo, por microscopia de fluorescência. (B) Um pré-tratamento com GA por duas horas causa a perda de RGA pelo núcleo (acima). Quando a biossíntese de GA é inibida por um tratamento com paclobutrazol (um inibidor da biossíntese desse hormônio) por 48 horas, o conteúdo de RGA no núcleo aumenta (abaixo). Essas micrografias mostram que RGA é degradada na presença de GA, mas não na sua ausência (de Silverstone et al., 2001).



Proteínas F-box (reguladores positivos na sinalização de GA) destinam à degradação as proteínas com domínio DELLA

Respostas à giberelina: alvos precoces de proteína DELLA

As GAs podem afetar muitos aspectos do crescimento e desenvolvimento vegetais, desde a germinação de sementes até o desenvolvimento de flores e frutos.

O desafio recente tem sido relacionar o conhecimento moderno de percepção à GA, em nível molecular, com eventos a jusante que levam a mudanças no crescimento e desenvolvimento.

Muitos estudos de expressão gênica em *A. thaliana* têm sido importantes na determinação de “genes precoces de resposta à GA”, pois esses genes são “ligados” ou “desligados” pelas proteínas DELLA.

O objetivo de vários estudos recentes tem sido usar sistemas experimentais em que a expressão de genes DELLA possa ser induzida e, após, possam ser identificados os genes que mostram mudanças rápidas na expressão.

Os genes que exibem expressão alterada em uma ou duas horas de expressão DELLA indutora provavelmente são genes precoces de resposta à GA.

As proteínas DELLA podem ativar ou suprimir a expressão gênica

Os genes precoces de resposta à GA a jusante de proteínas DELLA são genes que codificam enzimas da biossíntese de GA ou o receptor de GA, implicando uma forte regulação homeostática para manter os níveis de GA e as respostas de GA dentro de limites fisiológicos.

Outros alvos imediatos de proteínas DELLA são genes que codificam fatores de transcrição ou reguladores transcricionais.

Embora alguns desses alvos de DELLA, em plântulas e inflorescências, pertençam às mesmas classes de reguladores transcricionais, o notável é que nelas parece haver muito pouca sobreposição nos genes individuais regulados pelas proteínas DELLA.

Essas observações podem auxiliar a explicar a especificidade da ação da GA e como um único hormônio pode levar a tantos tipos diferentes de respostas dependendo do estágio de desenvolvimento ou tecido-alvo.

As proteínas DELLA regulam a transcrição por interação com outras proteínas, como fatores de transcrição do fitocromo (PIFs)

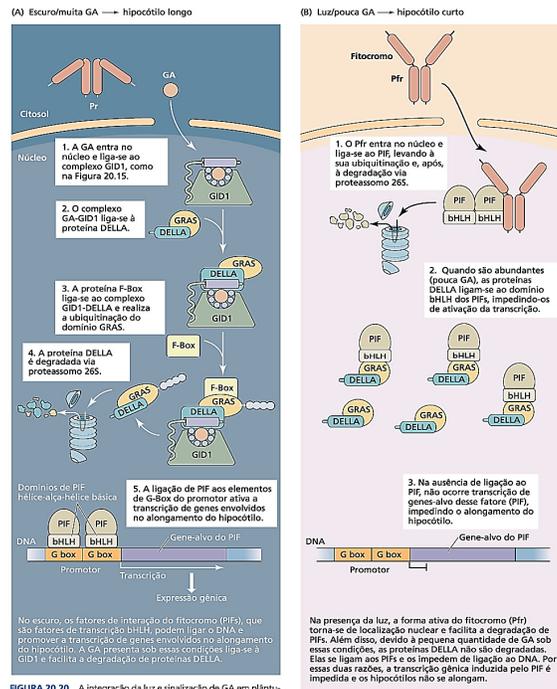


FIGURA 20.20 A integração da luz e sinalização de GA em plântulas de *A. thaliana* controla o comprimento do hipocótilo.

Respostas à giberelina: a camada de aleurona de cereais

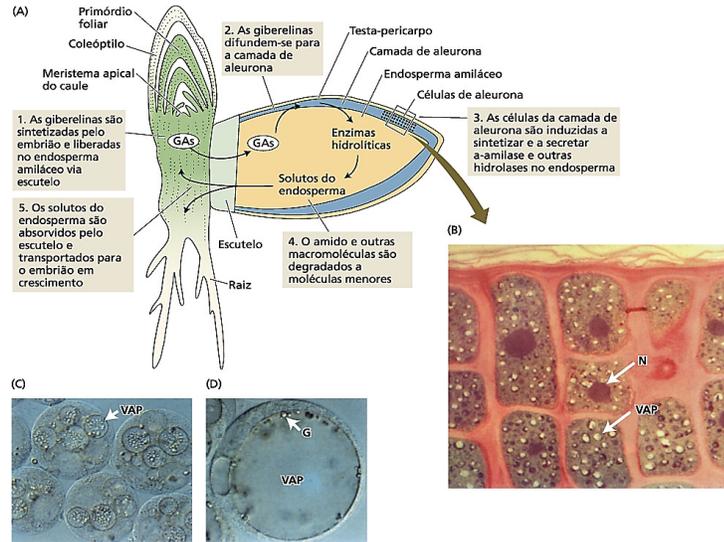


FIGURA 20.21 Estrutura de um grão de cevada e as funções de vários tecidos durante a germinação (A) Diagrama de interações iniciadas na germinação. (B-D) Micrografias da camada de aleurona de cevada (B) e de protoplastos de células de aleurona de cevada nos estágios inicial (C) e tardio (D) de produção de amilase. As vesículas de armazenamento de proteínas múltiplas (VAP, em C) coalescem, formando uma vesícula grande (D), que fornecerá aminoácidos para a síntese de α -amilase. G = globóide de fitina que sequestra minerais; N = núcleo (B-D de Bethke et al., 1997, cortesia por P. Bethke).

GAMYB é um regulador positivo da transcrição do gene α -amilase

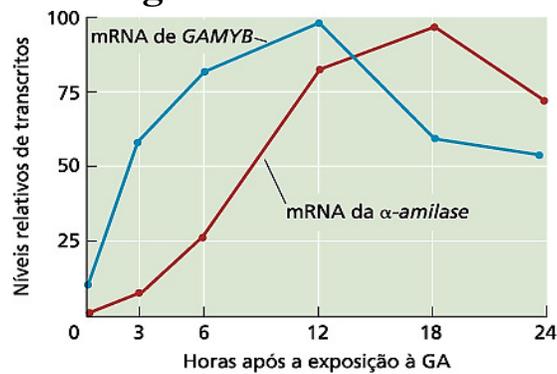


FIGURA 20.22 Andamento da indução de mRNA de *GAMYB* e da α -amilase pela GA_3 . A produção de mRNA do *GAMYB* precede a de mRNA da α -amilase por cerca de 3 horas. Esses e outros resultados indicam que *GAMYB* é um gene precoce de resposta à GA que regula a transcrição do gene da α -amilase. Na ausência de GA, os níveis de mRNAs de *GAMYB* e α -amilase são insignificantes (segundo Gubler et al., 1995).

1. A GA₁ do embrião entra em uma célula de aleurona.
2. Uma vez no interior da célula, a GA₁ pode iniciar uma rota dependente de cálcio-calmodulina, necessária para a secreção de α -amilase.
3. A GA₁ liga-se à GID1 (um receptor solúvel de GA) no núcleo.
4. Estando ligado à GA₁, o receptor GID1 experimenta uma mudança alostérica que facilita sua ligação a uma proteína DELLA.
5. Uma vez que a proteína DELLA está ligada ao complexo GA₁-GID1, uma proteína F-box (parte de um complexo SCF) está apta a realizar a poliubiquitinação do domínio GRAS da proteína DELLA.
6. A proteína DELLA poliubiquitada é degradada pelo proteassomo 26S.
7. Tão logo a proteína DELLA tenha sido degradada, a transcrição de um gene precoce é ativada. (Neste modelo, GAMYB é apresentado como um gene precoce, embora haja evidências que pode ocorrer primeiramente a regulação transcripcional de outros genes precoces.) O mRNA de GAMYB é traduzido no citosol.
8. O fator de transcrição GAMYB recém-sintetizado entra no núcleo e liga-se aos promotores do gene da α -amilase e genes que codificam outras enzimas hidrolíticas.
9. A transcrição desses genes é ativada.
10. A α -amilase e outras hidrolases são sintetizadas no RE rugoso, processadas e empacotadas em vesículas secretoras pelo complexo de Golgi.
11. As proteínas são secretadas por exocitose.
12. A rota secretora requer o estímulo de GA da rota de transdução de sinal dependente de cálcio-calmodulina.

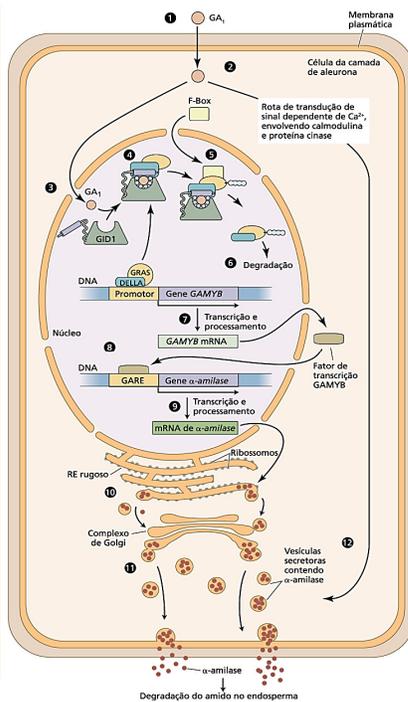


FIGURA 20.23 Modelo composto da indução da síntese de α -amilase por GA₁ em camadas de aleurona de cevada. Uma rota independente de cálcio induz a transcrição do gene α -amilase; uma rota dependente de cálcio está envolvida na secreção da enzima α -amilase.

Modelo composto da indução da síntese de α -amilase por GA, em camadas de aleurona de cevada.

Respostas à giberelina: desenvolvimento da antera e fertilidade masculina

O efeito da GA bioativa sobre o desenvolvimento do pólen e na regulação da fertilidade masculina é mediado pelo fator de transcrição GAMYB.

Embora GAMYB regule muitos genes em camadas de aleurona e anteras, os genes regulados por ela nos dois sistemas são completamente diferentes (Tsuji et al., 2006).

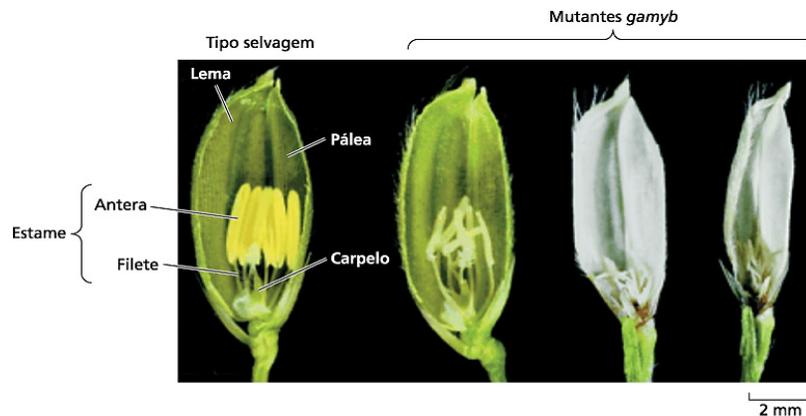


FIGURA 20.24 Fenótipos de órgãos florais dos mutantes *gamyb* de arroz, mostrando que o desenvolvimento normal do pólen requer os fatores de transcrição *GAMYB* para estar presente e funcional. Uma flor do tipo selvagem é mostrada na posição mais à esquerda. Da esquerda para a direita, observam-se intensidades progressivas

do fenótipo mutante *gamyb*. Na ausência de um gene *GAMYB* funcional, as anteras são brancas, em vez de amarelas, e sem pólen. Os fenótipos mais extremos exibem brácteas (lema e pálea) brancas e enrugadas circundando estames e carpelos malformados (de Kaneko et al., 2004; cortesia de M. Matsuoka).

Respostas à giberelina: crescimento do caule

Os efeitos das GAs sobre o crescimento do caule podem ser tão drásticos que é possível imaginar que seria simples determinar como esses hormônios atuam (mais evidentes em plantas anãs e em “roseta”).

Infelizmente, não é o caso, pois pouco é compreendido sobre o crescimento de células vegetais.

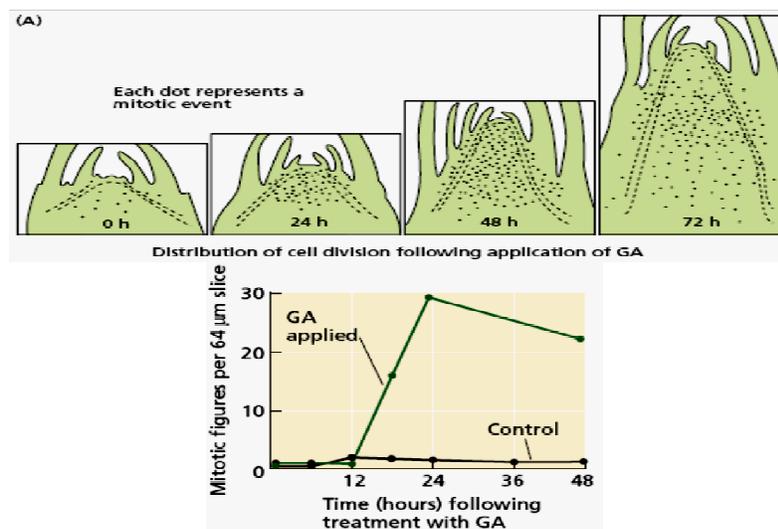
Entretanto, são conhecidos algumas características básicas do alongamento do caule induzido por GA.

As giberelinas estimulam o alongamento e a divisão celulares

As giberelinas estimulam tanto o alongamento quanto a divisão celulares, como evidenciado pelos aumentos do comprimento celular e do número de células, em resposta á aplicação de GAs bioativas.

- Os entrenós de indivíduos altos de ervilha possuem mais células que as plantas anãs, e as células são mais longas.
- A taxa de mitose aumenta de modo notável na nervura principal ou no meristema fundamental de plantas em “rosetas” de dias longos crescendo em dias curtos, após tratamento com GA bioativa.
- A estimulação drástica do alongamento do entrenós em arroz irrigado, quando submerso ou quando tratado com GA, deve-se, em parte, ao aumento da atividade de divisão celular no meristema intercalar encontrado em determinadas monocotiledôneas.

Aplicação de GA em plantas em “roseta” induz o alongamento dos entrenós, em parte por aumentar a divisão celular



As giberelinas aumentam a extensibilidade da parede celular sem causar acidificação após um *lag time* de 40 minutos em arroz e de duas a três horas em ervilha.

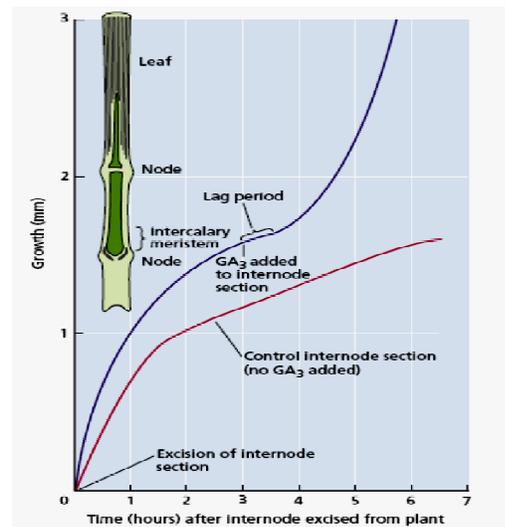


FIGURE 20.23 Continuous recording of the growth of the upper internode of deep-water rice in the presence or absence of exogenous GA_3 . The control internode elongates at a constant rate after an initial growth burst during the first 2 hours after excision of the section. Addition of GA_3 after 3 hours induced a sharp increase in the growth rate after a 40-minute lag period (upper curve). The difference in the initial growth rates of the two treatments is not significant here, but reflects slight variation in experimental materials. The inset shows the internode section of the rice stem used in the experiment. The intercalary meristem just above the node responds to GA_3 . (After Sauter and Kende 1992.)

Uma das hipóteses para explicar o mecanismo do alongamento do caule estimulado pela GA é o que envolve a participação da enzima XET (xiloglucano endotransglicosilase).

A XET estaria envolvida no aumento da extensibilidade da parede induzido por GA .

A XET atuaria aumentando a permeabilidade da parede para a penetração das expansinas.

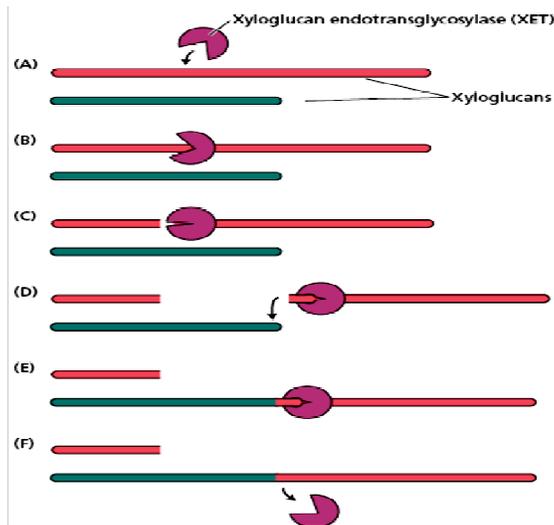


FIGURE 15.16 Action of xyloglucan endotransglycosylase (XET) to cut and stitch xyloglucan polymers into new configurations. Two xyloglucan chains are shown in (A) with two distinct patterns to emphasize their rearrangement. XET binds to the middle of one xyloglucan (B), cuts it (C), and transfers one end to the end of a second xyloglucan (D, E), resulting in one shorter and one longer xyloglucan (F). (After Smith and Fry 1991.)



FIGURA 20.27 Indivíduos transgênicos de arroz, portando construções senso e antisseno de *OsEXP4*. A figura mostra antisseno (A), controle (B; isto é, não transgênico) e senso (C). A altura das plantas está relacionada à quantidade de expansina 4. Embora seja transcrito no cultivar antisseno, o gene não é traduzido, diminuindo o nível de expansina 4 nas plantas, em relação ao controle. No cultivar senso, o gene *EXP4* é superexpresso, levando a uma maior quantidade de expansina 4 (de Choi et al., 2003; cortesia de H. Kende).

Em arroz irrigado, os níveis do transcrito de uma expansina específica, codificada por *OsEXP4*, aumentam após 30 minutos de tratamento com GA, ou em resposta à submersão rápida, ambos induzindo o crescimento.

Esses resultados indicam que o alongamento celular induzido por GA é, pelo menos em parte, mediado por expansinas.

As GAs regulam a transcrição das quinases do ciclo celular

- GA ativa a transição de G_1 para S (induz expressão de várias CDK);
- GA regula a transição entre as fases G_2 e M(CDK).

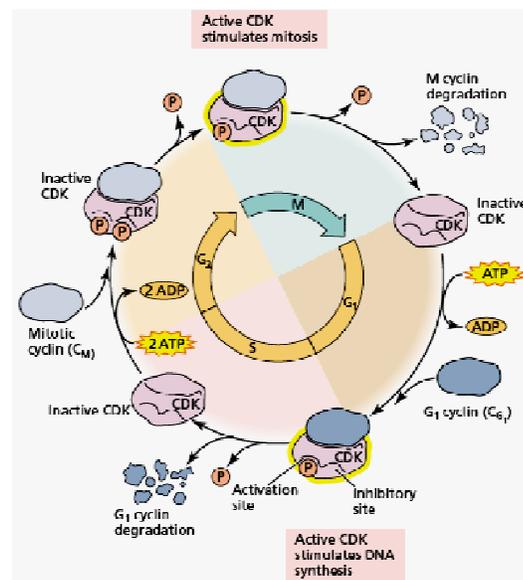


FIGURA 20.28 A expressão de *Sub1A*, seja constitutiva ou induzida pela submersão, produz indivíduos de arroz mais capazes de sobreviver à inundação muito rápida. As fotografias mostram plantas constitutivas (*Sub1A-OE#1* e *Sub1A-OE#2*), induzida pela submersão [*M2O2(Sub1A)*] e intolerante à submersão (não transgênica e *M2O2*), antes da submersão (acima), após 16 dias de submersão (centro) e 7 dias após o final da submersão (abaixo). No início do experimento, todas as plantas estavam no mesmo estágio de desenvolvimento. Os cultivares intolerantes à submersão mostram um alongamento da folha e do entrenó bem evidenciado durante a submersão (fotografia do centro: primeira e quarta plantas), que esgota os recursos e impede a recuperação das plantas (fotografia abaixo). As outras plantas mostram sensibilidade reduzida à GA e sobrevivem à inundação (de Fukao e Bailey-Serres, 2008; cortesia de J. Bailey-Serres).

A redução da sensibilidade à Ga pode impedir perdas na colheita

O gene *Sub1A* está associado à expressão aumentada de *SLR1*, levando à acumulação da proteína DELLA. Plantas transgênicas que superexpressam constitutivamente *Sub1A* ou plantas em que *Sub1A* é altamente induzido em folhas submersas apresentam sensibilidade à GA e não experimentam níveis de crescimento suicidas, em resposta à submersão rápida (Fukao e Bailey-Serres, 2008).

