

UNIDADE XVII – Citocininas: Reguladores da divisão celular

- 1. Introdução**
- 2. Divisão celular e desenvolvimento vegetal**
- 3. Descoberta, identificação e propriedades das citocininas**
- 4. Biossíntese, metabolismo e transporte das citocininas**
- 5. Modos molecular e celular de ação da citocinina**
- 6. As funções biológicas das citocininas**

Introdução

As citocininas foram descobertas durante as pesquisas dos fatores que estimulam as células vegetais a se dividirem (sofrerem citocinese).

Desde a sua descoberta, as citocininas têm apresentado efeitos em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento incluindo:

- a senescência foliar,**
- a mobilização de nutrientes,**
- a dominância apical,**
- a formação e a atividade dos meristemas apicais,**
- o desenvolvimento vascular,**

- a quebra da dormência de gemas e,
- a interação com outros organismos.

As citocininas parecem também mediar muitos aspectos do desenvolvimento regulado pela luz, incluindo:

- a diferenciação dos cloroplastos,
- o desenvolvimento do metabolismo autotrófico e,
- a expansão de folhas e cotilédones.

O controle da divisão celular, processo fundamental no crescimento e desenvolvimento vegetais, é considerado a principal função dessa classe de reguladores de crescimento.

Divisão celular e desenvolvimento vegetal

As células vegetais formam-se a partir de divisões celulares do meristema primário ou do secundário.

As células vegetais recém formadas expandem-se e se diferenciam, mas, uma vez assumida a sua função – transporte, fotossíntese, sustentação, armazenamento ou proteção – em geral, não se dividem novamente durante a sua vida.

Nesse aspecto, elas parecem ser semelhantes às células animais, que são consideradas terminalmente diferenciadas.

Contudo, essa semelhança com o comportamento de células animais é apenas superficial.

Quase todos os tipos de células vegetais que conservam o núcleo na maturidade apresentam a capacidade de se dividirem.

Essa propriedade entra em funcionamento durante certos processos, como a cicatrização de lesões e a abscisão foliar.

As células vegetais diferenciadas podem retomar a divisão

Sob certas circunstâncias, células vegetais maduras e diferenciadas podem retomar a divisão celular na planta intacta:

- Em muitas espécies, células maduras do córtex e/ou do floema retomam a divisão para formar meristemas secundários, como o câmbio vascular ou felogênio.
- A zona de abscisão na base do pecíolo é a região da folha onde as células maduras do parênquima podem se dividir novamente após um período de inativação mitótica, formando uma camada de células com paredes relativamente frágeis, nas quais pode ocorrer a abscisão.

- A lesão de tecidos vegetais induz divisões celulares no local lesionado. A atividade mitótica induzida por lesão é normalmente auto limitante; após poucas divisões, as células derivadas param de se dividir e se rediferenciam.
- Entretanto, quando a bactéria do solo *Agrobacterium tumefaciens* invade uma lesão, ela pode causar neoplasia (formação de tumor), doença conhecida como galha da coroa.
- *Agrobacterium tumefaciens* altera as características das células que se dividem em resposta à lesão, tornando-as semelhantes a um tumor. Elas não param de se dividir; pelo contrário, continuam sua divisão ao longo da vida do vegetal, produzindo uma massa desorganizada semelhante a um tecido tumoral denominada galha.



FIGURA 21.1 Formação de tumor no caule de um tomateiro infectado com a bactéria da galha da coroa, *Agrobacterium tumefaciens*. Dois meses antes de ser feita esta fotografia, o caule foi lesionado e inoculado com uma cepa virulenta da bactéria da galha da coroa (de Aloni et al., 1998, cortesia de R. Aloni).

Fatores difusíveis controlam a divisão celular

As células vegetais maduras param de se dividir porque não recebem mais um determinado sinal, possivelmente hormônio, o qual é necessário para o início da divisão celular.

A ideia de que a divisão celular pode ser iniciada por um fator difusível foi proposta pelo fisiologista vegetal austríaco G. Haberlandt, em 1913.

Ele demonstrou que o tecido vascular possui uma substância ou substâncias hidrossolúveis que estimulam a divisão celular em tecidos lesionados de tubérculo de batata.

O esforço para a determinação da natureza desse fator (ou fatores) levou à descoberta das citocininas na década de 1950.

Os tecidos e os órgãos vegetais podem ser cultivados

A possibilidade de crescerem células, tecidos e órgãos em um simples meio de cultura com nutrientes vem há muito despertando o interesse de biólogos.

Na década de 1930, Philip White demonstrou que raízes de tomateiro poderiam crescer indefinidamente em um simples meio nutritivo, contendo apenas sacarose, sais minerais e algumas vitaminas, sem adição de hormônios.

Ao contrário das raízes, os tecidos caulinares isolados exibem muito pouco crescimento em meio de cultura sem a adição de hormônios.

As partes aéreas da maioria dos vegetais não podem crescer em um meio simples sem hormônios, até que se formem raízes adventícias, mesmo se os tecidos caulinares cultivados contiverem os meristemas apical ou lateral.

Essas observações indicam que existe uma diferença entre a regulação da divisão celular nos meristemas da raiz e da parte aérea.

Sugerem também que algum(ns) fator(es) derivado(s) da raiz pode(m) regular o crescimento da parte aérea.

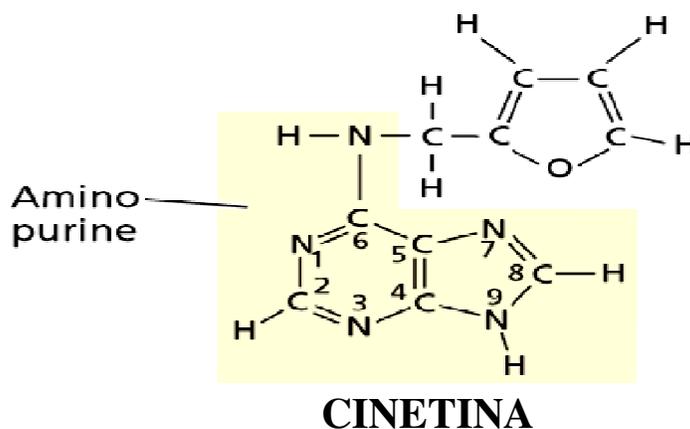
A cinetina foi descoberta como um produto da quebra do DNA

Folke Skoog e col., nas décadas de 1940 e 1950, testaram inúmeras substâncias com capacidade para iniciar e manter a proliferação de células de medula de tabaco em cultura.

Eles observaram que a base adenina do ácido nucleico possuía um pequeno efeito promotor; então, testaram a possibilidade de que ácidos nucleicos estimulariam a divisão celular nesse tecido.

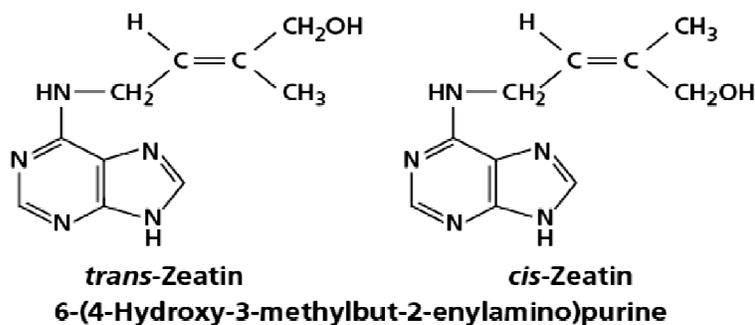
Foi observado que o DNA autoclavado do esperma de arenque apresentava um forte efeito promotor da divisão celular.

Após muito trabalho, Miller e col., em 1955, identificaram no DNA autoclavado uma molécula denominada de cinetina (**6-furfurilaminopurina**), que demonstrou ser um derivado da adenina (**6-aminopurina**).



A zeatina foi a primeira citocinina natural descoberta

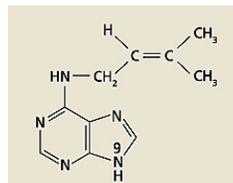
Letham, em 1973, isolou de extratos de endosperma imaturo de milho (*Zea mays*) uma substância que tinha o mesmo efeito biológico da cinetina, e identificou-a como **trans-6-(4-hidroxi-3-metilbut-2-enilamino)purina**, a qual chamou de **zeatina**.



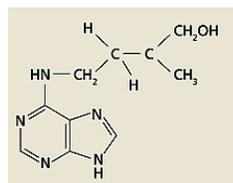
Desde a sua descoberta, a zeatina tem sido encontrada em muitas plantas e bactérias.

Ela é a citocinina predominante nos vegetais superiores, mas outras citocininas naturais têm sido isoladas de muitas espécies vegetais e de bactérias.

Tais citocininas podem estar presentes como ribosídios, ribotídios e glicosídios.

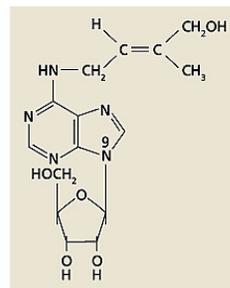


N⁶-(D²-Isopentenil)-adenina

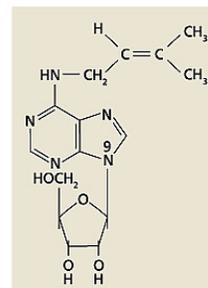


Di-hidrozeatina (TDZ)

FIGURA 21.2 Estruturas de outras aminopurinas que são ativas como citocininas.



Ribosil-zeatina
(zeatina ribosídica)



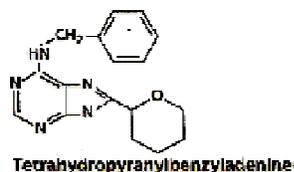
N⁶-(Δ²-isopentenil)adenosina
([9R]iP)

Alguns compostos sintéticos podem imitar a ação da citocinina

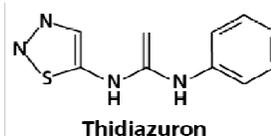
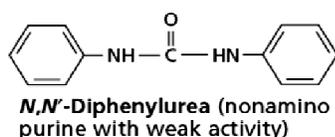
As citocininas são definidas como compostos que possuem atividades biológicas semelhantes àquelas da *trans*-zeatina. Estas atividades incluem:

- A indução da divisão celular em calos na presença de uma auxina;
- Promoção da formação de gemas ou raízes a partir de calos em cultura, quando em razões molares adequadas para auxina;
- Retardo da senescência foliar;
- Promoção da expansão dos cotilédones de dicotiledôneas.

CITOCININAS SINTÉTICAS DE NATUREZA PURÍNICA

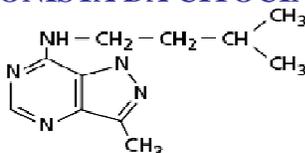


CITOCININAS SINTÉTICAS DERIVADAS DO DIFENILURÉIA



← Usado
comercialmente
como
desfolhante e
herbicida

ANTAGONISTA DA CITOCININA



3-Methyl-7-(3-methylbutylamino)pyrazolo[4,3-D]pyrimidine

As citocininas ocorrem tanto na forma livre quanto na forma ligada.

- ❖ As citocininas, biologicamente ativas, estão presentes como moléculas livres nas plantas e em certas bactérias.
- ❖ As citocininas livres têm sido encontradas em um amplo espectro de angiospermas. Elas foram também encontradas em algas, diatomáceas, musgos, pteridófitas e coníferas.
- ❖ A função reguladora das citocininas tem sido demonstrada nas angiospermas, coníferas e musgos, e é provável que tais hormônios possam agir regulando o crescimento, o desenvolvimento e o metabolismo de todos os vegetais.
- ❖ Em geral, a zeatina é a citocinina livre de ocorrência natural mais abundante, porém a *di-hidrozeatina (DHZ)* e a *isopentenil adenina (iP)* são igualmente encontradas nos vegetais superiores e nas bactérias.



FIGURA 21.3 Vassoura-de-bruxa em Abeto (*Abies* sp.), causada pelo fungo da ferrugem do abeto *Melampsorella caryophyllacearum* (cortesia de Bob Erickson, Natural Resources Canada, Canadian Forest Service).

O aumento de citocinina, produzida pela interação com bactérias, fungos, vírus ou insetos, pode causar um aumento na proliferação do meristema apical da parte aérea e/ou o crescimento das gemas laterais. Essa proliferação, conhecida como fasciação, se manifesta como um fenômeno chamado vassoura-de-bruxa.



Biossíntese, metabolismo e transporte das citocininas

As cadeias laterais das moléculas naturais de citocininas são quimicamente relacionadas à borracha, aos carotenoides, aos hormônios giberelina e ácido abscísico e a alguns compostos de defesa vegetal conhecidos como fitoalexinas.

Todos são constituídos, pelo menos em parte, por unidades de isopreno.

As células da galha da coroa recebem um gene para a síntese de citocinina

T-DNA

- 2 genes p/ auxina;
- 1 gene p/ citocinina (IPT);
- 1 gene p/ opina (compostos nitrogenados).

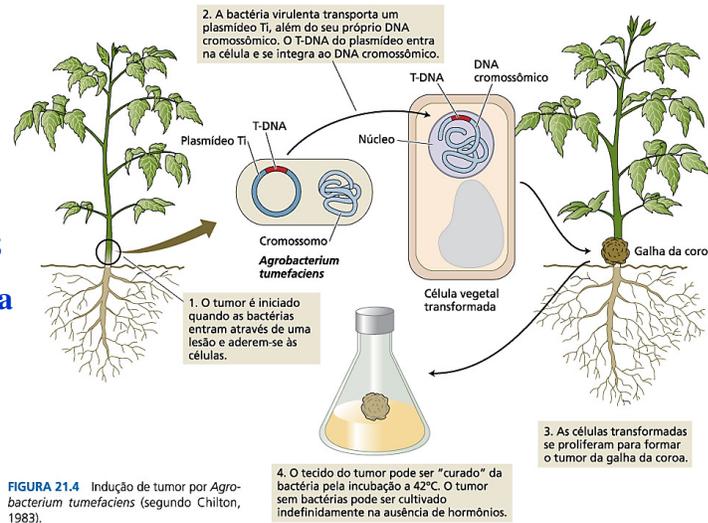
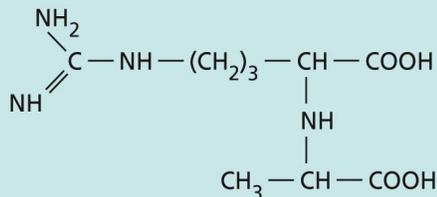
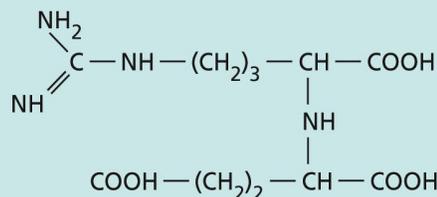


FIGURA 21.4 Indução de tumor por *Agrobacterium tumefaciens* (segundo Chilton, 1983).



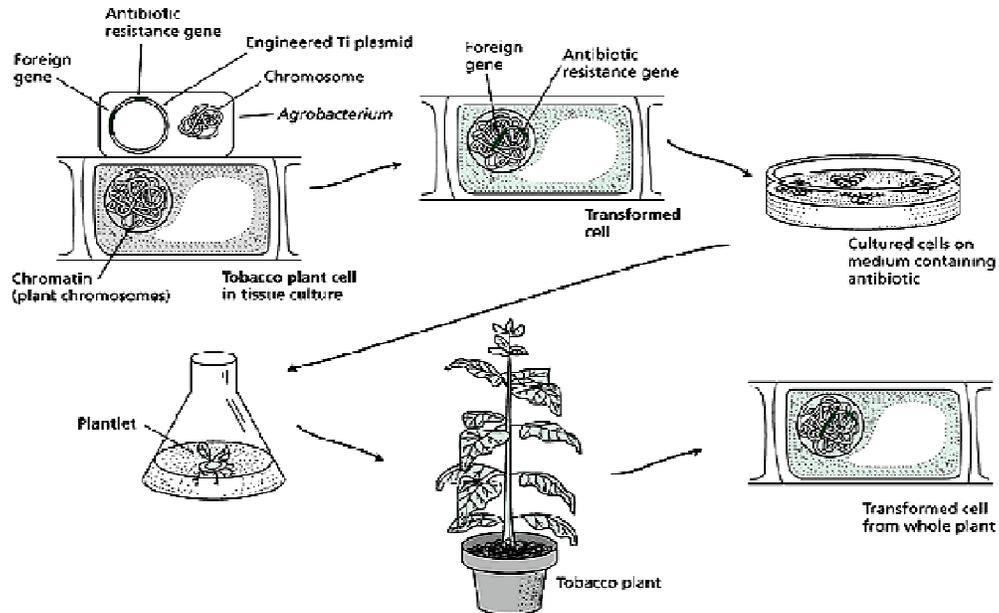
Octopine



Nopaline

Web Figure 21.6.A The two major opines, octopine and nopaline, are found only in crown gall tumors. The genes required for their synthesis are present in the T-DNA from *Agrobacterium tumefaciens*. The bacterium, but not the plant, can utilize the opines as a nitrogen source.

O plasmídio Ti e a engenharia genética em plantas



A IPT (isopentenil transferase) catalisa a primeira etapa da biossíntese da citocinina.

A biossíntese da citocinina nas plantas ocorre principalmente nos plastídios e utilizam dimetilalil difosfato (DMAPP) como origem da cadeia lateral.

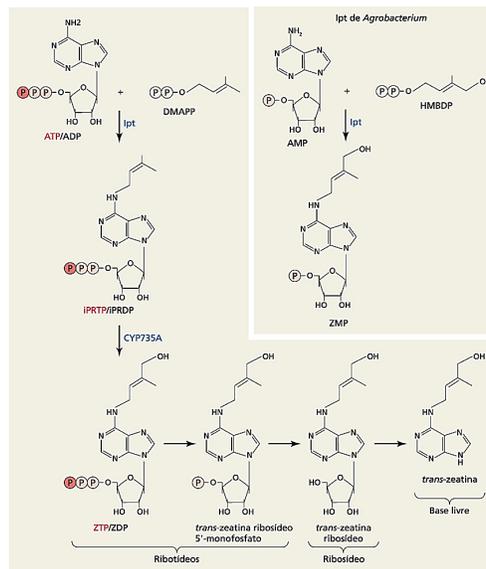


FIGURA 21.5 Rota biossintética simplificada da síntese de citocinina. A primeira etapa comprometida na biossíntese da citocinina é a adição da cadeia lateral de isopentenil do DMAPP (dimetilalil difosfato) a um grupo funcional da adenosina (ATP ou ADP). Os produtos destas reações (IPRTP ou IPBDP) são convertidos a zeatina (ZTP ou ZDP) por um citocromo P450 monooxigenase (CYP735A). As citocininas di-hidrozeatina (DHZ) são produzidas a partir de várias formas da *trans*-zeatina por uma enzima desconhecida (não apresentada). As formas ribotídico e ribosídico da *trans*-zeatina podem ser interconvertidas e a *trans*-zeatina livre pode ser formada a partir do ribosídeo por enzimas do metabolismo geral da purina. Detalhe: O detalhe apresenta a rota para a biossíntese da citocinina via *ipt* de *Agrobacterium*. As enzimas *ipt* do vegetal e da bactéria diferem no substrato adenosina utilizado e no doador da cadeia lateral; a enzima vegetal parece utilizar tanto o ADP quanto o ATP para ligar este ao DMAPP; enquanto a enzima bacteriana usa o AMP para ligar ao HMBDP (1-Hidroxil-2-metil-2-(3-butenil) 4-difosfato). Observe que o produto da reação da *ipt* de *Agrobacterium* é uma zeatina ribotídico.

Características das citocininas

- ❖ Os locais de síntese de citocininas são os meristemas das raízes (principal), embrião de sementes em desenvolvimento, folhas e frutos jovens;
- ❖ O movimento de citocininas sintetizadas nas raízes ocorre pelo xilema (ribosídeo da *trans*-zeatina), mas ocorre também pelo floema (*iP* e ribosídios da *cis*-zeatina).
- ❖ As citocininas podem agir sinalizando tanto a longas distâncias quanto localmente.
- ❖ As citocininas são necessárias tanto para a iniciação das iniciais vasculares quanto para a formação dos meristemas laterais no câmbio.

As citocininas são rapidamente metabolizadas nos tecidos vegetais

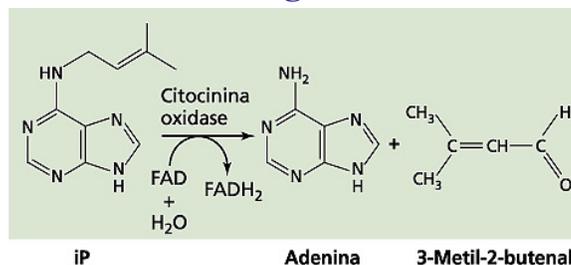


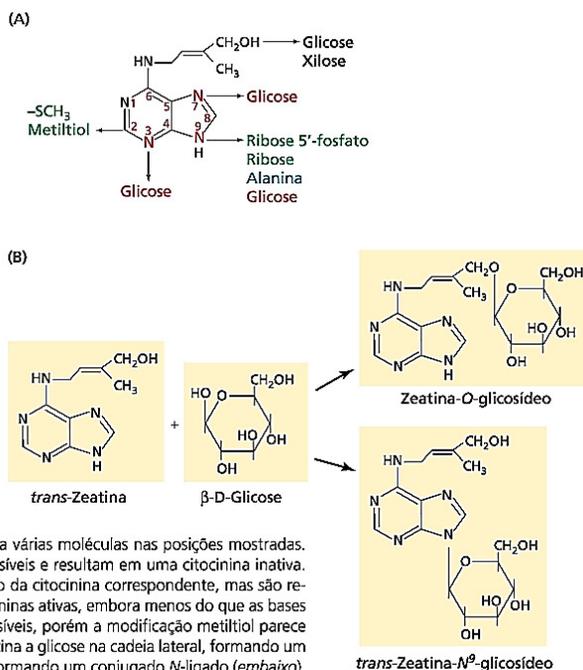
FIGURA A3.6 A citocinina oxidase degrada irreversivelmente algumas citocininas.

Muitos tecidos vegetais possuem a enzima oxidase da citocinina, a qual cliva a cadeia lateral da zeatina, da zeatina ribosídeo, *iP* e de seus N-glicosídios. **Entretanto, a di-hidrozeatina e seus conjugados, bem como citocininas aromáticas como a benziladenina, são resistentes à clivagem.** A oxidase da citocinina inativa irreversivelmente as citocininas, sendo importante na regulação e na limitação dos efeitos da citocinina.

Os níveis de citocinina podem também estar conjugados em várias posições.

- Os nitrogênios nas posições 3, 7 e 9 do anel da adenina da citocinina podem ser conjugados a resíduos de glicose (*N*-conjugados).
- A alanina pode estar conjugada ao nitrogênio da posição 9, formando o ácido lupínico.
- O grupo hidroxila da cadeia lateral das citocininas é também alvo da conjugação a resíduos de glicose ou de xilose, produzindo *O*-glicosídeo e *O*-xilósídeo.

Os níveis de citocinina podem também estar conjugados em várias posições.



Tanto a citocinina conjugada *N*- quanto a *O*- são funcionais somente se a conjugação for removida.

As conjugações *N* são geralmente irreversíveis, e essas formas conjugadas de citocinina são inativas em bioensaios.

As conjugações *O* da cadeia lateral podem ser removidas por glicosidases, produzindo citocininas livres.

As citocininas glicosídios podem ser uma forma de armazenamento desses compostos.

O nível de citocinina ativa em uma célula em particular é o somatório da biossíntese de novo, desconjugação e transporte para o interior da célula, subtraindo-se a conjugação, a degradação e o transporte para o exterior desta célula.



Modos molecular e celular de ação da citocinina

A diversidade dos efeitos das citocininas no crescimento e desenvolvimento em plantas é consistente com o envolvimento de rotas de transdução de sinal, com ramificações que levam a respostas específicas.

A percepção e a sinalização da citocinina são mediados por um sistema de dois componentes, uma rota de resposta similar aquelas utilizadas por bactérias para perceber e responder às mudanças ambientais.

Foi identificado o receptor de citocinina semelhante aos receptores bacterianos de dois componentes

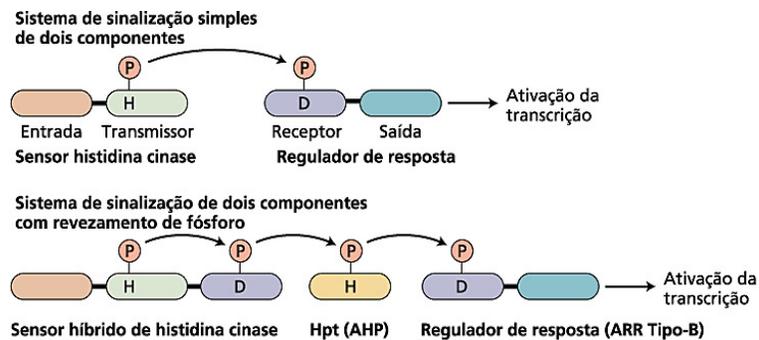


FIGURA 21.6 Sistema de sinalização simples de dois componentes *versus* o sistema de sinalização de dois componentes com revezamento de fósforo. (A) No sistema simples de dois componentes, o domínio de entrada (*input*) é o sítio onde o sinal é percebido. Este domínio regula a atividade do domínio da histidina cinase, e, quando ativado, autofosforila um resíduo conservado de histidina. O fosfato é, então, transferido para o resíduo aspartato, que está localizado no domínio receptor de um regulador de resposta. A

fosforilação deste aspartato regula a atividade do domínio de saída (*output*) do regulador de resposta, o qual, em muitos casos, é um fator de transcrição. (B) No tipo de sistema de sinalização de dois componentes com revezamento de fósforo, uma posição extra de transferência de fósforo é mediada por uma proteína histidina de transferência de fósforo (Hpt), denominadas de AHPs em *Arabidopsis*. Os reguladores de resposta em *Arabidopsis* são denominados de ARR. H, histidina; D, aspartato.

A citocinina liga-se com alta afinidade ao domínio extracelular CHASE (Cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular) de seus receptores (CRE1, AHK2 e AHK3). Esses receptores apresentam afinidades distintas para diferentes tipos de citocininas, sugerindo que diferentes citocininas podem ter sinalizações exclusivas e, portanto, distintas funções nos vegetais.

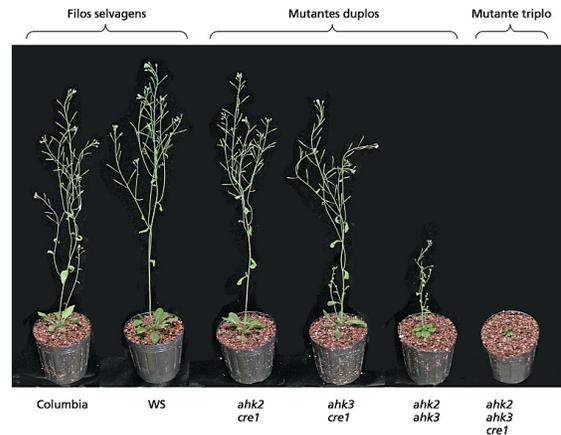


FIGURA 21.7 Fenótipos de indivíduo, de *Arabidopsis* com mutações em dois ou em todos os três receptores de citocinina (*cre1*, *ahk2* e *ahk3*). Os ecotipos parentais selvagens estão apresentados à esquerda (Columbia e WS) (Nishimura et al., 2004).

As citocininas aumentam a expressão dos genes reguladores de resposta tipo-A por meio da ativação dos genes ARR tipo-B

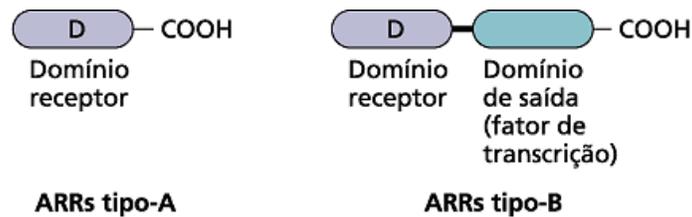


FIGURA 21.8 Comparação da estrutura de ARRs, tipo-A e tipo-B. As ARRs tipo-A possuem um único aspartato (D) presente no domínio receptor. Contudo, as proteínas tipo-B possuem também um domínio de saída (*output*) unido ao grupo carboxi-terminal.

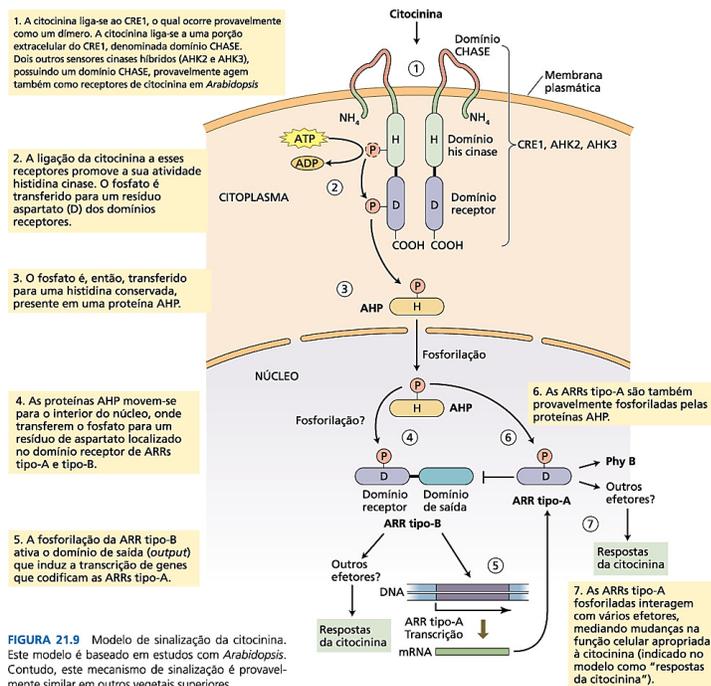
A expressão de uma ampla diversidade de outros genes é alterada em resposta à citocinina, incluindo o gene que codifica a redutase do nitrato, genes regulados pela luz, como o *LHCB* e o *SSU*, genes relacionados com a defesa, como o *PR1*, e genes que codificam rRNAs, citocromos P450, peroxidases, extensina (proteína da parede celular rica em hidroxiprolina) e vários fatores de transcrição.

A citocinina eleva a expressão desses genes, pelo aumento da taxa de transcrição (como no caso dos ARRs tipo-A) e/ou pela estabilização do RNA transcrito.

Modelo de sinalização da citocinina.

A indução da fosforilação pela citocinina ativa fatores de transcrição

Domínio extracelular CHASE (Cyclase/histidine kinase-associated sensing extracellular).



Funções biológicas das citocininas

Embora tenham sido descobertas como fatores da divisão celular, as citocininas podem estimular ou inibir vários processos fisiológicos, metabólicos, bioquímicos e de desenvolvimento quando aplicados às plantas superiores.

Tornando evidente que as citocininas endógenas exercem importante função na regulação destes eventos.

Veremos alguns efeitos das citocininas no crescimento e desenvolvimento vegetal:

As plantas com superprodução de citocininas exibem várias características que indicam o seu papel na fisiologia e no desenvolvimento vegetal.

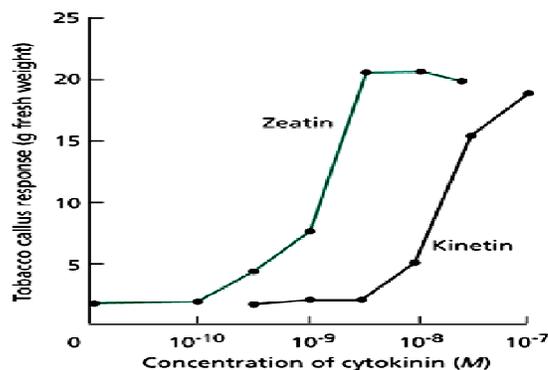
- **Os meristemas apicais das partes aéreas apresentam mais folhas;**
- **As folhas possuem altos níveis de clorofila e são muito mais verdes;**
- **As partes aéreas adventícias podem ser formadas a partir das nervuras foliares e pecíolos não lesionados;**
- **A senescência foliar é retardada;**
- **A dominância apical é muito reduzida;**
- **As plantas são atrofiadas, com entrenós muito curtos;**
- **O enraizamento de estacas caulinares é reduzido, assim como a taxa de crescimento da raiz.**

As citocininas promovem o crescimento da parte aérea pelo aumento da proliferação celular no meristema apical do caule

As citocininas são, em geral, necessárias para a divisão das células vegetais *in vitro*. →

Várias evidências sugerem que as citocininas também exercem funções chave na regulação da divisão celular *in vivo*.

A grande parte das divisões celulares em uma planta adulta ocorre nos meristemas. →



Tobacco tissues depend on cytokinin for their growth in culture. Cultured tobacco callus was transferred to fresh medium that contained an auxin and either zeatin or kinetin at the indicated concentrations. The tissues were weighed after growing for 1 month on the various media. The results show that zeatin is more effective than kinetin in supporting tobacco tissue growth. The maximum response was obtained with 5×10^{-8} M zeatin, and higher zeatin concentrations either did not stimulate additional growth or were slightly inhibitory. The kinetin concentration had to be at least tenfold higher to achieve the same growth stimulation. (From Leonard *et al.* 1968.) ←



FIGURA 21.10 Plantas de tabaco superexpressando genes para citocinina oxidase. A planta da esquerda é o tipo selvagem. Cada planta à direita está superexpressando um dos dois diferentes genes da citocinina oxidase: *AtCKX1* e *AtCKX2* de *Arabidopsis*. O crescimento da parte aérea é fortemente inibido nas plantas transgênicas (de Werner et al., 2001).

A superexpressão de genes da oxidase da citocinina, de *Arabidopsis* em fumo, causa uma redução nos níveis da citocinina endógena e, conseqüentemente, um grande retardo do desenvolvimento, devido à redução na taxa de proliferação celular no meristema apical da parte aérea.

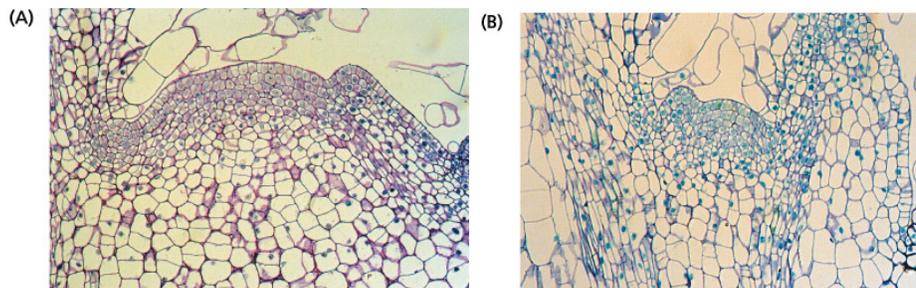


FIGURA 21.11 A citocinina é necessária para o crescimento normal do meristema apical da parte aérea. (A) Secção longitudinal do meristema apical do caule de uma planta de tabaco selvagem. (B) Secção longitudinal do meristema apical do caule de uma planta de tabaco transgênica superexpressando um gene que codifica a citocinina oxidase (*AtCKX1*). Observe a redução no tamanho do meristema apical da planta com deficiência de citocinina (de Werner et al., 2001).

A perda da percepção de citocinina (isto é, um mutante **triplo-receptivo**) também resulta em uma diminuição no tamanho do meristema apical do caule, levando a uma redução no crescimento da parte aérea e a pouca ou nenhuma produção de flores.

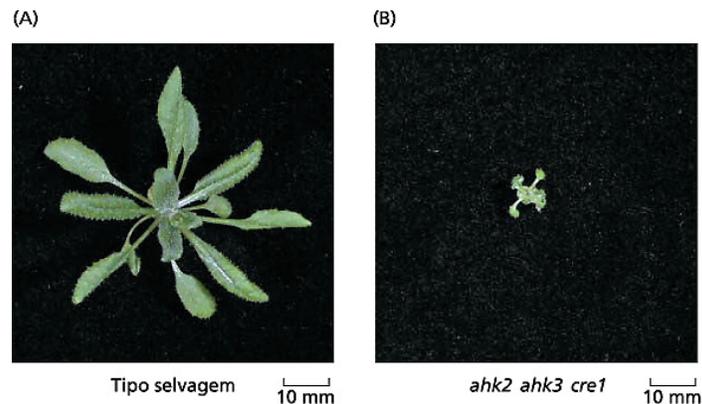


FIGURA 21.12 Comparação das rosetas de *Arabidopsis* do tipo selvagem e o mutante triplo-receptor nocaute de citocinina, *ahk2 ahk3 cre1* (de Nishimura et al., 2004).

Por outro lado, a inativação de certos reguladores negativos de sinalização de citocinina (tais como os ARR tipo A) resulta em um *aumento* no tamanho do meristema apical do caule de milho (Giulini et al., 2004).

Lembrem-se que a inativação de um regulador negativo teria efeito estimulador da sinalização de citocinina.

Juntas, essas descobertas apoiam a noção de que as citocininas endógenas regulam positivamente a divisão celular *in vivo* do meristema apical.

Da mesma forma, as citocininas promovem a proliferação celular dos meristemas laterais, conhecidos como câmbio vascular.

De modo surpreendente, a mesma superexpressão da oxidase da citocinina em fumo leva a uma intensificação do crescimento radicular, sobretudo pelo aumento do tamanho do meristema apical da raiz.

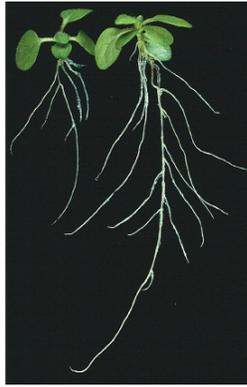


FIGURA 21.13 A citocinina suprime o crescimento de raízes. As raízes superexpressando *AtCKX1* (à direita), deficientes em citocinina, são maiores que aquelas das plantas de tabaco selvagem (à esquerda) (de Werner et al., 2001).

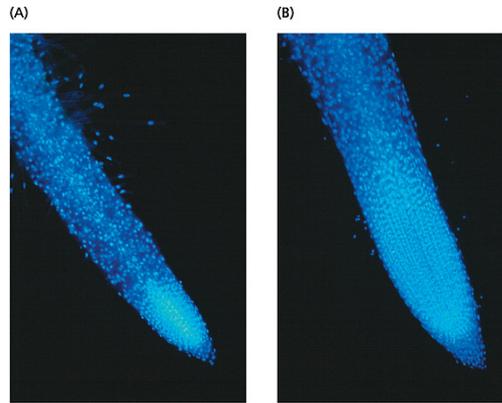


FIGURA 21.14 A citocinina inibe o crescimento e a atividade de divisão celular das raízes. (A) Tipo selvagem. (B) Planta superexpressando *AtCKX1*. Essas raízes foram coradas com corante fluorescente 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que cora o DNA do núcleo (de Werner et al., 2001).

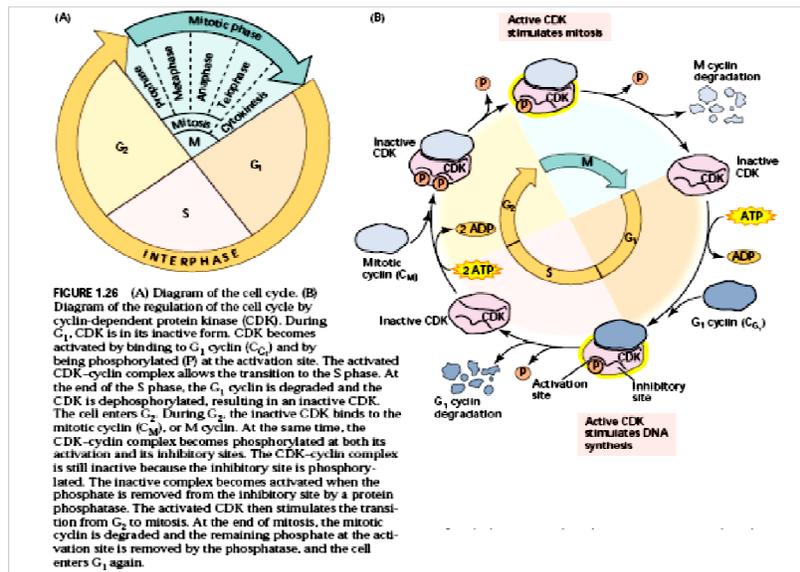
As citocininas regulam componentes específicos do ciclo celular

As citocininas regulam a divisão celular agindo nos controles que governam a passagem da célula pelo ciclo de divisão celular.

Os níveis de zeatina apresentam picos, em culturas sincronizadas de células de tabaco, no final da fase S, na transição da fase G₂/M e no final de G₁.

A inibição da biossíntese da citocinina bloqueia a divisão celular, e a aplicação de citocinina exógena permite que a divisão celular prossiga.

As citocininas foram descobertas devido à sua capacidade para estimular a divisão celular em tecidos supridos com um nível adequado de auxina.



Auxina expressa CDK (forma inativa, Cdc2) → CDK- C_{G1} ou C_M (forma ativada)
 Citocinina expressa ou ativa as ciclinas →

As citocininas aumentam a expressão do gene *CYCD3*, que codifica a *ciclina tipo-D*.

A citocinina também está vinculada à ativação de uma fosfatase, *Cdc25*, cujo papel é remover um grupo fosfato inibidor da quinase *Cdc2*.

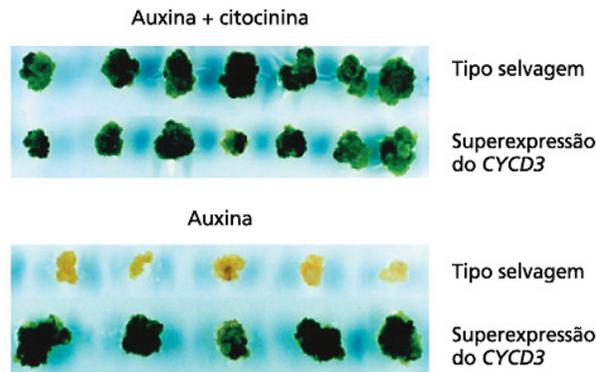


FIGURA 21.15 Células de calos expressando o gene *CYCD3* podem se dividir na ausência de citocinina. Os explantes foliares de plantas transgênicas de *Arabidopsis*, que expressam o gene *CYCD3* sob o promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor, foram induzidos a formar calos pelo cultivo na presença de auxina e de citocinina ou somente de auxina. Os calos controle, tipo selvagem, requereram citocinina para crescerem. Os calos expressando *CYCD3* cresceram em um meio contendo somente auxina. As fotografias foram tiradas após 29 dias (de Riou-Khamlichi et al., 1999).

A razão auxina:citocinina regula a morfogênese de tecidos em cultura

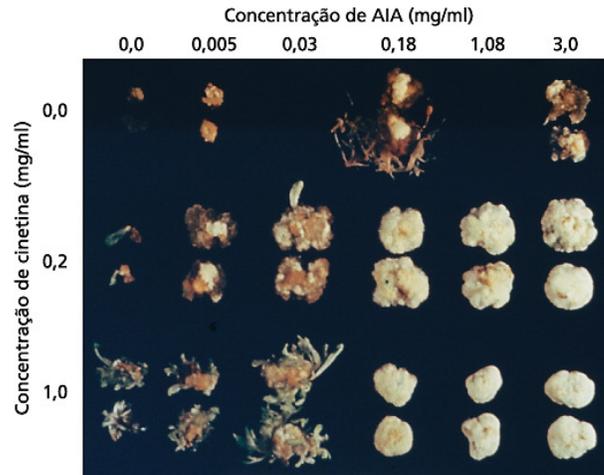


FIGURA 21.16 A regulação do crescimento e da formação de órgãos em calos de tabaco cultivados em diferentes concentrações de auxina e de cinetina. Em concentrações baixas de auxina e altas de cinetina (à esquerda abaixo), ocorre a formação de gemas. Em concentrações altas de auxina e baixas de cinetina (à direita superior), ocorre a formação de raízes. Em concentrações intermediárias ou altas de ambos os hormônios (meio e à direita abaixo), há o desenvolvimento de calos indiferenciados (cortesia de Donald Armstrong).

O efeito da razão auxina:citocinina na morfogênese também pode ser observado nos tumores da galha da coroa

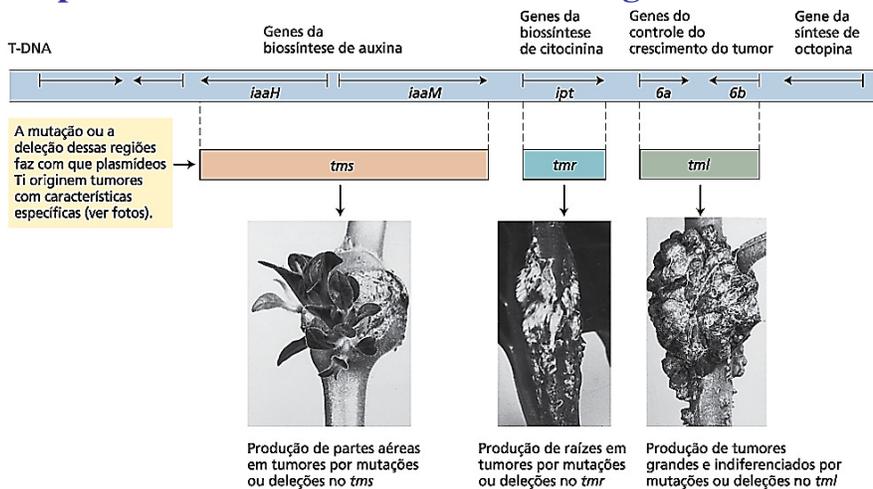


FIGURA 21.17 Mapa do T-DNA do plasmídeo Ti de *Agrobacterium* mostrando os efeitos de mutações no T-DNA na morfologia dos tumores da galha da coroa. Os genes *iaaH* e *iaaM* codificam duas enzimas envolvidas na biossíntese de auxina; o gene *ipt* codifica uma

enzima na biossíntese de citocinina, e *6b* codifica um regulador transcricional que controla o crescimento do tumor. As mutações nesses genes produzem os fenótipos ilustrados (de Morris, 1986, cortesia de R. Morris).

As citocininas modificam a dominância apical e promovem o crescimento de gemas laterais.

Um dos principais determinantes da forma vegetal é o grau de dominância apical.

O padrão de formação dos ramos é normalmente determinado pela luz, nutrientes e genótipo.

Fisiologicamente, a formação de ramos é regulada por uma complexa interação de hormônio, incluindo auxina, citonina e um sinal recentemente identificado (strigolactona, novo hormônio) proveniente da raiz.

Embora a dominância apical possa ser determinada pela auxina, transportada de forma polar, estudos indicam que as citocininas desempenham um papel no crescimento inicial das gemas laterais.

Por exemplo, aplicações diretas de citocininas em gemas axilares de muitas espécies estimulam a divisão celular e o brotamento dessas gemas.

Os mutantes que superexpressam citocinina podem ser densamente ramificados.

Foi descoberto que a auxina inibe um subconjunto de genes IPT na região nodal de caules de ervilha, bem como elevam a expressão da oxidase da citocinina, a qual degrada citoninas.

Evidências recentes sugerem que um novo hormônio (estrigolactona) derivado das raízes age, assim como a auxina proveniente do meristema apical, como um *repressor* do crescimento da gema axilar.

Assim, a dormência das gemas axilares pode ser regulada pela ação dupla, a longa distância, de sinais negativos provenientes tanto da parte aérea quanto do meristema do ápice da raiz.

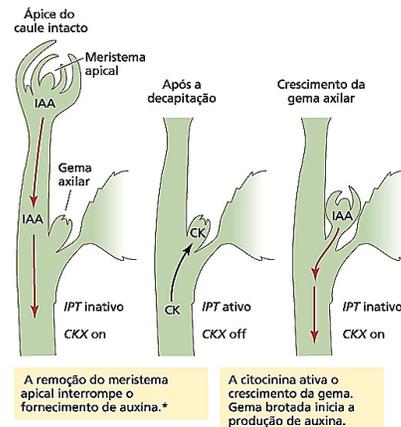


FIGURA 21.18 Interação da auxina e da citocinina na regulação do brotamento de gemas. Em uma planta onde o ápice da parte aérea está intacto (esquerda), a auxina (IAA) produzida no ápice inibe os níveis de citocinina na gema apical através da inibição da expressão do gene *IPT* (biossíntese de citocinina) e da promoção da expressão da citocinina oxidase (*CKX*), impedindo o crescimento da gema. A remoção do ápice da parte aérea (figura central) elimina o fluxo de auxina, resultando na elevação da expressão do *IPT* e na diminuição da expressão de *CKX*. Isto faz com que os níveis das citocininas nas gemas apicais sejam aumentados, promovendo o seu crescimento. Após as gemas terem crescido por um período (direita), elas iniciam a síntese e a exportação de sua própria auxina. O *IPT* é novamente inibido e o *CKX* é aumentado, resultando novamente na diminuição dos níveis de citocininas (adaptado de Shimizu-Sato et al. 2008). * N. de R.T.: Os genes *IPT* são ativados e os genes *CKX* (citocinina oxidase) são desativados. A citocinina se move para a gema adjacente.

As citocininas retardam a senescência foliar

As folhas destacadas de uma planta perdem lentamente a clorofila o RNA, os lípidios e as proteínas, mesmo se elas forem mantidas úmidas e supridas de minerais. Tal processo de envelhecimento programado, que leva à morte do vegetal, é denominado senescência.

A senescência foliar é mais rápida no escuro que na luz. O tratamento de folhas isoladas com citocininas retarda a senescência em muitas espécies.

FIGURA 21.19 A senescência foliar é retardada em uma planta transgênica de tabaco contendo o gene *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens*, para a biossíntese de citocinina, fusionado a um promotor induzido por senescência. O gene *ipt* é expresso em resposta aos sinais que induzem a senescência (de Gan e Amasino, 1995, cortesia de R. Amasino).



As plantas que expressam o gene *ipt* permanecem verdes e fotossintetizantes

Planta-controle de idade semelhante em avançada senescência

As citocininas promovem a mobilização de nutrientes (aumenta a força do dreno)

Na plântula A, o cotilédono esquerdo, controle, foi aspergido com água. O cotilédono esquerdo da plântula B e o cotilédono direito da plântula C foram aspergidos cada um com uma solução contendo 50 mM de cinetina.

O pontilhado preto representa a distribuição do aminoácido radioativo, conforme revelado pela autorradiografia.

Os resultados mostram que os cotilédones tratados com citocinina tornaram-se drenos de nutrientes. Contudo, a radioatividade é retida no cotilédono no qual o aminoácido foi aplicado, quando o cotilédono marcado é tratado com citocinina (plântula C).

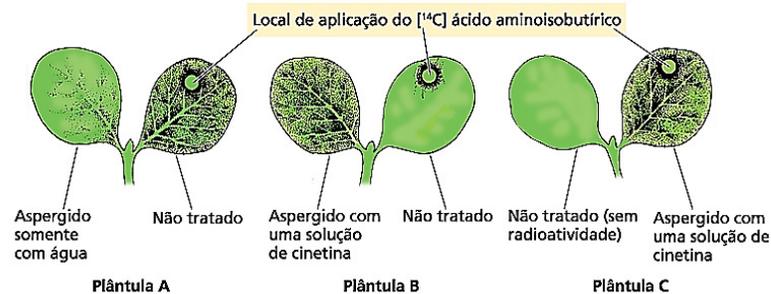


FIGURA 21.20 Efeito da citocinina no movimento de aminoácidos em plântulas de pepino. Utilizou-se um aminoácido não metabolizável marcado radioativamente, como o ácido aminoisobutírico, aplicado em um pequeno ponto no cotilédono direito de cada uma das plântulas. A cor preta indica a distribuição da radioatividade. (Retirado de dados obtidos por K. Mothes.)

A condição nutricional da planta regula os níveis de citocinina, e, por sua vez, a razão relativa entre citocinina e auxina, determinam a taxa de crescimento relativo de raízes e partes aéreas: Altas concentrações de citocinina promovem o crescimento da parte aérea, e, de modo oposto, níveis altos de auxina promovem o crescimento da raiz.

Em baixos níveis nutricionais, os teores de citocinina são também reduzidos, resultando em um aumento no crescimento da raiz, permitindo que a planta adquira de forma mais eficiente os nutrientes presentes no solo.

Em comparação, solos com ótimas condições nutricionais promovem o aumento nos níveis de citocinina, favorecendo o crescimento da parte aérea e, assim, maximizando a capacidade fotossintética.

As citocininas agem na sinalização da luz por meio do fitocromo

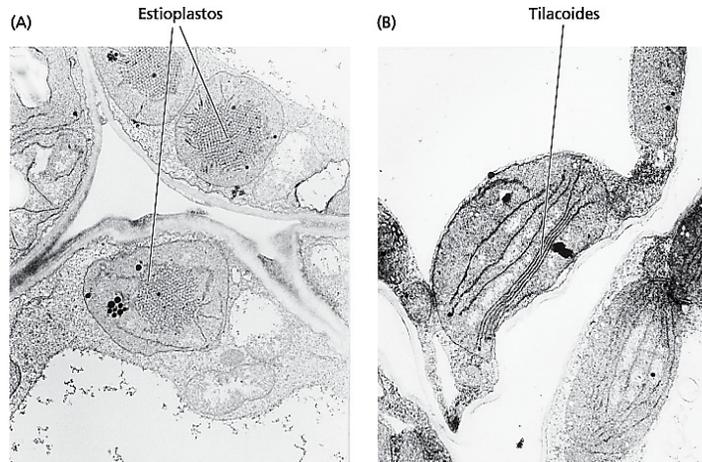
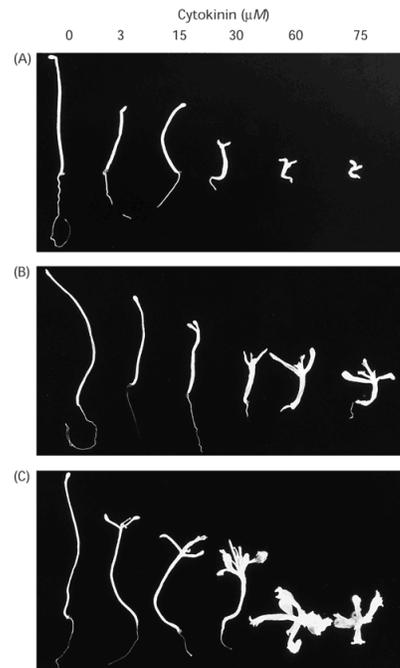


FIGURA 21.21 A citocinina influencia o desenvolvimento de cloroplastos de plântulas tipo selvagem de *Arabidopsis* que crescem no escuro. (A) Os plastídeos desenvolvem-se como etioplastos na planta-controle que cresce no escuro. (B) O tratamento com citocinina resultou na formação dos tilacóides nos plastídeos de plântulas que crescem no escuro (de Chory et al., 1994, cortesia de J. Chory).

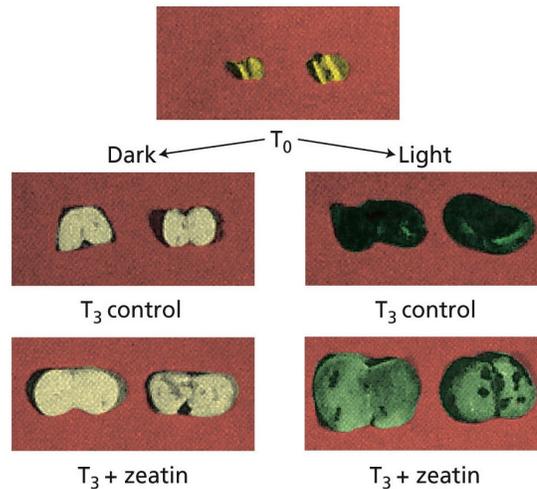
Tal resultado sugere que as citocininas - junto com outros fatores, como luz (fitocromo), nutrição e desenvolvimento – regulam a síntese dos pigmentos e proteínas fotossintéticas.

Reversão do estiolamento de plântulas no escuro pela aplicação de citocinina



Web Figure 21.10.A The effects of cytokinin on the development of wild-type *Arabidopsis* seedlings grown in darkness. (A–C) The appearance of the seedlings after 1, 2, and 3 weeks, respectively, of growth in the dark with increasing concentrations of cytokinin. The control (no cytokinin) is on the left in each case. The next five seedlings were treated with 3, 15, 30, 60, and 75 μM of cytokinin, respectively. As the cytokinin concentration was increased, the inhibition of hypocotyl elongation became more pronounced, while the cotyledons expanded somewhat and leaves were initiated from the shoot apical meristem. (From Chory et al. 1994, courtesy of J. Chory, © American Society of Plant Physiologists, reprinted with permission.)

As citocininas promovem a expansão celular em folhas e cotilédones (rabanete)



Web Figure 21.11.A The effect of cytokinin on the expansion of radish cotyledons. The experiment described here shows that the effects of light and cytokinin are additive. T_0 represents germinating radish seedlings before the experiment began. The detached cotyledons were incubated for 3 days (T_3) in either darkness or light with or without 2.5 mM zeatin. In both the light and the dark, zeatin-treated cotyledons expanded more than in the control. (From Huff and Ross 1975.)

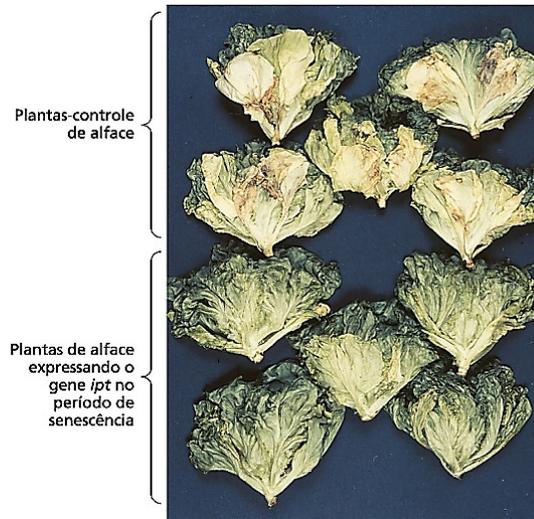
Um mediador-chave de muitas respostas a luz é o fitocromo fotorreceptor de luz vermelha. Foi descoberto que o regulador de resposta ARR4 tipo A estabiliza a forma ativa Pfr de um fitocromo, PhyB, pela redução da taxa de reversão. Assim, o ARR4 age como um regulador positivo da função do PhyB.

Outro ponto de convergência entre a sinalização da luz e citocinina ocorre via a proteína HY5 (fator de transcrição). A HY5 é um regulador positivo da fotomorfogênese, agindo a jusante de múltiplas famílias de fotorreceptores, incluindo fitocromos e criptocromos. A citocinina aumenta a abundância da proteína HY5 pelo aumento de sua estabilidade.

A manipulação das citocininas para alterar importantes características agrícolas

FIGURA 21.22 A senescência foliar é retardada em plantas transgênicas de alface expressando o gene *ipt* para a biossíntese de citocinina no período de senescência. Plantas-controle (cinco superiores) não transgênicas; plantas *SAG12::IPT* (cinco inferiores) utilizam um "gene promotor associado à senescência" (*SAG12*), para dirigir a expressão do *ipt* no início da senescência (de McCabe et al., 2001).

Induzindo um atraso na senescência foliar pela superprodução de citocinina, seria possível estender a produtividade fotossintética de plantas.



A manipulação da citocinina também tem o potencial de aumentar a produtividade de grãos de arroz.

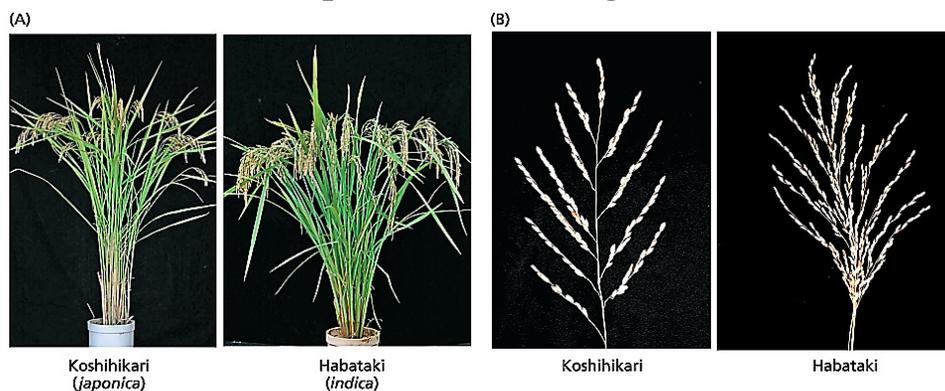


FIGURA 21.23 Citocininas regulam a produção de grãos em arroz. O número de grãos na variedade de arroz *indica* é maior do que na variedade *japonica* devido à falha em um gene da citocinina oxidase. (A) Plantas completas de Koshihikari (uma linhagem *japonica*) e Habataki (uma linhagem *indica*). (B) Detalhes das in-

florescências de cada variedade. Os níveis de citocinina oxidase na variedade *indica* são menores devido à ocorrência de uma mutação natural que leva ao aumento da citocinina nas panículas em desenvolvimento. Isto resulta em mais flores e uma maior produção de grãos.