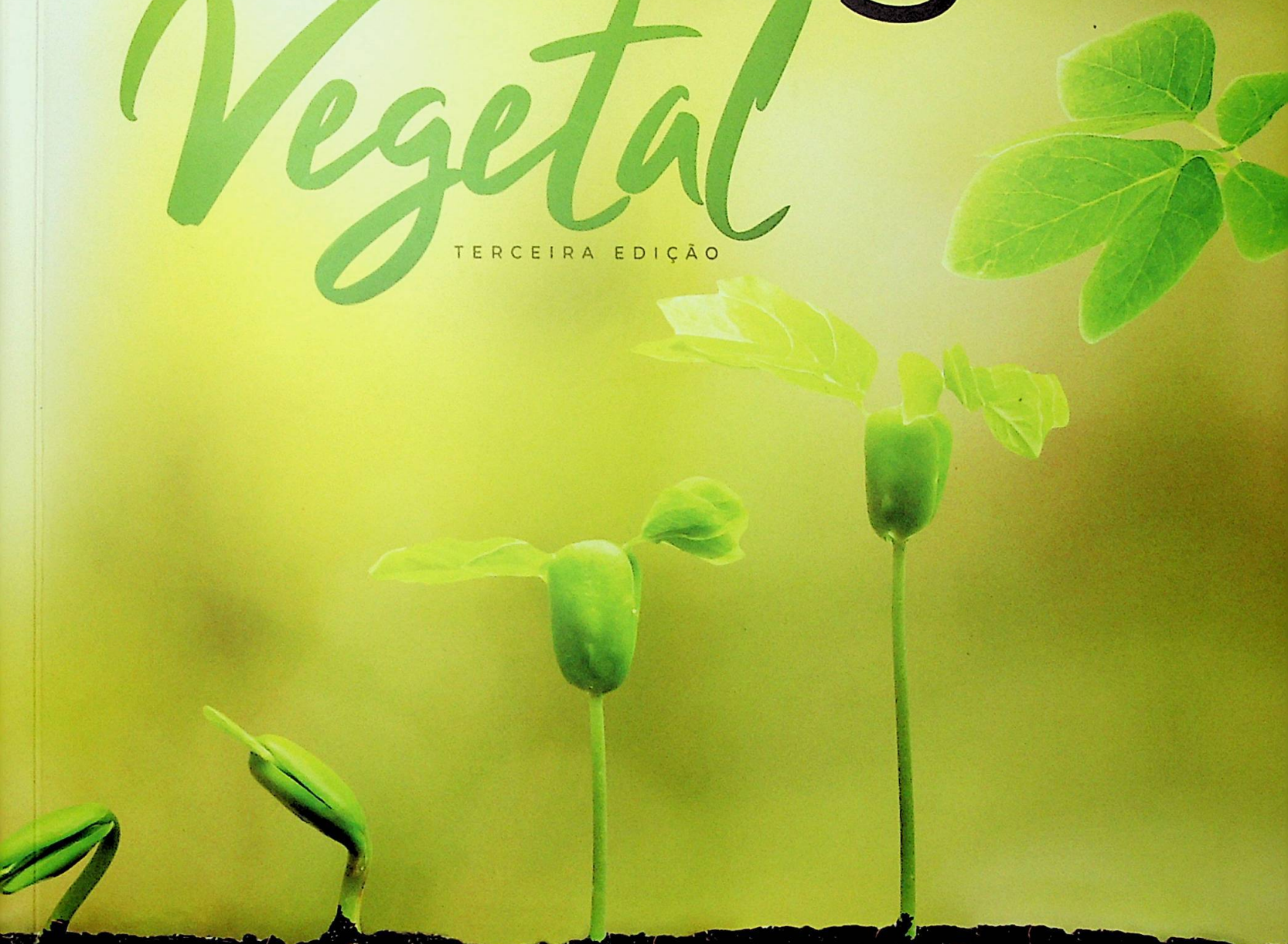


GILBERTO BARBANTE KERBAUY

# Fisiologia *Vegetal*

TERCEIRA EDIÇÃO



GUANABARA  
KOOGAN

## ATENÇÃO

Devido à pandemia em que o país se encontra e seguindo Diretrizes adotadas pela Universidade de São Paulo, as Bibliotecas da USP estão fechadas por tempo indeterminado, não sendo possível a utilização dos exemplares físicos disponíveis no acervo da Biblioteca do IB/USP.

Para atender demandas específicas e não prejudicar as atividades em sala de aula, este material foi digitalizado com autorização do autor da obra, para uso exclusivamente na disciplina “Forma e Função do Desenvolvimento Vegetal”.

De acordo com a lei de Direitos Autorais (Lei 9.610, de 1998), não é permitida a reprodução deste material.

Serviço de Biblioteca do IB/USP

Julho, 2020



# Citocininas

Lázaro E. P. Peres • Gilberto B. Kerbauy

## Introdução

Nenhuma outra classe hormonal parece estar tão de perto ligada à biotecnologia de plantas como a das citocininas (Ck). Processos biotecnológicos como a rápida obtenção de plantas homocigotas a partir da produção de haploides *in vitro*, a obtenção de híbridos entre espécies incompatíveis por meio da fusão de protoplastos e a própria produção de plantas transgênicas têm em comum a necessidade de controlar a divisão e a diferenciação celular *in vitro*, processos estes dependentes do emprego de citocininas. Certamente, para a maioria da população, o lado mais visível da biotecnologia vegetal é representado pela clonagem *in vitro* e seus produtos gerados, os assim denominados “plantas de proveta”.

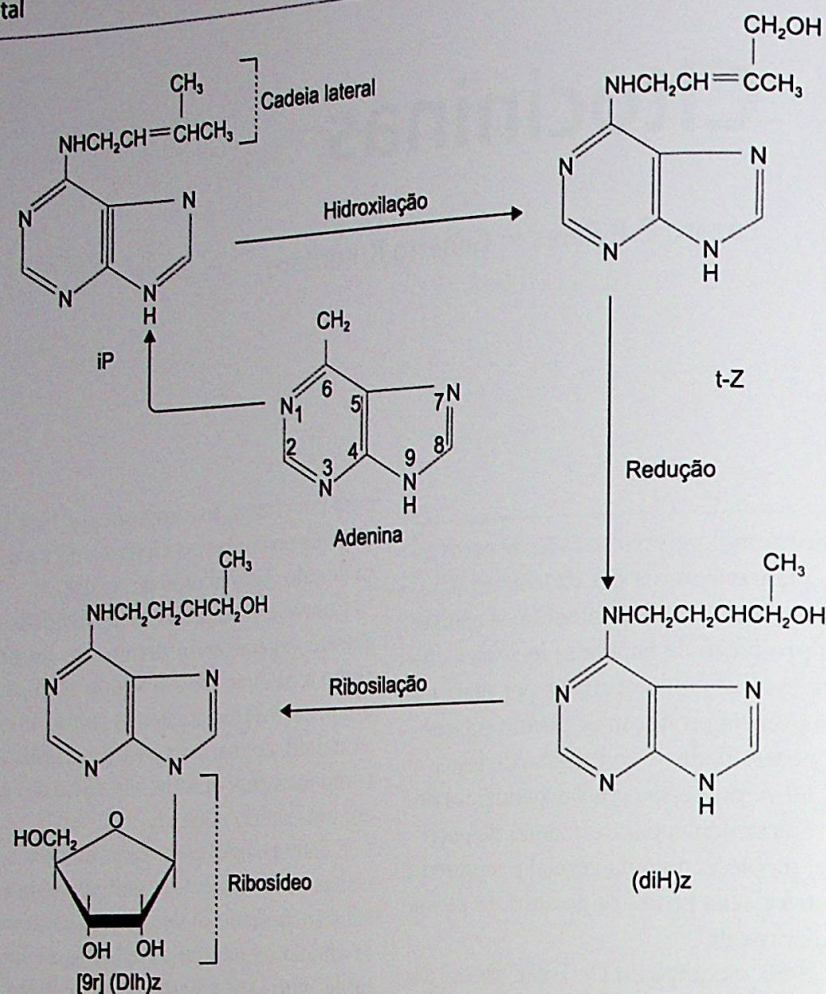
Durante a década de 1950, a equipe do Dr. Folke Skoog, da University of Wisconsin-Madison (EUA), estava à procura de uma substância que fosse responsável pela divisão celular em vegetais, utilizando nessa abordagem, como modelo experimental, o cultivo de medula de tabaco *in vitro*. Nessa época, já se conhecia o ácido indolil-3-acético (AIA), uma auxina isolada em 1934. A equipe já sabia, por exemplo, que, quando o AIA era utilizado em meios nutritivos com constituintes complexos, como extrato de levedura e água de coco, ocorria uma intensa proliferação das células da medula, o que levou a admitir a existência, nessas substâncias, de algo também essencial à divisão celular. Essa substância foi finalmente isolada por Carlos Miller em 1955, um colaborador de Folke Skoog, e denominada cinetina (Miller *et al.*, 1955). A cinetina era formada a partir das bases nitrogenadas presentes no esperma de arenque, sendo liberada à medida que este envelhecia, processo que podia ser acelerado quando da submissão do material à autoclave. O grupo do Dr. Skoog constatou que medula de tabaco, quando submetida apenas a 2 mg/l de AIA, apresentava, fundamentalmente, expansão das células e um pequeno aumento do peso. Todavia, suas células mostravam-se incapazes de entrar em divisão celular, a não ser que a cinetina fosse adicionada ao meio de cultura. Embora a adição de 100 µg/l de cinetina promovesse apenas um pequeno aumento do peso em relação ao controle, era suficiente para aumentar cerca de 30 vezes o número de células. A denominação “cinetina” decorreu do fato de essa substância atuar sobre o processo de citocinese. Em seguida, Skoog *et al.* propuseram o termo “citocinina” para compostos com atividade biológica igual à da cinetina, ou seja, aqueles capazes de promover a citocinese em células vegetais (Skoog *et al.*, 1965). Uma definição equivalente

para citocininas foi proposta por Hall (1973), como substâncias que promovem o crescimento e a diferenciação em cultura de calo (aglomerado de células).

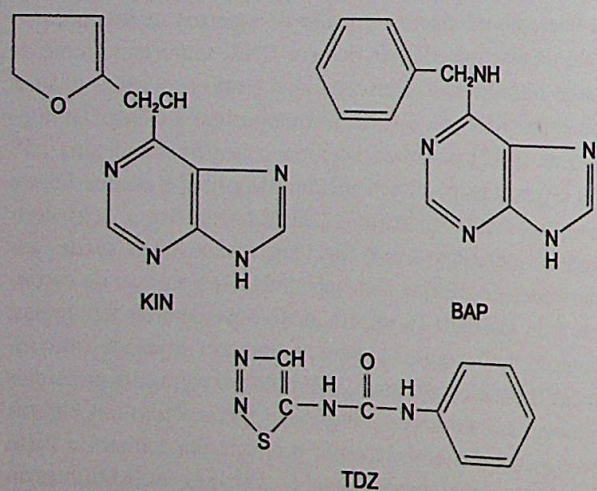
Como se vê, a presença de atividade de citocininas em um extrato vegetal, ou a designação de um composto sintético como uma citocinina, refere-se ao crescimento produzido em um pedaço de tecido ou calo cultivado em um meio otimizado contendo auxina. Isso posto, a classificação de um composto como uma citocinina baseia-se no seu efeito fisiológico, e não em um critério químico.

É interessante notar que, embora a descoberta e a conceituação de citocinina tenham acontecido a partir de uma substância artificial descoberta na década de 1950, a primeira citocinina natural em plantas só foi isolada 20 anos mais tarde, por David Letham, em extrato de milho-verde (*Zea mays*), denominando-a zeatina (Letham, 1973). A zeatina é, na verdade, um composto conhecido como 6-(gama-metil-y-hidroxi-metilalilamino)-purina, sendo, portanto, derivado de uma base púrica (adenina), como também é o caso da cinetina (6-furfurilaminopurina). Uma das explicações para a liberação de cinetina a partir de esperma de arenque é o fato de esse material ser rico em DNA, importante fonte de bases nitrogenadas. Desse modo, o termo *citocininas* inclui a cinetina (KIN) ou 6-furfurilaminopurina; a 6-benzilaminopurina (BAP) ou 6-benzildenina; a isopenteniladenina (iP) ou 6-(gama,gama-dimetilalilamino)-purina; a zeatina (Z) ou 6-(gama-metil-y-hidroxi-metilalilamino)-purina e seus derivados. Contudo, o termo *citocinina* não se limita apenas aos derivados de adenina com substituição na posição do carbono 6 da molécula (6-substituídos), pois algumas fenilureias, como o thidiazuron, também apresentam atividade citocinínica (Thomas e Katterman, 1986). As estruturas das principais citocininas naturais e sintéticas são apresentadas nas Figuras 10.1 e 10.2. Na nomenclatura proposta por Letham e Palni (1983), e que será empregada neste capítulo, os substituintes do anel purínico são representados com colchetes, como [9R]Z, o qual representa uma zeatina com uma molécula de ribose na posição 9 do anel purínico. De modo semelhante, os substituintes da cadeia lateral são representados com parênteses, por exemplo, (diH)Z, que nada mais é que uma zeatina com a cadeia lateral reduzida (perda da dupla-ligação).

Como se verá adiante, as citocininas são compostos que, além de essenciais à citocinese, promovem alterações na taxa metabólica, atividade enzimática, indução de formação de órgãos, quebra de dominância apical, mobilização de nutrientes



**Figura 10.1** Estrutura das principais citocininas que ocorrem naturalmente nos tecidos vegetais. Todas as citocininas naturais derivam de adenina. Isopenteniladenina – iP, *trans*-zeatina – t-Z e di-hidrozeatina – (diH)z são consideradas formas livres desses hormônios. Zeatina e di-hidrozeatina são geradas por modificações na cadeia lateral, envolvendo reações de hidroxilação e redução, respectivamente. As três formas podem se ligar a um açúcar, a ribose (ribosilação), formando, respectivamente, isopenteniladenosina – [9r]iP, *trans*-zeatina ribosídeo – t-[9r]Z e di-hidrozeatina ribosídeo – [9r](diH)Z, cuja estrutura está representada na figura.



**Figura 10.2** Estrutura das principais citocininas sintéticas. A cinetina (KIN) e a benzilaminopurina (BAP) têm um anel de purina (adenina) igual ao das citocininas naturais (ver Figura 10.1). O thidiazuron (TDZ) é uma citocinina do tipo fenilureia que difere bastante da estrutura das citocininas naturais pela ausência da base nitrogenada (adenina).

orgânicos e inorgânicos, retardamento da senescência de tecidos e órgãos e formação de cloroplastos. Contudo, antes de focar os efeitos das citocininas, faz-se necessário conhecer a dinâmica desses compostos na célula vegetal, ou seja, como

são sintetizadas em determinado tecido ou órgão, onde elas podem atuar diretamente ou ser transportadas para outras partes das plantas. Nestas últimas, as citocininas podem ser inativadas por conjugação e/ou oxidação ou produzir um efeito fisiológico determinante.

### Dinâmica das citocininas na célula e no vegetal como um todo

É bem conhecido o fato de que, para o desenvolvimento integrado e harmonioso das plantas, há a necessidade imperiosa de que os níveis de seus hormônios sejam controlados rigorosamente, conforme as necessidades ao longo da sua ontogênese. À luz dos conhecimentos hoje disponíveis, seria inimaginável visualizar o desenvolvimento sem se considerarem os mecanismos utilizados pelas plantas para regular os teores de seus hormônios, modificando-os de acordo com a natureza e o estágio de desenvolvimento do órgão e as condições ambientais. O nível endógeno das citocininas é regulado pela taxa de biossíntese e por reações metabólicas, como a redução da cadeia lateral, a conjugação, a hidrólise e a oxidação da cadeia lateral. As conjugações podem ser realizadas pela ligação de glicose a um nitrogênio do anel de adenina (N-glicosilação) ou ao oxigênio da cadeia lateral de certas citocininas (O-glicosilação). Entre todas as reações já descritas aqui, as modificações mais

importantes parecem ser as que surgem na cadeia lateral, pois pequenas substituições provocam grandes alterações na atividade das citocininas. Contudo, a conversão das bases em nucleosídeos (inserção de uma ribose) e nucleotídeos (inserção de ribose mais fosfato) compreende um metabolismo comum de purinas e parece não ser específico de Ck, sendo, portanto, menos importante na dinâmica das citocininas na célula e no vegetal como um todo. A seguir, são consideradas as principais reações metabólicas que contribuem para a regulação do conteúdo endógeno de citocininas ativas nos vegetais.

### Biossíntese

Conforme indicado anteriormente, a história da descoberta das citocininas está ligada intimamente ao próprio estabelecimento da técnica da cultura de células, tecidos e órgãos vegetais *in vitro*. Curiosamente, o primeiro sucesso no cultivo de um órgão vegetal isolado *in vitro* foi obtido com raiz (White, 1934), mesmo antes da descoberta da primeira citocinina, cerca de duas décadas e meia mais tarde. Sabe-se, atualmente, que uma das possíveis causas do sucesso na manutenção dessas raízes isoladas e vivas no meio de cultura teria sido o fato de elas serem os principais centros produtores de citocininas nas plantas. Outras evidências de que esses órgãos funcionariam como um importante sítio de síntese de citocininas vieram da constatação de que a senescência de folhas isoladas poderia ser retardada tanto pela aplicação de cinetina quanto pela formação de raízes nos pecíolos. Contudo, é necessário considerar que outros tecidos meristemáticos, como os ápices caulinares, também podem produzir citocininas, conforme evidenciado em plantas praticamente sem raízes, como no caso de *Tillandsia recurvata*, uma bromélia epífita (Peres *et al.*, 1997).

O estudo da biossíntese de Ck enfrenta consideráveis limitações, principalmente pelo fato de seu nível endógeno, nos tecidos vegetais, ser extremamente baixo, fazendo com que as dosagens desses compostos sejam um tanto trabalhosas. Também o papel central dos precursores de citocininas (nucleotídeos e isopentenilpirofosfato) no metabolismo celular tem se mostrado um problema para o estudo da biossíntese dessa classe hormonal. Assim, em estudos utilizando precursores marcados radioativamente, a principal porção dos substratos radioativos supridos é incorporada a metabólitos comuns de purina, sendo apenas uma pequena fração incorporada propriamente em citocininas. Além disso, como as Ck apresentam numerosas atividades complexas essenciais para o crescimento e o desenvolvimento da planta, uma abordagem genética (baseada na obtenção de mutantes) é difícil de alcançar. Desse modo, mutantes defectivos para a síntese de citocininas (auxotróficos) podem ser letais; contudo, pode existir mais de uma via biossintética para citocininas, envolvendo, por isso, mais de um gene com funções semelhantes, o que, de alguma forma, acaba garantindo a produção desse hormônio mesmo quando um desses genes é inativado por mutação.

Até 2001, o modelo corrente para a biossíntese de Ck previa a adição da cadeia lateral, representada pelo isopentenilpirofosfato ( $\Delta^2$ -iPP), à posição N<sup>6</sup> da adenosina monofosfato (AMP), reação esta catalisada pela enzima isopentenil transferase (IPT), produzindo a citocinina ribotídeo N<sup>6</sup>  $\Delta^2$ -isopenteniladenosina monofosfato [9R-5'P]iP (Figura 10.3). Os primeiros genes codificadores da enzima IPT foram isolados inicialmente em

bactérias, e não em plantas. O gene *IPT* ou *TMR* no T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* produz [9R-5'P]iP pela reação já descrita aqui. As citocininas zeatina e zeatina ribosídeo seriam formadas subsequentemente, a partir de [9R-5'P]iP, por uma reação denominada *trans*-hidroxilação.

Outra alternativa para biossíntese de citocininas em plantas seria o RNA transportador (tRNA). A terminação 3' do anticódon do tRNA apresenta Ck, o que levou, inclusive, à hipótese de que essas Ck estariam envolvidas no controle da biossíntese de proteínas. No entanto, a maior parte das Ck biologicamente ativas não é encontrada no tRNA. No tRNA predomina a forma *cis*-Z, e não *trans*-Z. A liberação de *cis*-Z a partir de tRNA, e posterior conversão para *trans*-Z, pode ser uma via indireta de produção de Ck, mas não a principal, pois tecidos auxotróficos para Ck apresentam, obviamente, tRNA.

Desde o isolamento e sequenciamento do gene *IPT* de *Agrobacterium*, houve várias tentativas no sentido de encontrar eventuais seqüências de DNA de plantas com homologia com esse gene. As tentativas frustradas levaram até mesmo à consideração de que as citocininas presentes nos tecidos vegetais seriam produzidas por microrganismos simbiotes das plantas, e não pelas próprias plantas. Propôs-se, até mesmo, que a autotrofia para citocininas, também conhecida como autonomia ou habituação, que às vezes ocorre em calos cultivados *in vitro*, poderia decorrer de contaminações imperceptíveis. Essas contaminações seriam causadas por certas bactérias, como as "metilotróficas facultativas de coloração rosada", não passíveis de remoção durante a desinfestação dos tecidos para cultura *in vitro*.

Contrariando, todavia, a provocativa teoria anteriormente citada, a finalização do sequenciamento do genoma de *Arabidopsis thaliana* (At) possibilitou a identificação de nove homólogos do gene *IPT* de *Agrobacterium*, designados *AtIPT1* a *AtIPT9*. Análises filogenéticas indicaram que *AtIPT2* e *AtIPT9* codificam possíveis enzimas IPT envolvidas na síntese das citocininas presentes em tRNA, enquanto os outros sete *AtIPT* são mais homólogos ao gene bacteriano *IPT/TMR*. A expressão de sete desses genes em *Escherichia coli* resultou na secreção de iP e Z, confirmando o envolvimento deles na biossíntese de Ck (Takei *et al.*, 2001a). Além disso, a superexpressão do gene *AtIPT4* em calos de tabaco, induzida por meio da fusão desse gene com um promotor bastante forte (35S) isolado a partir do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV), resultou na regeneração de gemas caulinares, mesmo na ausência de Ck no meio de cultura, o mesmo não ocorrendo quando se utilizou o gene *AtIPT2* para as transformações genéticas (Kakimoto, 2001). Surpreendentemente, de modo diferente da enzima IPT de bactéria, a enzima *AtIPT4* utilizou ATP e ADP preferencialmente ao AMP como substrato (Kakimoto, 2001). Os produtos dessas reações parecem ser isopenteniladenosina-5'-trifosfato e isopenteniladenosina-5'-difosfato (Figura 10.3), podendo ser, subsequentemente, convertidos em zeatina.

A descoberta da participação de mais de um gene na reação de biossíntese de Ck em plantas explica a dificuldade verificada até então em isolar mutantes defectivos para essa reação. Desse modo, a inativação de um dos genes *AtIPT* seria compensada pelo funcionamento dos demais. O único mutante pensado pelo funcionamento dos demais. O único mutante conhecido para a biossíntese de Ck era o *amp1* (*altered meristem program*) de *Arabidopsis thaliana*. Contudo, ao contrário

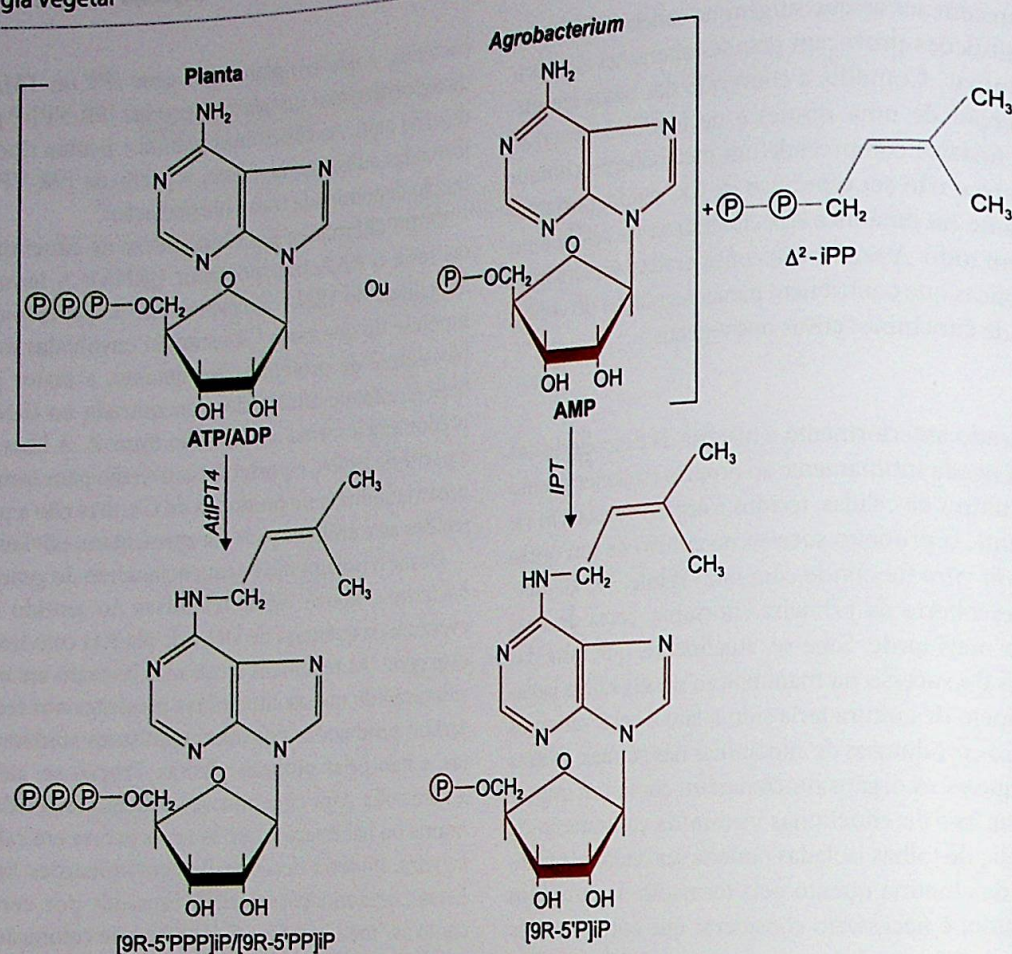


Figura 10.3 Biossíntese de citocininas. A enzima isopentenil transferase (IPT) é codificada pelo gene *AtIPT4* em *Arabidopsis thaliana* (verde) e pelo gene *IPT* em *Agrobacterium tumefaciens* (vermelho). Diferentemente de uma bactéria, a enzima IPT de plantas utiliza preferencialmente ATP ou ADP em vez de AMP.

do que se poderia esperar, plantas mutantes portadoras desse gene defeitivo apresentam níveis elevados de citocininas. O isolamento do gene defeitivo *amp1* mostrou que seu alelo funcional (*AMP1*) codifica uma carboxipeptidase do glutamato similar às enzimas envolvidas na clivagem e na ativação de pequenos peptídeos sinalizadores, como o *ENOD40*, a sistemina e o *CLAVATA3*. Esse resultado sugere que uma das funções do peptídeo ativado pela enzima codificada por *amp1* seria inibir a biossíntese de Ck, o que explicaria como a perda de função do gene mutante *amp1* leva a um acúmulo de Ck.

**Conjugação e hidrólise**

Desde que se isolou o primeiro gene de biossíntese de citocininas em *Agrobacterium tumefaciens*, ele tem sido utilizado, extensivamente, para produzir plantas transgênicas com elevada capacidade de sintetizar substâncias dessa classe hormonal. Contudo, quando se determina o conteúdo endógeno de citocininas dessas plantas, a maior parte encontra-se na forma conjugada com moléculas de açúcar. As moléculas conjugadas de citocininas são tidas como fisiologicamente inativas. Esses resultados sugerem que as plantas mantêm um controle estrito dos níveis endógenos de citocininas funcionais, sendo a conjugação um dos mecanismos utilizados para esse controle. Existe uma série de posições nas moléculas de Ck, nas quais podem se ligar a açúcares, como glicose e ribose (Figura 10.4 e Tabela 10.1). Em casos raros, as Ck também podem

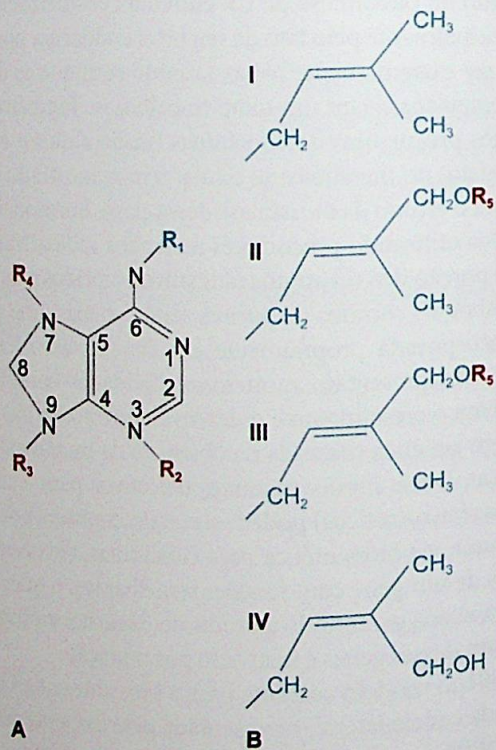


Figura 10.4 Anel purínico característico das citocininas (A) e cadeias laterais (R<sub>i</sub>) possíveis (B). As conjugações possíveis tanto no anel purínico (radicais R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>, que normalmente formam N-glicosídeos) quanto na cadeia lateral (radical R<sub>5</sub>, que costuma formar O-glicosídeos) estão descritas na Tabela 10.1.

Tabela 10.1 Principais tipos de citocininas e seus conjugados.

	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	Nome	Símbolo
1		-	H	-	-	N <sup>6</sup> -Δ <sup>2</sup> -isopenteniladenina	iP
2		-	R	-	-	N <sup>6</sup> -Δ <sup>2</sup> -isopenteniladenosina	[9R]iP
3	I	-	RP	-	-	N <sup>6</sup> -Δ <sup>2</sup> -isopenteniladenosina-5-monofosfato	[9R-5'P]iP
4		-	-	G	-	N <sup>6</sup> -Δ <sup>2</sup> -isopenteniladenina-7-glicosídeo	[7 G]iP
5		-	-	G	-	N <sup>6</sup> -Δ <sup>2</sup> -isopenteniladenina-9-glicosídeo	[9 G]iP
6		-	H	-	H	<i>trans</i> -zeatina	Z ou t-Z
7		-	R	-	H	<i>trans</i> -zeatina ribosídeo	[9R]Z
8		-	RP	-	H	<i>trans</i> -zeatina ribosídeo-5-monofosfato	[9R-5'P]Z
9		-	-	G	H	<i>trans</i> -zeatina-7-glicosídeo	[7 G]Z
10		-	-	G	H	<i>trans</i> -zeatina-9-glicosídeo	[9 G]Z
11		-	A	-	-	ácido lupínico	[9Ala]Z
12	II	-	G	-	G	<i>trans</i> -zeatina-9-glicosídeo-O-glicosídeo	[9 G](OG)Z
13		-	H	-	G	<i>trans</i> -zeatina-O-glicosídeo	(OG)Z
14		-	R	-	G	<i>trans</i> -zeatina ribosídeo-O-glicosídeo	[9R](OG)Z
15		-	RP	-	G	[9R](9 G)-5'-monofosfato	[9R-5'P](OG)Z
16		-	H	-	X	<i>trans</i> -zeatina-O-xilosídeo	(OX)Z
17		-	R	-	X	<i>trans</i> -zeatina ribosídeo-O-xilosídeo	[9R](OX)Z
18		-	H	-	H	di-hidrozeatina	(diH)Z
19		-	R	-	H	di-hidrozeatina ribosídeo	[9R](diH)Z
20		-	RP	-	H	di-hidrozeatina ribosídeo-5-monofosfato	[9R-5'P](diH)Z
21		G	-	-	H	di-hidrozeatina-3-glicosídeo	[3 G](diH)Z
22		-	-	G	H	di-hidrozeatina-7-glicosídeo	[7 G](diH)Z
23	III	-	G	-	H	di-hidrozeatina-9-glicosídeo	[9 G](diH)Z
24		-	H	-	G	di-hidrozeatina-O-glicosídeo	(OG)(diH)Z
25		-	R	-	G	di-hidrozeatina ribosídeo-O-glicosídeo	[9R](OG)(diH)Z
26		-	RP	-	G	[9R](OG)(diH)Z-5'-monofosfato	[9R-5'P](OG)(diH)Z
27		-	H	-	X	di-hidrozeatina-O-xilosídeo	(OX)(diH)Z
28		-	R	-	X	di-hidrozeatina ribosídeo-O-xilosídeo	[9R](OX)(diH)Z
29	IV	-	H	-	-	<i>cis</i> -zeatina	c-Z
30		-	G	-	-	<i>cis</i> -zeatina-9-glicosídeo	[9 G]c-Z

H: hidrogênio; R: ribose; RP: ribose-5'-monofosfato; G: glicose; X: xilose; A: alanina.  
Nota: as posições dos radicais são mostradas na Figura 10.4.

conjugar-se com aminoácidos. Um composto conhecido nesse caso é o ácido lupínico, um metabólito de zeatina formado pela adição de alanina ([9Ala]Z).

Como as citocininas são derivados de nucleotídeos e nucleosídeos (ver Figura 10.3), substâncias que apresentam ribose (ver Figura 10.3), substâncias que apresentam ribose como parte integrante da molécula, não se costuma considerar as formas ribosídicas conjugadas verdadeiros, mas somente as glicosídicas. Conforme mostrado na Figura 10.4 e na Tabela 10.1, a glicosilação de Ck pode ocorrer tanto no anel purínico, formando ligações N-glicosídios (radicais R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub>), quanto na cadeia lateral, originando as formas O-glicosídios (radical R<sub>5</sub>). Os N-glicosídios são possíveis nas posições 3, 7, 9 e parecem representar uma forma irreversível de conjugação. Como os O-glicosídios são ésteres formados no grupo OH da cadeia lateral, esse tipo de conjugação só é possível em citocininas derivadas de zeatina. Os O-glicosídios são menos estáveis que os N-glicosídios e podem ser hidrolisados

por betaglicosidases, possibilitando a retomada da atividade citocinínica da molécula desconjugada.

De modo geral, a função dos metabólitos de Ck ainda é obscura. Contudo, a ocorrência de enzimas capazes de quebrar as ligações glicosídicas na cadeia lateral (O-glicosídios) faz com que esses conjugados sejam considerados formas de estoque. Contudo, a estabilidade considerável dos N-glicosídios sugere que eles seriam produtos de "destoxificação" formados quando o nível de Ck começa a alcançar valores elevados, sendo acionado um mecanismo, inclusive, quando essa classe hormonal é aplicada nas plantas ou em pedaços cultivados *in vitro*.

Como as citocininas ribosídicas são frequentemente encontradas no xilema, elas têm sido consideradas formas de transporte. As bases livres representadas por iP, Z e (diH)Z seriam, por conseguinte, as formas ativas, ou seja, espécies moleculares capazes de se ligar a receptores e desencadear uma resposta fisiológica (ver adiante neste capítulo). Todas as outras

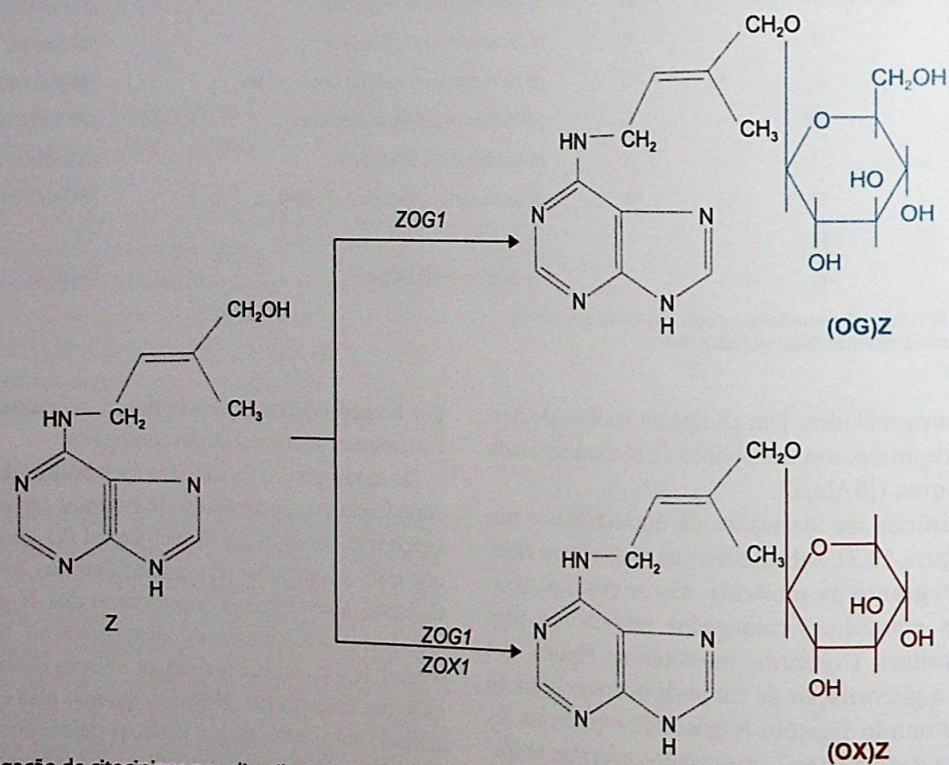
formas devem ser hidrolisadas primeiro antes de se ligarem ao receptor, o que não é possível para os conjugados 7 e 9-glicosil e 9-alanil, muito pouco ativos em bioensaios. Como as formas glicosídicas são mais solúveis, elas poderiam ser acumuladas nos vacúolos de células maduras. De fato, já se propôs que a capacidade de glicosilação é maior em tecidos maduros. Por sua vez, tecidos meristemáticos teriam mais citocininas na forma livre e, portanto, ativa, o que proporcionaria a divisão celular.

Somando-se todas as possibilidades de variações decorrentes das modificações na cadeia lateral ou no anel purínico, tem-se que o número possível de citocininas é relativamente elevado. Algumas delas estão resumidas na Figura 10.4 e na Tabela 10.1. É interessante mencionar ainda que, atualmente, tanto cinetina quanto benzilaminopurina (BAP) e seus metabólitos têm sido considerados também Ck de ocorrência natural, pois ambas já foram isoladas de tecidos vegetais. Alguns metabólitos naturais de BAP são suas formas hidroxiladas denominadas meta e ortopolinas. Contudo, embora a difenilureia (DPU) já tenha sido erroneamente identificada como um constituinte da água de coco, estudos recentes indicaram que Ck do tipo fenilureias não surgem naturalmente em plantas (Mok e Mok, 2001).

Nos últimos anos, importantes descobertas foram feitas sobre a base genética envolvida na conjugação e na hidrólise de citocininas. Desse modo, um cDNA\* codificando a enzima zeatina-O-glicosiltransferase (*ZOG1*), o qual conjuga zeatina com UDP-glicose, foi isolado em *Phaseolus lunatus*. O cDNA correspondente à enzima zeatina-O-xilosiltransferase

(*ZOX1*) foi isolado por homologia (93% no nível de DNA) em *P. vulgaris* (Mok *et al.*, 2000). A enzima codificada por *ZOX1* conjuga zeatina com UDP-xilose. Tanto UDP-glicose quanto UDP-xilose são substratos para *ZOG1*, mas a afinidade por UDP-glicose é maior (Mok *et al.*, 2000). Quanto à enzima *ZOX1*, esta só aceita UDP-xilose como substrato. Ambas as enzimas podem glicosilar *t*-Z (Figura 10.5), mas, a princípio, não glicosilam (diH)Z, *c*-Z ou [9R]Z. Os genes *ZOG1* e *ZOX1* apresentam pronunciada expressão em sementes imaturas, mas baixa expressão em tecidos maduros.

Um gene codificando uma enzima capaz de quebrar ligações O-glicosídicas de citocininas foi isolado em milho (*Zea mays*). Tal gene, denominado *ZM-P60.1*, codifica para uma betaglicosidase, enzima capaz de hidrolisar glicosídios na posição 3 do anel purínico (N3-glicosídios) e da cadeia lateral (O-glicosídios), mas não nas posições 7 e 9 do anel purínico (N7 e N9-glicosídios). Esse tipo de reação equivale a uma reativação de citocininas anteriormente inativadas por glicosilação (Figura 10.5), atuando, assim, como um importante mecanismo utilizado pelas plantas para modular seus níveis de Ck ativas. Curiosamente, a presença no tecido vegetal da forma conjugada e inativada de auxina com glicose (AIA-glicose) inibe a atividade do gene *ZM-P60.1*. Em termos de atividade hormonal, ambas as situações indicariam uma tendência à redução das formas fisiologicamente ativas das duas classes hormonais simultaneamente, o que poderia representar um possível mecanismo de manutenção de determinado balanço auxina/citocinina nos tecidos vegetais.



**Figura 10.5** Conjugação de citocininas por glicosilação. Os genes *ZOG1* e *ZOX1* codificam, respectivamente, para síntese de O-glicosiltransferase e O-xilosiltransferase. Essas enzimas têm especificidade por *trans*-zeatina (Z) como substrato e não conseguem conjugar (diH)Z, *c*-Z ou [9R]Z. Os compostos (OG)Z e (OX)Z representam moléculas de zeatina conjugadas com glicose (azul) e xilose (vermelho), sendo, portanto, fisiologicamente inativos.

\* cDNA: fita de DNA obtida artificialmente a partir do RNAm de determinado gene. O cDNA tem a mesma sequência do gene correspondente, mas não contém a região promotora nem os íntrons, já que foi produzido a partir do produto da expressão (RNAm) do gene em questão.

Por fim, especula-se que o gene *ROLC* de *Agrobacterium rhizogenes* codifique uma enzima capaz de hidrolisar glicosídios nas posições N7 e N9 do anel purínico, liberando assim citocininas ativas, como mostrado na Figura 10.6. Embora plantas superexpressando *ROLC* tenham alguns sintomas típicos de excesso de citocininas, como a baixa dominância apical e a redução do crescimento, elas também apresentam sintomas sem conexão com excesso de citocininas, ou mesmo mais associados à falta desse hormônio, como redução do conteúdo de pigmentos nas folhas, redução da fertilidade masculina e feminina, aumento do sistema radicular, e as raízes transgênicas isoladas conseguem crescer continuamente em meio sem hormônio (Faiss *et al.*, 1996).

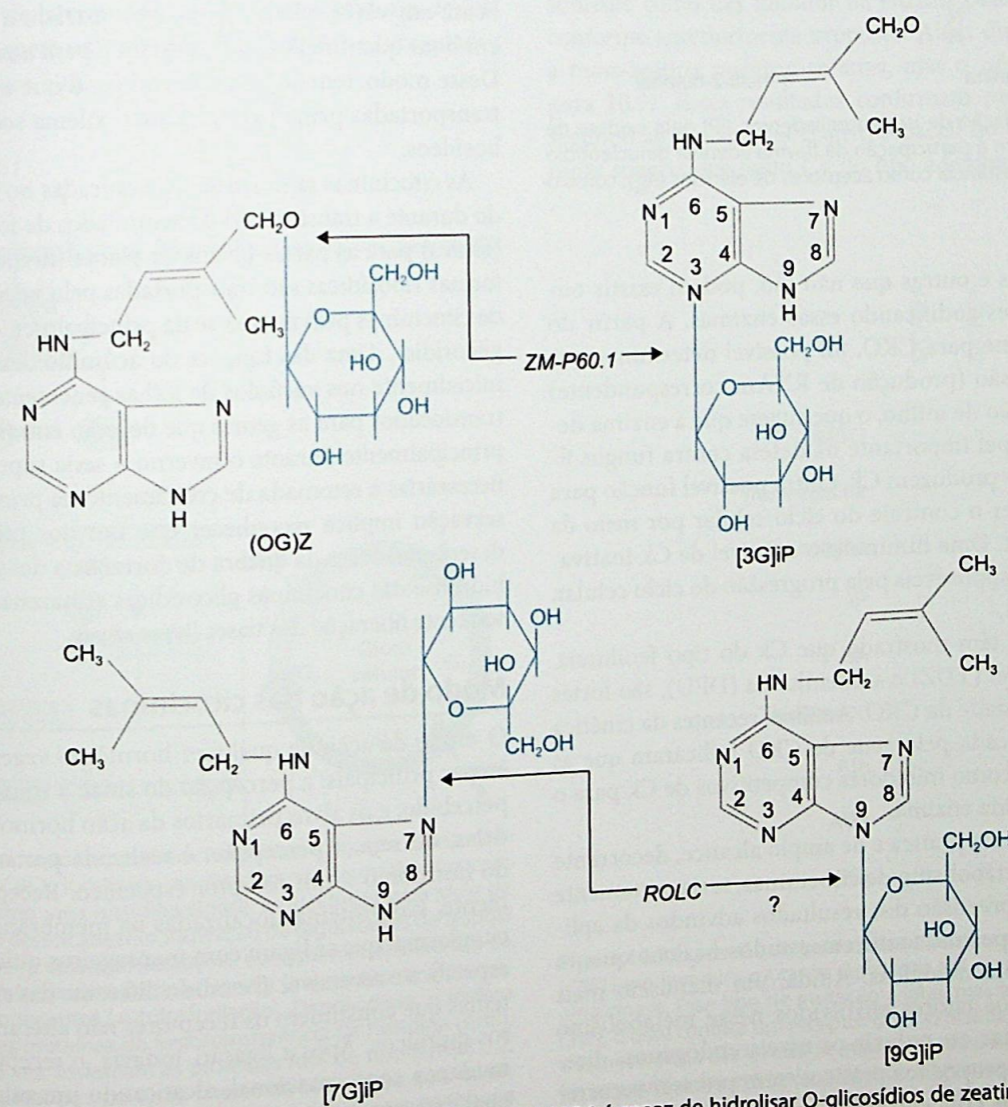
### Oxidação

Outro importante mecanismo de controle do nível endógeno de Ck ativas utilizado pelas plantas refere-se à quebra da cadeia lateral, sendo a oxidase de citocinina (CKO) a enzima responsável. A maioria das CKO, mas nem todas elas, compreende glicoproteínas com pH ótimo variando entre 6,0 e 9,0. O principal

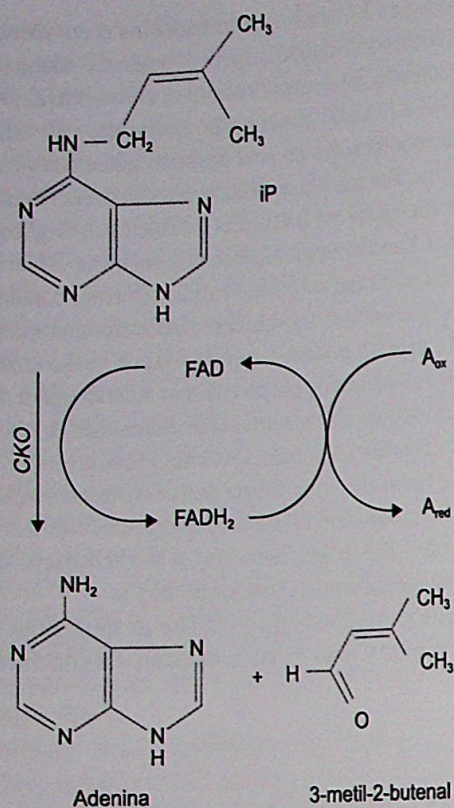
substrato para a CKO é a isopenteniladenina e, em menor grau, a zeatina, rendendo a reação 3-metil-2-butenal e adenina (Figura 10.7). Contudo, diferentes citocininas, como [9R]Z, [9R]iP, [9G]Z, [7G]Z e [9Ala]Z, também são quebradas pela CKO. Isso indica que modificações do anel purínico não afetam a atividade da enzima. Por sua vez, modificações da cadeia lateral, como aquelas encontradas em BAP, (diH)Z, cinetina e O-glicosilação, produzem Ck resistentes à oxidase de citocinina. Além disso, a CKO parece não atuar sobre nucleotídeos (formas contendo fósforo) como substrato. Curiosamente, BAP e cinetina adicionadas aos tecidos vegetais podem ser quebradas de modo enzimático, sugerindo a existência de outras enzimas atuando além da CKO.

Em tecidos com elevada atividade de oxidase de citocinina, a (diH)Z costuma ser a principal citocinina presente, confirmando se tratar de uma forma mais resistente à ação dessa enzima. De modo bem diferente, em espécies com baixíssima atividade de CKO (p. ex., rabanete), a N-glicosilação deve ser o principal mecanismo de inativação de Ck.

Um gene correspondente à oxidase de citocinina foi isolado em milho. Como existem oxidases de citocininas que



**Figura 10.6** Hidrólise de citocininas. A enzima codificada pelo gene *ZM-P60.1* é capaz de hidrolisar O-glicosídios de zeatina e N-glicosídios de isopenteniladenina e zeatina na posição 3, mas não nas posições 7 e 9, estes dois últimos, portanto, funcionando como possíveis formas de armazenamento. Especula-se que a reversibilidade pela ação enzimática, os O-glicosídios e N3-glicosídios podem ser formas de armazenamento. Especula-se que o gene *ROLC* de *Agrobacterium rhizogenes* codifique uma enzima capaz de hidrolisar glicosídios nas posições N7 e N9.



**Figura 10.7** Degradação de isopenteniladenina (iP) pela oxidase de citocinina (CKO), com a participação da flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e de outra substância como aceptores de elétrons ( $A_{ox}$ ), como o cobre ( $Cu^{2+}$ ).

são glicoproteínas e outras que não são, podem existir outros tipos de genes codificando essas enzimas. A partir do isolamento do gene para CKO, foi possível determinar que sua maior expressão (produção de RNA correspondente) se encontra no grão de milho, o que sugere que a enzima desempenhe um papel importante na defesa contra fungos fitopatogênicos que produzem Ck. Outra possível função para a CKO poderia ser o controle do ciclo celular por meio da degradação de Ck. Uma diminuição do nível de Ck inativaria as proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular, ou seja, as ciclinas.

Muitos estudos têm mostrado que Ck do tipo fenilureia, como o thidiazuron (TDZ) e a difenilureia (DPU), são fortes inibidores da atividade da CKO. Análises recentes da cinética da proteína codificada pelo gene de CKO indicaram que as fenilureias atuam como inibidores competitivos de Ck para o sítio ativo da referida enzima.

Uma consequência prática e de amplo alcance, decorrente dos estudos do metabolismo de citocininas, seria certamente uma melhor compreensão dos resultados advindos da aplicação desses compostos, tanto em estudos básicos quanto em aplicações biotecnológicas. Ainda, um manuseio mais adequado de certos fatores envolvidos nesse metabolismo permitiria aumentar ou reduzir os níveis endógenos, direcionando-os para propósitos práticos, sem precisar recorrer a tratamentos com concentrações estranhas à planta com consequências gênico-fisiológicas desastrosas, conforme verificado em alguns casos aplicados. É preciso ter em conta

que a citocinina, ao ser aplicada a um tecido vegetal, poderá ser metabolizada, e a resposta se dará em razão da capacidade metabólica do tecido em questão. Além disso, algumas diferenças na atividade exibida pelos vários tipos de Ck podem ser atribuídas à relativa estabilidade desses compostos. Assim, a (diH)Z pode ser mais ativa que a Z em alguns casos, em virtude da ação da citocinina oxidase, a qual limita o nível de Z, mas não o de (diH)Z. Não obstante, a (diH)Z pode ser inativada por glicosilação (ver Tabela 10.1), e, em tecidos com tal capacidade, outras citocininas podem ser as mais ativas. De modo semelhante, a constatação de que o TDZ é um inibidor da oxidase de citocinina, aliada ao fato de, provavelmente, não haver um sistema enzimático para sua inativação, explica, pelo menos em parte, a superioridade dessa citocinina na maioria das aplicações biotecnológicas.

### Transporte

Conforme mencionado anteriormente, o principal sítio de biossíntese de Ck nas plantas é representado pelas raízes. Essa localização sugere que as citocininas podem ser transportadas para a parte aérea pelo xilema. De fato, a análise da seiva bruta em várias plantas tem demonstrado a presença destas em boas quantidades, com destaque para a zeatina ribosídeo. Desse modo, tem-se como noção geral que as citocininas são transportadas principalmente pelo xilema sob a forma de ribosídeos.

As citocininas também são encontradas no floema, sobretudo durante a translocação de assimilados de folhas senescentes (fontes) para as partes jovens da planta (drenos). Enquanto as formas ribosídicas são transportadas pelo xilema, o transporte de citocininas pelo floema se dá principalmente sob a forma de glicosídeos. Uma das funções do acúmulo desses glicosídeos - inicialmente nos vacúolos de folhas senescentes, sendo depois translocados para as gemas que deverão entrar em dormência, principalmente durante o inverno - seria suprir as citocininas necessárias à retomada de crescimento na primavera. Essa observação implica reconhecer que um dos primeiros eventos desencadeadores da quebra de dormência dessas gemas seria a hidrólise das citocininas glicosídicas armazenadas, com a consequente liberação das bases livres ativas.

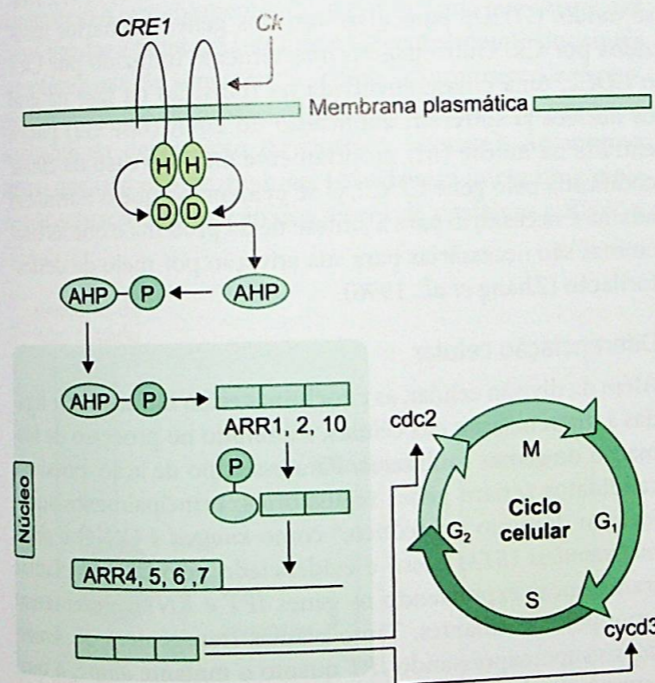
### Modo de ação das citocininas

O modo de ação de qualquer hormônio vegetal envolve três etapas principais: a percepção do sinal; a transdução do sinal percebido; e os alvos primários da ação hormonal. A primeira delas, ou seja, a percepção, é realizada por meio da ligação do hormônio a um receptor específico. Receptores, normalmente, são proteínas localizadas na membrana celular ou no citoplasma, que se ligam com mensageiros químicos de forma específica e reversível. De modo diferente das enzimas, as proteínas que constituem os receptores não alteram os mensageiros químicos. Após a ligação, todavia, o receptor pode sofrer mudança conformacional, alcançando um estágio ativado, o qual, por sua vez, desencadeia uma cascata de eventos químicos intracelulares que leva a uma resposta característica. Desse modo, as proteínas receptoras atuam tanto na detecção quanto na transdução do sinal. Outras moléculas (mensageiros

secundários) podem estar envolvidas na transdução do sinal, amplificando-o. Por fim, o sinal percebido e amplificado deve interferir em mecanismos celulares básicos, como a expansão, a divisão ou a diferenciação, os quais são os alvos primários fundamentais e cujo somatório de efeitos se traduz na modificação do vegetal como um todo. Esses mecanismos apresentam especificidade para cada classe hormonal. A seguir, será discutido o que se conhece, até o momento, em relação às citocininas.

### Percepção e transdução de sinal

Postula-se, atualmente, que a sinalização de citocininas envolveria o chamado sistema regulatório de dois componentes (*two-component regulatory system*), inicialmente descrito em bactérias. Esse sistema, comum em procariontes, eucariotes simples e plantas, consiste em uma enzima cinase do tipo histidina (componente 1) que percebe a entrada do sinal, e em um regulador de resposta (componente 2), que medeia a saída do sinal. A via de sinalização se inicia quando a cinase é ativada por citocinina e fosforila seu próprio resíduo de histidina, transferindo esse fosfato, por fim, para o regulador de resposta (ARR). No caso de citocininas, existem transferidores de fosfato (AHP) que agem entre o sensor (receptor) e o regulador de resposta (Figura 10.8).



**Figura 10.8** Transdução do sinal de citocininas. A ligação de citocininas ao receptor *CRE1*, localizado na membrana plasmática, faz com que este atue como uma histidina cinase, a qual inicia uma série de fosforilações que desencadearão a ativação de reguladores de respostas (ARR). A primeira dessas fosforilações consiste na transferência de um fósforo do aminoácido histidina (H) para um resíduo de glutamato (D) no próprio receptor (autofosforilação). Depois disso, o fósforo é passado para as proteínas de fosfortransferência de histidina (AHP), as quais, por sua vez, fosforilam as proteínas de transcrição que, quando ativadas por fosforilação, se ligam ao DNA e promovem a ativação de genes *ARR* do tipo A (*ARR4, 5, 6, 7*). A ativação de reguladores de resposta do tipo A pode desencadear a ação de ciclinas, como *cdc2* e *cycd3*, o que explicaria um dos principais papéis das citocininas, ou seja, a regulação do ciclo celular.

As evidências de que as citocininas tinham uma sinalização segundo um sistema de dois componentes surgiram quando se isolou o gene *CRE1* e se constatou que ele codificava um receptor do tipo histidina cinase. Esse gene foi isolado por meio do estudo do mutante *CRE1* (*cytokinin response 1*) de *Arabidopsis*, o qual mostrava baixa sensibilidade às Ck. Outra histidina cinase (*CK11*) envolvida na sinalização de Ck já havia sido isolada em *Arabidopsis*. Contudo, era necessário demonstrar que tais receptores conseguem se ligar à citocinina e desencadear uma resposta hormonal. Isso foi obtido de modo elegante por Inoue *et al.* (2001), trabalhando com um mutante de levedura que não apresentava um receptor do tipo histidina cinase. Essa mutação é letal nas leveduras, mas a letalidade era suprimida quando as leveduras passaram a expressar o gene responsável pela resposta às citocininas (*CRE1*) na presença de citocininas advindas do meio de cultura. Desse modo, a complementação de leveduras mutantes por meio da transformação com o gene *CRE1*, além de confirmar que sua proteína correspondente é um receptor de Ck, acabou mostrando-se um ótimo ensaio para conhecer as formas de Ck realmente ativas. Fazendo isso, Inoue *et al.* (2001) constataram que o TDZ age como citocinina verdadeira, e não somente como um inibidor da enzima oxidase de citocinina, conforme anteriormente proposto. Além disso, nesse sistema, a *trans*-zeatina mostrou-se ativa, mas o isômero *cis* não (Figura 10.9). Esses resultados confirmam previsões anteriores segundo as quais a modelagem espacial do receptor de citocininas sugeria que tanto Ck do tipo adenina quanto ureia têm

	S/CRE1	S/CRE1
DMSO	-	-
<i>Trans</i> -zeatina	-	+
<i>Cis</i> -zeatina	-	-
iP	-	+
BA	-	+
Thidiazuron	-	+
AIA	-	-
ABA	-	-
AG <sub>3</sub>	-	-

**Figura 10.9** Expressão do gene que codifica um receptor de citocinina (*CRE1*) em levedura mutante deficiente em receptores do tipo histidina cinase. Esse tipo de mutação é letal, mas a introdução do gene *CRE1*, o qual codifica um receptor do tipo histidina cinase, possibilitou a sobrevivência das leveduras (representada pelo sinal "+"), desde que a sobrevivência das leveduras (representada pelo sinal "+"), desde que fossem cultivadas em meio contendo citocininas ativas. Ao se adicionarem formas inativas de citocininas (*cis*-zeatina), outras classes hormonais (AIA, ABA e AG<sub>3</sub>) ou somente o solvente (DMSO) utilizado para solubilizar os hormônios, as leveduras morreram (indicado pelo sinal "-"). Adaptada de Inoue *et al.* (2001).

conformações capazes de se ligar à mesma proteína receptora. É interessante notar que os receptores conhecidos de etileno (*ETR1* em *Arabidopsis* e *Never ripe* em tomateiro) também são cinases do tipo histidina.

Além de *CRE1*, a proteína codificada pelo gene *CK11* parece ser um receptor de Ck, o qual teria uma regulação diferente de *CRE1*. Como se pode observar, há uma redundância em receptores e reguladores de resposta, o que explica a dificuldade em isolar mutantes baseados em triagem de fenótipos sem resposta a citocininas.

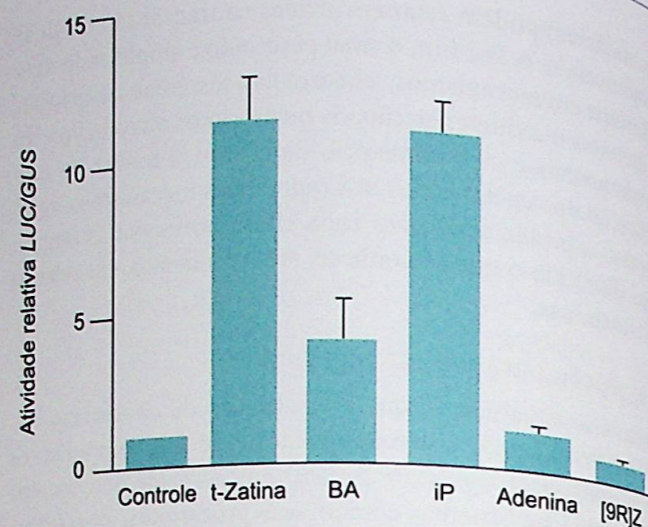
Embora o mutante *cre1* tenha um desenvolvimento normal dos caules formados na germinação de sementes, ele falha em formar gemas em cultura de calos *in vitro*. Isso sugere que a proteína *CRE1* funcional é um receptor presente em calos e que outros receptores que agem na planta, como um todo, não agem em calos. Além de se expressar em calos, a análise de expressão do gene *CRE1* indica que ele é predominantemente expresso nas raízes (Inoue *et al.*, 2001). A expressão predominante de *CRE1* em raízes parece corroborar a descoberta de que o mutante *cre1* é alélico à mutação *wooden leg (wol)*, a qual causa defeito na divisão celular e no desenvolvimento de tecido vascular de raiz.

Alguns reguladores de resposta (ARR) envolvidos na sinalização de Ck (ver Figura 10.8) já tiveram seus genes correspondentes isolados. Os reguladores de resposta do tipo B (ARR1, 2, 10) são fatores de transcrição ativados por citocininas. Esses fatores de transcrição, por sua vez, ativam a transcrição de genes de reguladores de resposta do tipo A (ARR4, 5, 6, 7). Como consequência, a região promotora dos genes de reguladores de resposta do tipo A responde diretamente às Ck. Tomando vantagem dessa característica, Hwang e Sheen (2001) fundiram o promotor de *ARR6* com o gene repórter da luciferase de vaga-lume (*LUC*), responsável pela síntese da luciferase, a substância luminosa desse inseto, e fizeram a expressão transiente em protoplastos de *Arabidopsis*. Utilizando tal sistema, ficou demonstrado que apenas bases livres (BA, iP e Z) ativaram o promotor de *ARR6* e, conseqüentemente, provocaram a atividade da enzima luciferase detectada pela luminescência. De modo contrário, a forma ribosídica, [9R]Z, mostrou-se inativa (Figura 10.10). Tal constatação sugere, fortemente, que mesmo as formas ribosídicas de citocininas não são ativas *per se*, tornando-se necessária a perda da ribose para ativá-las. Como discutido anteriormente, as formas ribosídicas são consideradas formas de transporte e, apesar de serem transportadas em células mortas (xilema), parece ser importante para a planta que elas estejam inativadas.

### Alvos primários das citocininas

#### Divisão celular

Como o próprio nome indica, um dos principais eventos controlados pelas citocininas é a citocinese ou divisão celular. Hoje, sabe-se que as citocininas atuam em etapas específicas do ciclo celular, regulando a atividade de ciclinas, proteínas que controlam a divisão celular. O gene *CYCD3* codifica uma ciclina envolvida na passagem da fase G1 para a fase de síntese de DNA (S) do ciclo celular. Um fato interessante é que tecidos expressando *CYCD3* constitutivamente, isto é, tecidos



**Figura 10.10** Ensaio de expressão transiente em protoplasto de *Arabidopsis* contendo o promotor de um gene induzido por citocininas (*ARR6*) ligado ao gene repórter da betaglucuronidase (*GUS*) ou luciferase (*LUC*). Notar que somente bases livres (BA, iP e Z) mostraram atividade nesse bioensaio, sugerindo que mesmo as formas ribosídicas, como [9R]Z, não são citocininas realmente ativas. Adaptada de Hwang e Sheen (2001).

de plantas transgênicas com superexpressão de *CYCD3* em todas as células, não dependem de Ck exógenas para formar calos esverdeados *in vitro* (Riou-Khamlichi *et al.*, 1999). Desse modo, *CYCD3* parece ser um dos genes primários induzidos por Ck. Outro gene primariamente induzido por Ck é o *CDC2*, uma cinase envolvida na transição da fase na qual os núcleos já sofreram duplicação do DNA (fase G2) para a entrada na mitose (M) propriamente dita. No caso da cinase codificada pelo gene *CDC2*, já se evidenciou que o hormônio auxina é necessário para a síntese dessa proteína e que as citocininas são necessárias para sua ativação por meio de desfosforilação (Zhang *et al.*, 1996).

#### Diferenciação celular

Além da divisão celular, as citocininas estão intimamente ligadas à diferenciação das células, sobretudo no processo de formação de gemas caulinares. Para esse tipo de ação, possíveis candidatos seriam genes regulatórios, principalmente aqueles com domínio homeótico,\* como *knotted 1 (KN1)* e *shoot meristemless (STM)*. Isso é evidenciado pelo fato de plantas transgênicas expressando os genes *IPT* e *KN1* apresentarem fenótipos semelhantes. Tanto plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando *IPT* quanto o mutante *amp1*, o qual tem níveis elevados de citocininas, mostraram um aumento na expressão dos genes *KNAT1* (um homólogo de *knotted 1*) e *STM* (Rupp *et al.*, 1999). Essas plantas também apresentaram folhas serrilhadas parecidas com aquelas de plantas superexpressando *KNAT1*. Desse modo, os autores propuseram que as Ck estão a montante (*up stream*) desses genes homeóticos, o que significa dizer que as citocininas podem induzir sua

\* Domínio homeótico (*homeobox*) compreende uma característica de genes envolvidos em mutações homeóticas, ou seja, mutações que provocam a transformação de um órgão em outro. O primeiro gene homeótico descoberto foi *antennapedia*, que provoca a formação de pernas no local onde deveriam formar-se antenas na mosca *Drosophila*.

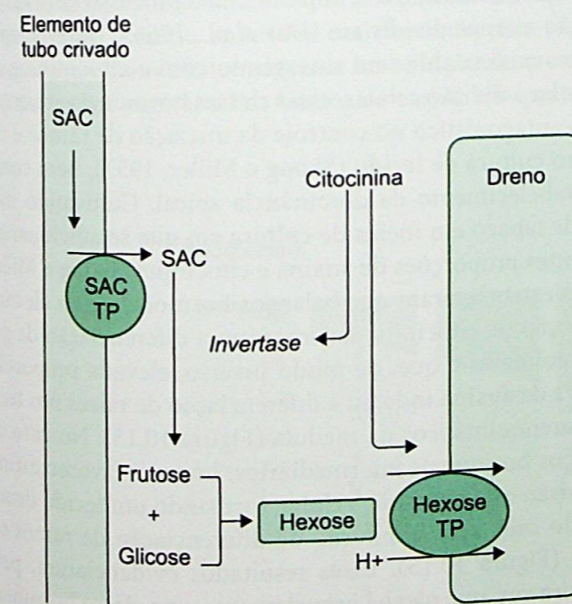
expressão. Contudo, plantas transgênicas superexpressando o gene *knotted* apresentam níveis elevados de citocininas (Hewett *et al.*, 2000), sugerindo que as citocininas também poderiam vir a jusante (*down stream*) da expressão desses genes. Uma explicação para isso seria admitir que o efeito de *knotted* na produção de citocininas é indireto, por meio do estímulo à formação de tecidos meristemáticos, os quais são fontes de citocininas.

#### Estabelecimento de drenos

Para que gemas sejam formadas, torna-se necessário também um aporte de nutrientes, pois os novos brotos funcionam como drenos. Coincidentemente, as citocininas também estão envolvidas no estabelecimento de drenos (Figura 10.11), atuando de modo direto em, pelo menos, duas proteínas (invertase e transportador de hexoses), necessárias para o descarregamento apoplástico do floema. A enzima invertase diminui o potencial químico da sacarose na região do descarregamento, favorecendo uma chegada contínua desse nutriente. Ao mesmo tempo, o transportador de hexose é necessário para que os açúcares entrem nas células do dreno.

#### Retardamento da senescência foliar

O processo de envelhecimento de uma folha é acelerado quando esta é destacada da planta e mantida sob condições que minimizem o murchamento. Da mesma forma que ocorre nas folhas ligadas à planta, dá-se início ao aparecimento dos sinais inconfundíveis de senescência, como o surgimento e a progressão crescente do amarelecimento característico, processo resultante da degradação da clorofila (clorose). Ao mesmo tempo que isso ocorre, no nível tissular tem início uma rápida e acentuada diminuição dos teores de proteínas e RNA, a

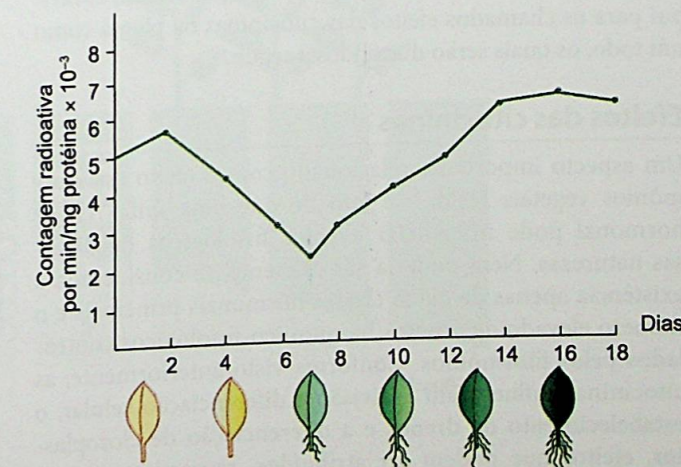


**Figura 10.11** Esquema representativo dos efeitos da citocinina no estabelecimento de drenos, por meio da ação sobre a enzima invertase e um transportador de hexose. A invertase diminui o potencial químico da sacarose na região do descarregamento, favorecendo uma chegada contínua desse nutriente. Ao mesmo tempo, o transportador de hexose é necessário para que os açúcares entrem nas células do dreno. SAC: sacarose; TP: transportador. Adaptada de Roitsch e Ehneb (2000).

despeito das quantidades presentes de açúcares. A degradação das proteínas leva a um acúmulo de aminoácidos e amidas no interior da folha, já que estas não podiam ser transportadas conforme acontece nas folhas presas à planta. Tal constatação levou à interpretação de que a diminuição na síntese proteica não podia ser atribuída à falta de matéria-prima, ou seja, de aminoácidos. De fato, por meio de aminoácidos radioativamente marcados, já se sabia da ocorrência de uma acentuada redução na síntese proteica em folhas destacadas, em processo de envelhecimento.

Pelo menos desde 1964, sabia-se que a taxa elevada da degradação proteica, em folhas destacadas e com seus pecíolos mergulhados em água, era fortemente inibida quando raízes adventícias se formavam na base destes; além disso, a longevidade foliar aumentava de forma proeminente (Figura 10.12). Estava assim demonstrada uma relação entre o retardamento do envelhecimento da folha e a existência de raízes crescendo ativamente; postulou-se, na ocasião, que as raízes deveriam produzir algum "fator" necessário à manutenção da síntese proteica no limbo foliar e ao retardamento do envelhecimento. Descobriu-se, mais tarde, que a aplicação de cinetina sobre folhas destacadas também prevenia a senescência, mantendo a coloração verde típica desses órgãos. Todavia, em certo momento, o que mais despertou a atenção dos pesquisadores foi a constatação de que, quando a citocinina era aplicada em pequenas áreas do limbo, apenas estas se mantinham verdes, enquanto, em todo o restante da folha, o processo de senescência se mantinha (Figura 10.13). Estava, portanto, comprovado que, no caso das folhas enraizadas, o "fator" produzido pelas raízes era uma citocinina endógena transportada até o limbo. Estudos viriam também indicar que as citocininas causavam uma rápida aceleração das taxas de síntese de RNA e proteínas após cerca de 70 h da aplicação.

Além da estimulação da síntese de proteína e de RNA, o retardamento da senescência foliar pela aplicação de citocininas envolve a mobilização de metabólitos no interior desse órgão. Quando gotas de uma solução de citocinina eram depositadas em áreas definidas de folhas senescentes, verificava-se nos



**Figura 10.12** Capacidade de síntese de proteína em folhas destacadas de tabaco, medida antes e depois da formação de raízes adventícias por meio do uso de metionina marcada (<sup>35</sup>S). Adaptada de Parthier (1979).



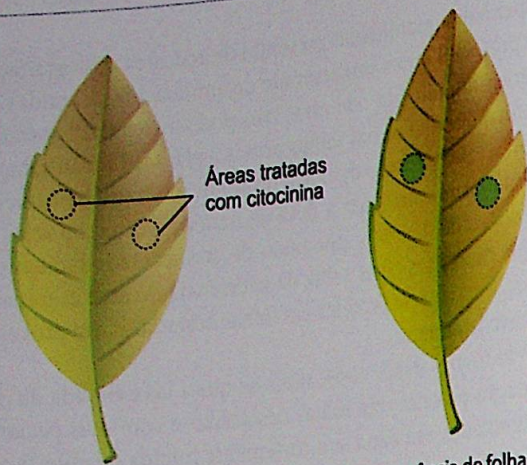


Figura 10.13 Efeito da inibição localizada da senescência de folhas de tabaco tratadas com uma solução de citocinina.

pontos tratados o acúmulo de aminoácidos radioativos aplicados em outra parte da folha e de outras substâncias, também indicando que a citocinina transformava a área tratada em um dreno para esses compostos. O efeito inibitório da citocinina endógena sobre o envelhecimento foliar promovido pelo aumento dos níveis de etileno é mostrado na Figura 10.20.

### Fotomorfogênese

Outro evento marcante controlado pelas citocininas consiste na fotomorfogênese, o que sugere que o fotorreceptor envolvido nesse processo, o fitocromo, também seja um alvo primário dessa classe hormonal. Recentemente, constatou-se que um dos reguladores de resposta da via de sinalização das citocininas, ARR4, impediria a reversão da forma ativa do fitocromo B (PhyB), ou seja, a forma que absorve luz na faixa do vermelho-extremo, para a forma inativa, a qual absorve luz na faixa do vermelho. Desse modo, pode-se dizer que as citocininas mantêm PhyB na forma ativa e que alguns dos efeitos das Ck, sobretudo no desestiolamento (inibição do crescimento no escuro) e na diferenciação de cloroplastos, sejam mediados pelo fitocromo B (Fankhauser, 2002).

O somatório da ação das citocininas no nível celular, sobretudo nos processos de divisão e diferenciação celular, contribui para os chamados efeitos das citocininas na planta como um todo, os quais serão discutidos a seguir.

### Efeitos das citocininas

Um aspecto importante relacionado com o efeito dos hormônios vegetais reside no fato de que uma única classe hormonal pode influenciar eventos fisiológicos de diversas naturezas. Nem poderia ser diferente, se considerada a existência apenas de cinco classes hormonais principais e o número elevado de eventos bioquímico-fisiológicos controlados pelos fitormônios. Conforme visto anteriormente, as citocininas influenciam a divisão e diferenciação celular, o estabelecimento de drenos e a diferenciação de cloroplastos, efeitos que podem ser atribuídos, respectivamente, à ação das citocininas de modo imediato sobre ciclinas, genes homeóticos, invertases e fitocromos. Além disso, outros importantes efeitos das citocininas poderiam ainda ser mencionados, como a germinação de sementes, a formação

de gemas caulinares, o desestiolamento, a quebra da dominância apical, a inibição da senescência e a interação planta-patógeno. Conforme será visto adiante, alguns trabalhos têm associado, ainda, as Ck à indução floral. Contudo, como a floração envolve processos dependentes de divisão celular, estabelecimento de drenos etc., são induzidos por citocininas, é muito provável que estas desempenhem um papel indireto, não sendo o hormônio indutor desse processo propriamente dito.\* Em *Mercurialis annua* – uma *Euphorbiaceae* – quanto o iP é predominante nas plantas masculinas, enquanto a t-zeatina é abundante em plantas femininas (Durand e Durand, 1991). O tratamento de plantas masculinas com t-zeatina resultou na formação de flores femininas, mostrando um efeito do tipo de citocinina na determinação sexual dessa espécie.

Embora as citocininas tenham efeitos aparentemente diversos e desconexos, alguns deles, como a formação de gemas caulinares, podem estar integrados de forma razoavelmente coerente, conforme se procura evidenciar na Figura 10.14.

Outro fato relevante da ação hormonal é que, além de uma classe hormonal poder influenciar diferentes processos fisiológicos, a recíproca também é verdadeira, ou seja, um mesmo processo fisiológico pode ser influenciado por diferentes classes hormonais. Desse modo, antes de se discutirem outros efeitos das citocininas, será considerada, brevemente, a interação desses hormônios com outras classes hormonais.

### Interação com outras classes hormonais

Entre os fitormônios, a auxina é, de longe, a classe hormonal com maior interface com as citocininas. Trabalhos clássicos, realizados no laboratório do Dr. Folke Skoog, viriam a revelar, ainda nos anos 1950, que tanto a auxina quanto a citocinina são necessárias para estimular a divisão de células maduras, ou seja, a retomada desse processo em células que não mais se dividiriam (Das *et al.*, 1956). Todavia, apesar de a auxina atuar em sinergismo com a citocinina para estimular a divisão celular, essas classes hormonais atuam de modo antagonístico no controle da iniciação de ramos e raízes em cultura de tecido (Skoog e Miller, 1957), bem como no estabelecimento da dominância apical. Cultivando medula de tabaco em meios de cultura em que se adicionaram diferentes proporções de auxina e citocinina, Skoog e Miller (1957) estabeleceram que balanços hormonais com elevada proporção de citocinina favoreceram a diferenciação de gemas caulinares e que, de modo inverso, elevada proporção relativa de auxina induziu a diferenciação de raízes nos tecidos parenquimáticos da medula (Figura 10.15). No caso de balanços hormonais intermediários, houve o favorecimento da divisão e da expansão celular, formando um tecido denso e da expansão celular, formando um tecido denominado calo, sem a indução de diferenciação de ramos ou raízes (Figura 10.15). Esses resultados evidenciaram, pela primeira vez, que não há propriamente uma classe hormonal

\* Muitos autores têm buscado o chamado "florigeno" ou seja, o hormônio indutor da floração. Contudo, o mais provável é que a indução de flores constitua um processo controlado por balanços entre mais de uma classe hormonal, assim como ocorre na indução de caules e raízes (Skoog e Miller, 1957), o qual será discutido adiante neste capítulo.

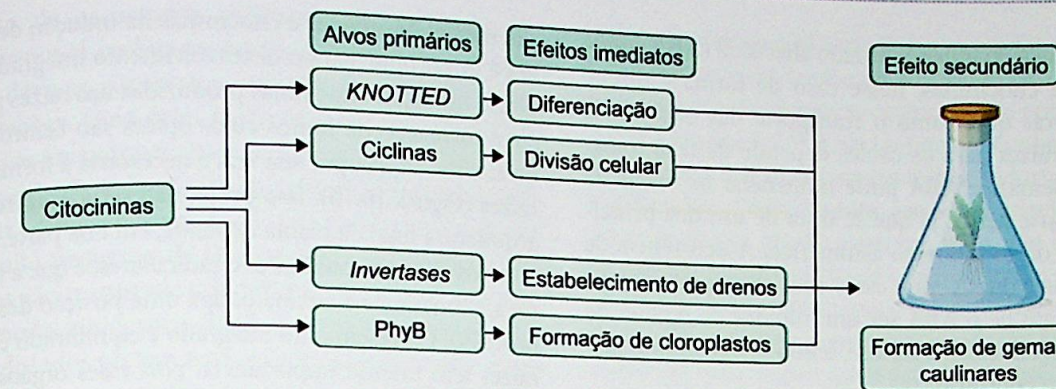


Figura 10.14 Integração presumível de alguns dos diversos efeitos das citocininas. A atuação das citocininas em alvos primários, como os genes homeóticos (*knotted*), ciclinas, invertases e fitocromo, provocaria efeitos imediatos na diferenciação, divisão celular etc., os quais, por sua vez e de modo conjunto, promoveriam efeitos secundários e macroscópicos, como a formação de gemas caulinares.

responsável pela formação de cada tipo de órgão, e sim um controle da formação destes por meio das proporções relativas entre diferentes classes hormonais.

Pouco se conhece, até o momento, sobre os mecanismos moleculares da interação auxina-citocinina. Acredita-se que um dos possíveis pontos de interação poderia ser encontrado no próprio metabolismo de ambos os hormônios, e uma dessas classes hormonais influenciaria a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese ou na inativação da outra. Embora as evidências diretas para tal mecanismo ainda sejam incipientes, resultados interessantes foram obtidos em experimentos com plantas transgênicas. Verificou-se que plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *ipt* para biossíntese de citocinina costumam ser menos sensíveis à aplicação de auxina (Li *et al.*, 1994), enquanto, de modo inverso, aquelas superexpressando o gene para inativação de citocininas (*ZOX1*) mostraram-se mais sensíveis à auxina (Werner *et al.*, 2001).

É de amplo conhecimento que tanto as auxinas quanto as citocininas, quando aplicadas em concentrações supraótimas, apresentam efeito marcante na inibição do crescimento de órgãos vegetais. Em ambos os casos, boa parte desse

efeito inibitório é mediada pela indução da produção de etileno desencadeada pela enzima sintase do ACC (ver Capítulo 13). No caso específico das citocininas, estas parecem ser uma das principais causas da forte inibição provocada por essa classe hormonal sobre o alongamento radicular. Desse modo, em raízes de *Arabidopsis*, o efeito de tratamentos com benziladenina (BA) é revertido pela aplicação de aminoetoxivinil glicina (AVG) e íons de prata ( $Ag^+$ ) (Cary *et al.*, 1995), inibidores da biossíntese e da ação de etileno, respectivamente. Contudo, nem todo o efeito do BA pode ser atribuído ao estímulo na produção de etileno, pois a aplicação de BA pode inibir mais o alongamento radicular que a simples aplicação de etileno, em concentrações nas quais ambos os tratamentos induzem a mesma quantidade de etileno endógeno, além de o BA não mudar a sensibilidade ao etileno. À luz desses resultados, poder-se-ia dizer que citocininas e etileno agem de modo sinérgico ou aditivo na inibição do alongamento caulinar. Contudo, essas duas classes hormonais são consideradas antagonísticas quanto ao efeito na senescência, sendo as citocininas um forte inibidor e o etileno um eficiente promotor desse importante evento fisiológico (ver Capítulo 13).

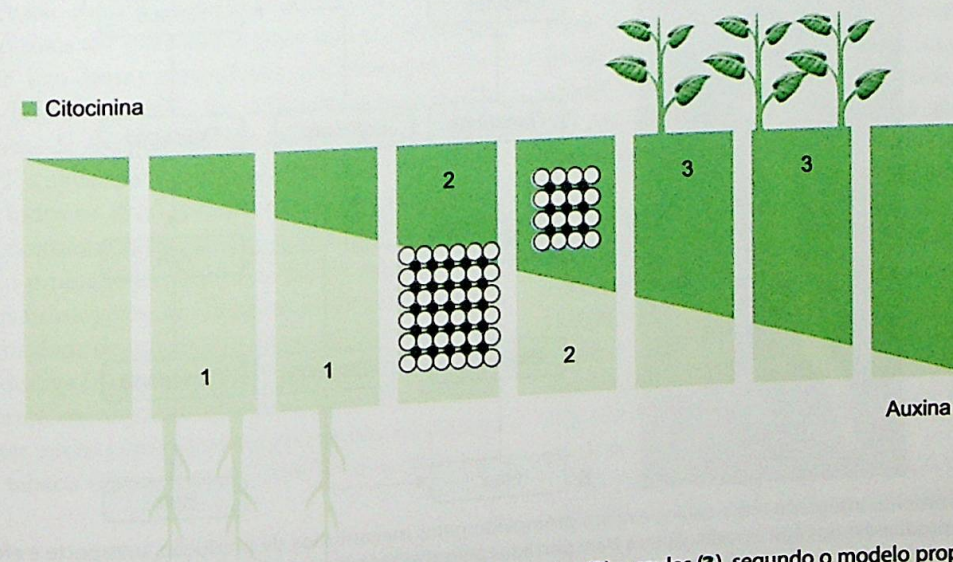
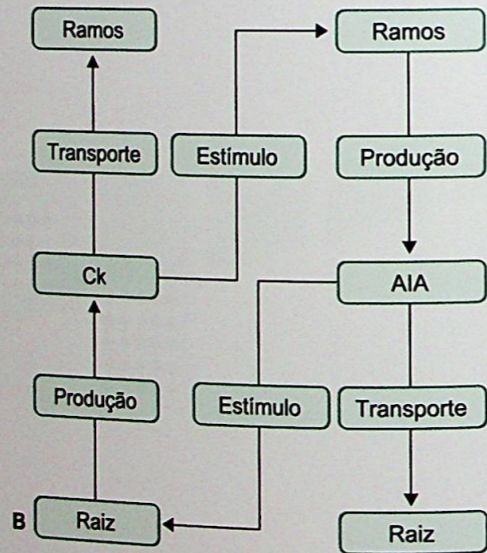


Figura 10.15 Interação entre auxina e citocinina na indução de raízes (1), calos (2) e caules (3), segundo o modelo proposto por Skoog e Miller (1957). Cada retângulo representa um explante com um balanço auxina/citocinina endógeno específico, o qual costuma ser o reflexo das quantidades de hormônios adicionados ao meio de cultivo.

Além da auxina e do etileno, o ácido abscísico (ABA) pode interagir com as citocininas, nesse caso de forma indireta. Deve-se considerar que, como o transporte das citocininas produzidas nas raízes para os caules depende da taxa transpiratória (via xilema), o ABA pode influenciar os níveis de citocininas na parte aérea, já que se trata de um dos principais reguladores do fechamento estomático. A ocorrência de uma interação mais direta entre essas duas classes hormonais é sugerida pelo fato de o ABA ser um inibidor de regiões de replicação de DNA durante a mitose, tendo as citocininas justamente um efeito contrário.

### Balanço auxina/citocinina e desenvolvimento vegetal

Uma das principais características do desenvolvimento das plantas vasculares, e que as distingue dos animais, é o fato de esse desenvolvimento ocorrer predominantemente em um estágio pós-embriônico, ou seja, a maior parte do desenvolvimento ontogenético se dá ao longo da vida da planta, com a formação contínua e repetitiva de órgãos, como ramos, raízes, folhas, flores e frutos. A organogênese continuada das plantas é o resultado da manutenção, mesmo na fase adulta, de tecidos embrionários denominados meristemas caulinar e radicular. Pouco depois da descoberta da auxina (1934) e das citocininas (1955), postulou-se que essas duas classes hormonais, agindo conjuntamente, controlariam o desenvolvimento vegetal atuando diretamente na definição dos meristemas e, portanto, no tipo de órgão – caule ou raiz – a ser formado (Skoog e Miller, 1957). Diferentemente das auxinas, normalmente associadas à indução de raízes, um balanço auxina/citocinina favorável à indução de raízes, um balanço auxina/citocinina favorável às citocininas induz a formação de gemas caulinares tanto *in vitro* quanto *ex vitro*. A propósito, com relação ao efeito morfogenético desse balanço, é mister enfatizar que, sob condições normais, a concentração absoluta da citocinina, imprescindível à formação das gemas, não precisa ser necessariamente superior à da auxina. Existem consideráveis evidências de que esse efeito



**Figura 10.16 A e B.** Crescimento integrado entre caules e raízes promovido pelos mecanismos de produção, transporte e efeito das citocininas (Ck) e auxina (AIA). As Ck produzidas nos ápices radiculares e transportadas pelo xilema induzem a formação de ramos. Os novos ramos são fontes de AIA que, por sua vez, estimulam a produção de novas raízes. Na imagem, é possível observar uma raiz de *Lycopersicon hirsutum*, a qual formou gemas caulinares quando a parte aérea foi removida. Note que os novos ramos se formaram após o estabelecimento de um dreno (intumescimento) na raiz.

diferencial de auxinas e citocininas na indução de caules e raízes é importante para o desenvolvimento integrado do vegetal. Desse modo, as citocininas produzidas nas raízes podem induzir a formação de ramos cujos ápices são centros produtores de auxina, a qual, por sua vez, é necessária à formação de mais raízes (Figura 10.16). Isso posto, não seria exagero dizer que a arquitetura final da planta depende, em boa parte, da interação entre os sistemas caulinares e radiculares, e que a interação entre a citocinina e a auxina ocupa uma posição destacada nesse processo. O crescimento integrado e equilibrado entre caules e raízes tem imensa importância, pois esses órgãos apresentam funções complementares para a sobrevivência do vegetal.

Embora as primeiras evidências de que o balanço auxina/citocinina controlava o desenvolvimento vegetal tenham surgido a partir de estudos com hormônios exógenos, ou seja, aplicados a tecido medular de caule de tabaco (Skoog e Miller, 1957), de modo geral a correta interpretação desse tipo de abordagem experimental ou prática sofre uma série de limitações. Algumas dessas limitações são a falta de conhecimento quanto à capacidade de absorção, ao transporte e à inativação pelo tecido no qual o hormônio foi aplicado, além das alterações que o hormônio exógeno pode provocar no nível hormonal endógeno. Atualmente, duas abordagens têm sido empregadas para sobrepor essas limitações. Uma delas consiste na dosagem do conteúdo hormonal endógeno nos tecidos (Peres *et al.*, 1997), e a outra é por meio do uso de plantas transgênicas nas quais se introduzem genes que alteram o metabolismo ou a sensibilidade hormonal. Como os hormônios vegetais são mensageiros químicos presentes em concentrações muito reduzidas nos tecidos (em geral,  $10^{-9}$  mol/g de tecido fresco), sua quantificação torna-se dependente do domínio de técnicas analíticas muito sensíveis, como a cromatografia do tipo HPLC (*high performance liquid chromatography*) e o uso de anticorpos em ensaio do tipo ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*), além de espectrometria de massas (MS) acoplada à cromatografia gasosa (GC) ou ao HPLC.

A despeito de os estudos utilizando determinação do conteúdo hormonal endógeno terem permitido um avanço substancial, deve-se considerar que eles também estão sujeitos a limitações. Uma delas é não se saber se o hormônio quantificado se encontrava ativo ou inativo. Outra limitação refere-se à perda de informação quanto à compartimentalização interna (celular e tissular), já que, mesmo se utilizadas amostras muito pequenas de tecidos (mg), compartimentos heterogêneos são misturados durante os processos de extração. Desse modo, citocininas inativas presentes nos vacúolos dos tecidos dosados podem estar sendo contabilizadas como ativas. Por sua vez, os estudos envolvendo produção de plantas transgênicas requerem que os genes a serem introduzidos estejam previamente isolados e clonados em vetores de transformação (plasmídios multiplicados em *Escherichia coli* e/ou *Agrobacterium*). Além disso, sistemas para introdução desses genes nas plantas necessitam ser otimizados. A seguir, serão apresentados alguns exemplos de plantas transgênicas nas quais se introduziram genes que alteram a sensibilidade ou o metabolismo de citocininas e suas consequências sobre o desenvolvimento do vegetal.

As primeiras plantas transgênicas com alterações no balanço auxina/citocinina resultaram da introdução do gene *IPT* de *Agrobacterium tumefaciens*. Esse gene foi introduzido utilizando-se diferentes promotores (sequência responsável pela indução da transcrição do gene em estudo), o que causou certa variação no fenótipo de cada tipo de transgênico. As características mais comumente encontradas em tais plantas foram a inibição da formação de raízes e a perda de dominância apical, em virtude do desenvolvimento de gemas caulinares axilares. A não formação de raízes em plantas transgênicas expressando o gene *IPT*, sobretudo naquelas em que esse gene foi ligado a um promotor forte (35S de CaMV), obrigava a enxertia das plantas transgênicas sobre plantas normais, visando à sobrevivência das primeiras. Em outros estudos, o gene *IPT* foi fundido com promotores induzidos para que as citocininas passassem a ser produzidas somente quando de um estímulo. Nesses estudos, plantas transgênicas crescendo sem ter o estímulo para expressão de *IPT* apresentaram fenótipo normal, não necessitando mais ser enxertadas para que tivessem um sistema radicular. Um desses promotores, induzido por choque térmico, ou *heat shock* (HS), foi utilizado para produzir plantas transgênicas de *Arabidopsis*. Nessas plantas expressando o gene *HS-IPT*, a aplicação de choques térmicos (exposição a 40°C por 1 h, todos os dias) induziu alterações fenotípicas (p. ex., perda da dominância apical) não apresentadas por um único tratamento prolongado. Esses resultados sugerem que, em alguns efeitos fisiológicos, as Ck agem como um reostato, em alguns efeitos fisiológicos, as Ck agem como um interruptor regulando a intensidade de um sinal, e não como um interruptor regulando a intensidade de um sinal, e não como um interruptor regulando a intensidade de um sinal.\* Resultados sugestivos também foram encontrados quando o gene *IPT* foi levado a se manifestar apenas em determinadas partes de plantas transgênicas de tabaco (Estruch *et al.*, 1991). Em tecidos nos

\* O reostato é, basicamente, uma resistência de valor variável entre dois limites utilizada para controlar a intensidade de uma corrente elétrica. São exemplos de reostatos os botões de volume dos rádios e aparelhos de TV antigos.

quais se verificou essa ocorrência, como foi o caso das folhas, houve acumulação local e restrita de citocininas, o que culminou na formação de gemas caulinares em pontos diferentes na própria lâmina foliar. Esse fenômeno, conhecido como epifilia, acontece naturalmente em folhas de fortuna (*Bryophilum*) e *Kalanchoe*. Curiosamente, quando a acumulação de citocininas se deu na planta como um todo, não houve ocorrência de epifilia. A constatação de que o acúmulo transitório de Ck não tem o mesmo efeito que o acúmulo constante, e de que há diferenças também quanto à acumulação local ou na planta como um todo, sugere que a ação hormonal, sobretudo o efeito do balanço auxina/citocinina no desenvolvimento, depende do estabelecimento de gradientes espaciais e temporais. Os principais responsáveis pelo estabelecimento desses gradientes seriam as peculiaridades da síntese e do transporte, além das enzimas de inativação de citocininas, discutidas no início deste capítulo.

Os primeiros genes responsáveis pela inativação de citocininas foram isolados em 1999 (Houba-Hérin *et al.*, 1999; Martin *et al.*, 1999a; 1999b), possibilitando a alteração do conteúdo endógeno de citocininas de um modo inverso ao que já havia sido feito utilizando-se o gene *IPT*. Nesse sentido, tabaco transgênico superexpressando o gene para a oxidase de citocinina mostrou, pela primeira vez, o fenótipo de plantas com níveis reduzidos de Ck. Esse ineditismo resulta do fato de que, diferentemente de outros hormônios, não existem compostos químicos que possam ser utilizados como inibidores efetivos da biossíntese ou ação de Ck. As referidas plantas mostraram-se anãs como consequência de um retardamento grave do desenvolvimento dos ramos, incluindo a presença de entrenós curtos, folhas lanceoladas e epinásticas e redução da dominância apical (este último item será abordado mais adiante). Em contrapartida, o crescimento do sistema radicular e o número de raízes laterais e adventícias aumentaram, o alongamento das raízes primárias foi mais rápido e primórdios de raízes laterais foram notados próximo do ápice radicular (Werner *et al.*, 2001). Outra maneira de diminuir o conteúdo endógeno de citocininas seria por meio da superexpressão de genes para as enzimas que conjugam citocininas ativas. Isso foi demonstrado com plantas transgênicas de tabaco superexpressando o gene *ZOG1*, as quais formaram raízes aéreas nos caules durante as primeiras 2 semanas, crescendo sob alta umidade. Além disso, essas plantas apresentaram reduzida dominância apical e entrenós curtos (Mok *et al.*, 2000).

Uma característica que chama a atenção em todos os exemplos de plantas transgênicas com alterações no conteúdo de citocininas e, consequentemente, no balanço auxina/citocinina é o fato de tanto plantas transgênicas com excesso (Medford *et al.*, 1989; Rupp *et al.*, 1999) quanto com falta (Mok *et al.*, 2000; Werner *et al.*, 2001) de Ck apresentarem diminuição da dominância apical. A interpretação correta de tais resultados exige um exame mais detalhado do processo de dominância apical.

No processo de dominância apical típico, o ápice em crescimento de um caule inibe o crescimento das gemas laterais na mesma planta. A explicação mais difundida para a dominância apical refere-se à hipótese da inibição pela auxina, segundo a qual esse hormônio, produzido no ápice, se moveria

basipetamente (do alto para baixo) para as gemas laterais e inibiria seu crescimento. Uma das evidências para essa hipótese consiste na demonstração de que a perda da dominância apical promovida pela decapitação do ápice (supressão da síntese de auxina) é recuperada pelo tratamento da planta decapitada com auxina. Contudo, essa explicação não contempla a constatação de que o efeito inibitório da auxina vinda do ápice, ou quando aplicada, pode ser revertido pela aplicação de citocininas diretamente sobre as gemas laterais. Isso sugere que a dominância apical é uma típica resposta ao balanço auxina/citocinina, assim como outros processos do desenvolvimento vegetal. Desse modo, houve um melhor entendimento da dominância apical quando se constatou que, em plantas intactas, as citocininas originadas das raízes tendem a se acumular nos ápices produtores de auxina, promovendo um balanço auxina/citocinina favorável ao seu desenvolvimento. Com a remoção do ápice caulinar, as citocininas passam a se acumular nas gemas laterais, promovendo seu desenvolvimento. Há suspeitas de que a própria auxina produzida no ápice caulinar controle o conteúdo de citocininas que chegam até as gemas axilares. Em plantas intactas crescendo ativamente, o acúmulo de auxina e citocininas na gema apical poderia levar ao seu desenvolvimento simplesmente promovendo divisão e expansão celular, além do estabelecimento de um dreno nessa região em detrimento das gemas laterais. Tanto a retirada do ápice quanto a aplicação de citocininas nas gemas laterais deslocariam o dreno e a dominância seria quebrada. De igual modo, a aplicação de auxina na ponta de plantas decapitadas manteria o dreno e a dominância. Por esse mecanismo, vê-se que a dominância apical depende da formação de gradientes internos de auxina e citocininas para que os drenos sejam estabelecidos. A ausência desses gradientes em plantas transgênicas, por causa da expressão continuada dos genes de biossíntese ou inativação de citocininas na planta como um todo, explicaria a reduzida dominância apical verificada tanto em plantas com níveis elevados quanto com níveis baixos desse hormônio.

### Citocininas na interação entre os vegetais e o ambiente

Conforme visto no item anterior, a citocinina – ou, mais precisamente, o balanço auxina/citocinina – é essencial para o desenvolvimento pós-embriônico dos vegetais. Esse tipo de desenvolvimento envolvendo a formação de órgãos ao longo de todo o ciclo de vida, por si só, já constitui uma resposta às variações do ambiente. Dessa forma, os vegetais, embora sejam organismos sésseis, interagem intensamente com o ambiente por meio da indução ou repressão dos processos que levam à formação de novos tecidos e órgãos, de modo a garantir sua sobrevivência e reprodução. As citocininas estão envolvidas intensamente na resposta das plantas a, pelo menos, quatro estímulos externos: luz, temperatura, nutrientes e interação com outros organismos.

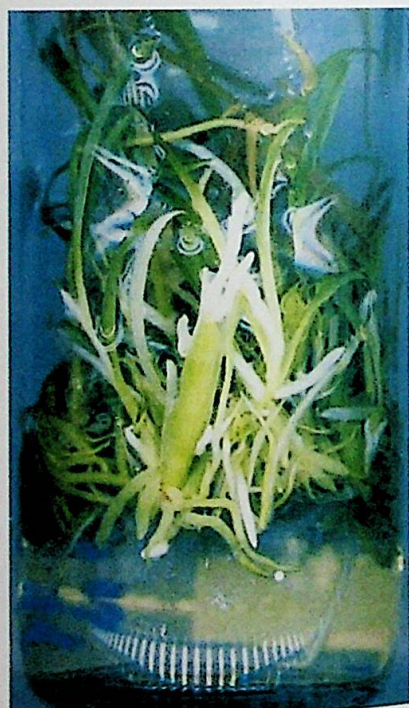
#### Luz

Com relação à luz, são conhecidos os efeitos das citocininas na diferenciação de proplastídios em cloroplastos e biossíntese de clorofila. A aplicação de citocininas em plântulas mantidas

no escuro tende a mimetizar o efeito da luz na promoção da abertura e expansão dos cotilédones e na inibição da expansão celular exagerada dos caules, conhecida como estiolamento. Contudo, é interessante notar que, em plantas de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae) transferidas para o escuro, a retomada da atividade dos meristemas apicais e laterais, a posteriormente originam ramos estiolados (Figura 10.17), coincide com uma elevação rápida de cerca de oito vezes da concentração de citocininas endógenas (Suzuki *et al.*, 2004). No referido experimento, a elevação transitória do nível endógeno de citocinina parece estar associada à quebra da dominância do pseudobulbo, um órgão de reserva em orquídeas, e ao subsequente estabelecimento de novos drenos necessários ao desenvolvimento das gemas caulinares, as quais, na ausência de luz, posteriormente crescem de modo estiolado.

#### Nutrientes minerais

Um dos principais nutrientes com os quais as citocininas interagem é o nitrogênio. Coincidentemente, a clorose, bem como a aceleração da senescência das folhas em virtude da deficiência de N, lembra os aspectos adquiridos por tecidos com baixos níveis de citocininas. Já foi sugerido que, como as citocininas são compostos nitrogenados (adenina), a deficiência de nitrogênio poderia ter reflexo direto na biossíntese desse hormônio. Levando-se em conta que o nitrogênio normalmente equivale a 1,5% da matéria seca das plantas, e que a porcentagem de citocininas nos tecidos vegetais não chega à milionésima parte desse valor, é pouco provável que uma deficiência de nitrogênio possa vir a limitar a biossíntese desse fitormônio. Tal constatação leva à postulação de que a interação



**Figura 10.17** Formação de ramos laterais estiolados (estruturas brancas) em pseudobulbo de *Catasetum fimbriatum* (Orchidaceae), após 20 dias da transferência do frasco do claro para o escuro. Dosagens das citocininas endógenas mostraram uma pronunciada elevação nos seus teores em comparação às plantas mantidas no claro. Imagem do Dr. Rogério M. Suzuki.

entre essas duas substâncias deve se dar, portanto, em outro nível, certamente mais complexo.

Uma interação possível poderia dar-se pela regulação das enzimas do metabolismo de nitrogênio. Nesse sentido, existem evidências de que as citocininas são ativadoras da enzima redutase do nitrato. Além disso, já se constatou, em plantas de milho, que a aplicação de nitrato leva temporariamente ao acúmulo de Ck primeiro nas raízes, depois na solução xilemática e, finalmente, nas folhas (Takei *et al.*, 2001b). Estudos subsequentes desse grupo de pesquisadores com plantas de *A. thaliana* (Takei *et al.*, 2004) vieram mostrar que a presença do íon  $\text{NO}_3^-$  estimulava, significativamente, a expressão do gene *AtIPT*, o qual, conforme já mencionado anteriormente, é responsável pela codificação da enzima-chave na síntese de citocininas: a isopentenil transferase. Entre os vários genes estudados dessa família, o *AtIPT3* foi o que se mostrou mais responsivo ao  $\text{NO}_3^-$ , enquanto o *AtIPT5* era mais efetivo em tratamentos prolongados tanto com  $\text{NO}_3^-$  quanto com  $\text{NH}_4^+$ . Isso sugere que as plantas elevariam a concentração de Ck nas raízes em resposta ao nitrato e ao amônio, sendo essa classe hormonal posteriormente transportada para os caules. Assim, as Ck podem representar um sinal de longa distância indicando a disponibilidade de nitrogênio da raiz para o caule, possivelmente para coordenar o desenvolvimento dessas duas partes complementares no vegetal. Essa constatação está de acordo com o amplo efeito que a adubação nitrogenada pode apresentar sobre as plantas, sob a forma de maior vigor, esverdeamento foliar e iniciação de novas gemas caulinares e ramos (quebra da dominância apical).

#### Temperatura

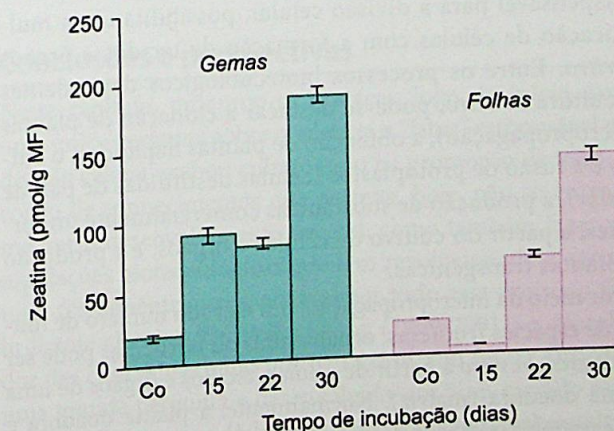
Há boas evidências disponíveis do efeito da temperatura sobre o teor das citocininas endógenas. Estudos realizados com algumas espécies de orquídeas tropicais têm evidenciado um efeito promotor de temperaturas baixas na floração dessas plantas (vernalização), bem como, paralelamente, nos teores endógenos de suas citocininas. Assim, plantas híbridas de *Dendrobium nobile* apresentaram um incremento gradual nos níveis de zeatina nas gemas laterais encontradas ao longo do pseudobulbo, a partir de fevereiro (verão) até junho (inverno – região Sudeste do Brasil), coincidindo o último mês com o início do desenvolvimento das gemas florais. Corroborando o efeito da diminuição da temperatura na elevação dos teores de citocininas endógenas ao longo de vários meses, estudos envolvendo tratamentos termoperiódicos mais curtos, de 12 h ( $10^\circ\text{C}$  luz/ $25^\circ\text{C}$  escuro), aplicados nessas mesmas plantas ao longo de 30 dias, resultaram em uma elevação altamente significativa de citocininas, principalmente das formas livres e ribosídicas de zeatina e isopenteniladenina, tanto nas gemas laterais quanto nas folhas dessa orquídea, tendo, nesse caso, a concentração de zeatina alcançado valores expressivamente superiores aos seus níveis iniciais (Figura 10.18). A aplicação de benziladenina em plantas de *Dendrobium*, bem como em outros gêneros de orquídeas tropicais, tem se mostrado eficiente na floração. Mesmo pequenas porções caulinares de plantas híbridas de *D. nobile*, ainda no estado juvenil, podem ser induzidas a florescer *in vitro*, quando incubadas na

presença de TDZ, uma potente citocinina sintética (Ferreira *et al.*, 2006). Reforçando ainda o efeito promotor de tratamento termoperiódico sobre os níveis endógenos de citocinina, plantas de *Phalaenopsis* (Orchidaceae) submetidas a temperaturas elevadas apresentaram uma diminuição nos teores dessas substâncias paralelamente à inibição da floração (ver Capítulo 18).

Apesar do efeito promotor das citocininas endógenas e exógenas na floração das plantas orquídeas anteriormente mencionadas, os resultados disponíveis até o momento não são ainda consistentes o bastante para se inferir sobre a atuação efetiva desse grupo de hormônios na passagem dramática do estado vegetativo para o estado floral. Os estudos indicam somente que as citocininas participam de alguma forma do desenvolvimento de gemas, estas já no estado floral (portanto, já induzidas), provavelmente pela retomada das divisões celulares de seus meristemas. O(s) sinal(ais) responsável(is) pela indução floral propriamente dita permanece(m) ainda desconhecido(s).

#### Interação com microrganismos

Quanto à interação das plantas com outros organismos, é bastante conhecido que a formação de galhas provocadas por larvas de insetos, fungos e bactérias (p. ex., *Agrobacterium*) envolve a produção de citocininas. Enquanto certos microrganismos e larvas de insetos produzem e excretam citocininas, em *Agrobacterium* há a passagem de um gene de produção de citocininas (*IPT*) para o tecido infectado, modificando-o geneticamente. Outra infecção deletéria à planta hospedeira é a formação descontrolada de ramos laterais (fasciação), nas chamadas vassouras-de-bruxa, provocadas por fungos produtores de citocininas (Figura 10.19). Além das fasciações, os fungos produtores de citocininas podem induzir a formação das conhecidas “ilhas verdes” (Figura 10.19) nos locais infectados. A inibição da senescência e o estabelecimento de drenos característicos das “ilhas verdes”, assim como a promoção da organogênese nas galhas e fasciações, são conhecidos efeitos das citocininas e, obviamente, favorecem o aporte



**Figura 10.18** Variações dos teores endógenos de zeatina em gemas laterais e folhas de plantas de *Dendrobium* “Second Love” (Orchidaceae), incubadas a  $10^\circ\text{C}$  (escuro) e  $25^\circ\text{C}$  (claro), durante 30 dias. MF: matéria fresca; Co: controle sem incubar. As barras indicam o erro-padrão das médias. Fonte: Campos e Kerbauy (2004).



**Figura 10.19** Papel das citocininas na interação planta-microrganismo. **A.** Formação de "ilhas verdes" nos locais onde há lesões provocadas por fungos em folha de mangueira (*Mangifera indica*). **B.** Observa-se a chamada vassoura-de-bruxa do caçaueiro (*Theobroma cacao*), a qual consiste em uma intensa brotação, relacionada com a produção de citocininas pelo fungo *Crinipellis pernicioso*. Imagem cedida pelo Prof. Dr. Antônio Figueira (CENA/USP).

de nutrientes para os organismos que se instalam nos tecidos vegetais. Há, todavia, interações que resultam no estabelecimento de simbioses benéficas, conforme ocorre em raízes de plantas leguminosas e *Rhizobium* sp., bactéria fixadora de nitrogênio. Nesse caso, quando já no interior do parênquima radicular, as citocininas produzidas pela bactéria levam à retomada das divisões celulares, dando início à formação do nódulo radicular (ver Capítulo 3).

### Citocininas e biotecnologia

Ao longo deste capítulo, foi possível perceber que as citocininas compreendem uma classe hormonal intensamente ligada à biotecnologia de plantas, já que são pré-requisito indispensável para a divisão celular, possibilitando a multiplicação de células com a formação de tecidos e órgãos *in vitro*. Entre os processos biotecnológicos dependentes da cultura *in vitro*, pode-se destacar a clonagem de plantas (micropropagação), a obtenção de plantas haploides, o cultivo e a fusão de protoplastos (células destituídas de parede celular), a produção de substâncias comercialmente importantes, a partir do cultivo de células e órgãos, e a produção de plantas transgênicas.

Por meio da micropropagação, um elevado número de mudas de espécies frutíferas, ornamentais ou hortícolas pode ser produzido *in vitro* a partir de células, tecidos e órgãos de uma planta doadora (matriz). Normalmente, a planta doadora é um exemplar portador de características valiosas, previamente selecionadas, e sua micropropagação possibilita a obtenção de um grande número de mudas geneticamente idênticas em um tempo e espaço reduzidos. Por meio ainda da micropropagação, é perfeitamente viável a eliminação de patógenos

endofíticos, como vírus, bactérias e fungos, que causam sérios prejuízos ao crescimento e à produção das plantas infectadas. Nesse caso, obtêm-se plantas saudáveis pelo isolamento e pelo cultivo de ápices caulinares muito reduzidos, já que os meristemas geralmente são livres desses contaminantes. É quase certo que a batatinha e os morangos encontrados hoje em mercados e feiras tenham sido produzidos por plantas que, por sua vez, foram geradas a partir de matrizes clonadas em um laboratório comercial de biotecnologia. Tais laboratórios são grandes importadores de citocininas, podendo-se dizer que essas substâncias – cujos preços podem variar, em dólar americano, desde US\$ 15,00 o grama (BAP) até US\$ 3,00 o miligrama (zeatina) – fazem parte dos custos de produção de muitos alimentos consumidos hoje.

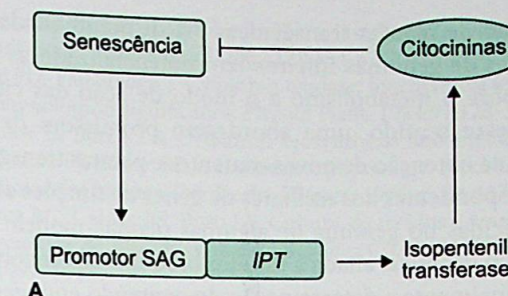
A aplicação de citocininas em anteras imaturas cultivadas *in vitro* pode alterar a via normal de desenvolvimento dos seus micrósporos, os quais normalmente dariam origem aos grãos de pólen, induzindo a formação de plantas haploides. Uma das vantagens das plantas haploides é que, ao se restituir o conjunto complementar de cromossomos nesses indivíduos, por meio de tratamento com uma substância denominada colchicina, as plantas resultantes serão 100% homozigotas. As sementes produzidas em plantas homozigotas gerarão outras plantas idênticas à planta-mãe, tendo as mesmas vantagens da propagação clonal convencional ou por micropropagação.

Tanto a fusão de protoplastos quanto a produção de plantas transgênicas são estratégias utilizadas para a introdução de genes de interesse em espécies cultivadas. Esses dois métodos possibilitam a passagem de genes entre espécies que não poderiam ser intercruzadas. Em ambos os processos, o evento ocorre no nível celular e, portanto, há a necessidade

de obtenção de uma planta inteira a partir da referida célula. A regeneração de uma nova planta a partir de uma célula envolve divisão e diferenciação *in vitro*, sendo os dois processos dependentes do emprego de citocininas.

O efeito marcante das citocininas no estabelecimento de drenos e na inibição da senescência também sugere importantes aplicações biotecnológicas. Em ambientes naturais, a senescência dos órgãos vegetais tem uma importância ecológica clara ao se considerar que, por exemplo, quanto mais tempo viver uma folha, maior será sua exposição a fatores que limitarão sua fotossíntese, como as intempéries, os patógenos e as pragas. Já no ambiente agrícola, no qual essas limitações tendem a ser minimizadas com o uso do cultivo protegido (estufas agrícolas) e a aplicação de inseticidas e fungicidas, pode ser compensatório inibir a senescência e estender o período produtivo de órgãos fotossintéticos. Uma das maneiras de conseguir isso poderia ser a produção de plantas transgênicas com superprodução de citocininas. Contudo, como o excesso de citocininas pode afetar negativamente outros processos do desenvolvimento, seria necessário que o sistema fosse autorregulado de tal modo a não permitir o acúmulo excessivo de citocininas e a inibir somente a senescência. Tal especificidade foi obtida em um sistema no qual o gene *IPT* foi ligado ao promotor *SAG* (*senescence-associated genes*), o qual, conforme indicado pelo próprio nome, é induzido pela senescência (Gan e Amasino, 1995). Dessa forma, no referido sistema, o início da senescência induz o promotor *SAG*, o qual ativa o gene *IPT*, desencadeando a produção de citocininas e, por conseguinte, a inibição da senescência e a produção em excesso das próprias citocininas (Figura 10.20). As plantas transgênicas expressando esse sistema apresentam folhas que permanecem funcionais na realização da fotossíntese por um período prolongado, aumentando, assim, a produção de matéria seca da planta como um todo.

É de amplo conhecimento que o aumento da produção de matéria seca (MS) em si não significa aumento de produtividade, a menos que esse aumento seja na parte colhida da planta, o que afeta positivamente o chamado índice de coleta (relação entre a MS da parte colhida e a MS total). De modo semelhante ao sistema discutido aqui, a ligação do gene *IPT* a promotores que se expressam nas partes colhidas das plantas cultivadas poderia deslocar a produção de citocininas e, consequentemente, o estabelecimento de drenos para essas partes. Um exemplo disso foi a produção de plantas transgênicas de tomateiro expressando o gene *IPT* ligado a um promotor que só se expressa em tecido de ovário (Martineau *et al.*, 1995). Nessas plantas, o acúmulo de citocininas nos ovários aumentou a força do dreno, fazendo com que os frutos formados acumulassem mais fotoassimilados, o que se traduziu em um aumento do chamado Brix, índice que indica o teor de sólidos solúveis, principalmente açúcares. No referido experimento, não houve um aumento no tamanho do fruto, já que as plantas transgênicas tenderam a produzir um maior número de frutos por planta, em razão de um maior "pegamento" de ovários fecundados. Contudo, um dos parâmetros que mais se buscam na produção de tomate e outros frutos é justamente o aumento do Brix.



**Figura 10.20 A.** Sistema autorregulado, para inibição de senescência em folhas de tabaco, representado pela ligação do promotor *SAG* (*senescence associated gene*) ao gene *IPT*, responsável pela síntese da enzima isopentenil transferase. Nesse sistema, o início da senescência desencadeia a produção de citocininas, as quais são inibidoras de senescência e, por isso, previnem sua própria produção em excesso (*feedback* negativo). As setas indicam ativação; as barras, inibição. Adaptada de Gan e Amasino (1995). **B.** Fenótipo da planta de tabaco geneticamente modificada (lado esquerdo) e da planta normal (lado direito). Reproduzida, com autorização, de Gan e Amasino (1995).

### Conclusões e perspectivas

Neste capítulo, procurou-se destacar, logo de início, como uma única pergunta sobre qual seria o "fator" responsável pela divisão celular acabou culminando na promoção de todo um corpo de conhecimentos que permite, hoje, não só entender melhor o desenvolvimento vegetal, como também fazer manipulações biotecnológicas que têm revolucionado a agricultura. Certamente, o responsável por todo esse processo foi o brilhante cientista Dr. Folke Skoog (1909-2001), o descobridor das citocininas, cujo indiscutível mérito foi ter elaborado uma grande pergunta e desenvolvido um bom modelo experimental para respondê-la. Isso posto, é dispensável ressaltar a importância da pesquisa básica para permitir um salto qualitativo e conceitual no desenvolvimento de novas tecnologias.

Contudo, tem sido frequente a constatação de que avanços tecnológicos também podem promover novos conhecimentos básicos. Desse modo, conforme visto neste capítulo,

a obtenção de plantas transgênicas e a disponibilidade das sequências de genomas inteiros têm potencializado as pesquisas sobre o metabolismo e o modo de ação das citocininas. Nesse sentido, uma abordagem promissora deverá consistir na obtenção de novos mutantes e plantas transgênicas correspondentes aos milhares de genes de funções ainda desconhecidas no genoma de algumas plantas-modelo. Tal abordagem genética, aliada a estudos bioquímicos envolvendo principalmente a determinação do conteúdo endógeno e da dinâmica (biossíntese, transporte e inativação) hormonal, deverá aumentar consideravelmente os conhecimentos sobre as citocininas e o próprio controle do desenvolvimento vegetal nos próximos anos.

### Referências bibliográficas

- Campos KO, Kerbauy GB. Thermoperiodic effect on flowering and endogenous hormonal status in *Dendrobium* (Orchidaceae). *J Plant Physiol*. 2004;161:1385-87.
- Cary AJ, Liu E, Howell SH. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol*. 1995;107:1075-82.
- Das NK, Patau K, Skoog F. Initiation of mitosis and cell division by kinetin and indoleacetic acid in excised tobacco pith tissue. *Physiol Plant*. 1956;9:640-51.
- Durand B, Durand R. Sex determination and reproductive organ differentiation in *Mercurialis*. *Plant Sci*. 1991;80:49-65.
- Estruch JJ, Prinsen E, Van Onckelen H, Schell J, Spina A. Viviparous leaves produced by somatic activation of an inactive cytokinin-synthesizing gene. *Science*. 1991;254:1364-7.
- Faiss M, Strnad M, Redig P, Doležal K, Hanuš J, Van Onckelen H, et al. Chemically induced expression of the rolC-encoded  $\beta$ -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: rolC does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. *Plant J*. 1996;10:33-46.
- Fankhauser C. Light perception in plants: cytokinins and red light join forces to keep phytochrome B active. *Trends in Plant Science*. 2002;7:143-5.
- Ferreira WM, Kerbauy GB, Kraus JE, Pescador R, Suzuki RM. Thidiazuran influences the endogenous levels of cytokinins and IAA during the flowering of isolated shoots of *Dendrobium*. *J Plant Physiol*. 2006;1126-34.
- Gan S, Amasino RM. Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science*. 1995;270(5244):1986-8.
- Hall RH. Cytokinins as a probe of developmental processes. *Ann Rev Plant Physiol*. 1973;24:415-44.
- Helliwell CA, Chin-Atkins AN, Wilson IW, Chapple R, Dennis ES, Chaudhury A. The *Arabidopsis* AMP1 gene encodes a putative glutamate carboxypeptidase. *Plant Cell*. 2001;13:2115-25.
- Hewelt A, Prinsen E, Thomas M, Van Onckelen H, Meins F Jr. Ectopic expression of maize knotted1 results in the cytokinin-autotrophic growth of cultured tobacco tissues. *Planta*. 2000;210:884-9.
- Houba-Hérin N, Pethe C, D'Alayer J, Laloue M. Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J*. 1999;17:615-26.
- Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*. 2001;413:383-9.
- Inoue T, Higuchi M, Hashimoto Y, Seki M, Kobayashi M, Kato T, et al. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*. 2001;409:1060-3.
- Kakimoto T. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol*. 2001;42:677-85.
- Letham DS. Cytokinins from *Zea mays*. *Phytochemistry*. 1973;12:2445-55.
- Letham DS, Palni MS. The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu Rev Plant Physiol*. 1983;34:163-97.
- Li Y, Shi X, Strabala TJ, Hagen G, Guilfoyle TJ. Transgenic tobacco plants that overproduce cytokinins show increased tolerance to exogenous auxin and auxin transport inhibitors. *Plant Sci*. 1994;100:9-14.
- Martin RC, Mok MC, Mok DWS. A gene encoding cytokinin enzyme zeatin O-xylosyltransferase of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiol*. 1999a;120:553-7.
- Martin RC, Mok MC, Mok DWS. Isolation of a cytokinin gene, ZOG1, encoding zeatin O-glucosyltransferase from *Phaseolus lunatus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999b;96:284-9.
- Martineau B, Summerfelt KR, Adams DF, Deverna JW. Production of high solids tomatoes through molecular modification of levels of the plant growth regulator cytokinin. *Biotechnology*. 1995;13:250-4.
- Medford JI, Horgan R, El-Sawi Z, Klee H. Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *Plant Cell*. 1989;1:403-13.
- Miller CO, Skoog F, Von Saltza MH, Strong FM. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J Am Chem Soc*. 1955;77:1392.
- Mok DW, Martin RC, Shan X, Mok MC. Genes encoding zeatin O-glycosyltransferases. *Plant Growth Regulation*. 2000;32:285-7.
- Mok DWS, Mok MC. Cytokinin metabolism and action. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001;52:89-118.
- Parthier B. The role of phytohormones cytokinins in chloroplast development. *Bioch Physiol Pflanz*. 1979;174:173-214.
- Peres LEP, Mercier H, Kerbauy GB, Zaffari GR. Níveis endógenos de AIA, citocininas e ABA em uma orquídea acaule e uma bromélia sem raiz, determinado por HPLC e ELISA. *Rev Brasil de Fisiol Vegetal*. 1997;9:169-76.
- Riou-Khamlichi C, Huntley R, Jacquard A, Murray JAH. Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science*. 1999;283:1541-4.
- Roitsch T, Ehneb R. Regulation of source/sink relations by cytokinins. *Plant Growth Regulation*. 2000;32:359-67.
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmülling T. Increased steady state mRNA levels of the STM and KNAT1 homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J*. 1999;18:557-63.
- Skoog F, Strog FM, Miller FM. Cytokinins. *Science*. 1965;148:532-3.
- Skoog F, Miller CO. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp Soc Exp Biol*. 1957;11:118-231.
- Suzuki RM, Kerbauy GB, Zaffari GR. Endogenous hormonal levels and growth of dark-incubated shoots of *Catsetum fimbriatum*. *J Plant Physiol*. 2004;161:929-35.
- Takei K, Sakakibara H, Sygiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2001a;276:26405-10.
- Takei K, Sakakibara H, Taniguchi M, Sygiyama T. Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulators. *Plant Cell Physiol*. 2001b;42:85-93.
- Takei K, Ueda N, Aoki K, Kuromori T, Hirayama T, Shinozaki K, et al. AtIPT3 is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. 2004;5:1053-62.
- Thomas JC, Katterman FR. Cytokinin activity induced by thidiazuron. *Plant Physiol*. 1986;81:681-3.
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmülling T. Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:10487-92.
- White PR. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol*. 1934;9:585-600.
- Zhang K, Letham DS, John PCL. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34<sup>cdc2</sup>-like H1 histone kinase. *Planta*. 1996;200:2-12.

### Bibliografia

- Binns AN. Cytokinin accumulation and action: biochemical, genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 1994;45:173-96.
- Brzobohaty B, Moore I, Palme K. Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. *Plant Mol Biol*. 1994;26:1483-97.
- Coenen C, Lomax TL. Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends Plant Sci*. 1997;2:351-6.
- Haberer G, Kieber JJ. Cytokinins. New insights into a classic phytohormone. *Plant Physiol*. 2002;128:354-62.
- Hare PD, Van Staden J. Cytokinin oxidase: biochemical features and physiological significance. *Physiol Plant*. 1994;91:128-36.
- McGaw B, Burch LS. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ, editor. *Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology*. Dordrecht: Kluwer; 1995. p. 98-117.
- Torres AC, Caldas LS, Buso JA. *Cultura de tecidos e transformação genética de plantas*. v. 1 e 2. Brasília: CBAB/EMBRAPA; 1998. 864 p.